

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 970 986**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/59** (2007.01)  
**A61K 49/00** (2006.01)  
**A61P 7/04** (2006.01)  
**A61F 13/00** (2014.01)  
**A61L 24/02** (2006.01)  
**A61L 24/04** (2006.01)  
**A61K 47/69** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2014** **E 19208959 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2024** **EP 3659627**

54 Título: **Nanopartículas inorgánicas funcionalizadas con polifosfato como composiciones hemostáticas y métodos de uso**

30 Prioridad:

**08.03.2013 US 201361775354 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.06.2024**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (50.0%)**  
**1111 Franklin Street, 12th Floor**  
**Oakland, CA 94607, US y**  
**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KUDELA, DAMIEN;**  
**STUCKY, GALEN D.;**  
**MAY-MASNOU, ANNA;**  
**BRAUN, GARY BERNARD;**  
**MORRISSEY, JAMES H. y**  
**SMITH, STEPHANIE A.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 970 986 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**

Nanopartículas inorgánicas funcionalizadas con polifosfato como composiciones hemostáticas y métodos de uso

5 El tratamiento de heridas sangrantes, heridas particularmente muy sangrantes, puede requerir atención inmediata para controlar el sangrado. El sangrado severo plantea un riesgo muy real de muerte para la víctima si no se trata rápidamente. Aunque la pérdida de aproximadamente el 10-15 % del volumen sanguíneo total puede soportarse sin secuelas clínicas en una persona sana, si una laceración o un traumatismo penetrante (por ejemplo, herida con cuchillo o pistola) es lo suficientemente grave o involucra arterias o venas críticas, este volumen de sangre se puede  
10 perder en cuestión de minutos. La hemorragia debe reducirse de inmediato o se pueden producir daños irreversibles en los órganos y mortalidad.

Las heridas sangrantes, incluso aquellas que pueden ser menos graves, pueden plantear serias dificultades y riesgos cuando se inflige una herida grave en un área remota u otras situaciones (como las que se encuentran en un campo de batalla) donde la asistencia médica completa puede no estar disponible de inmediato. En tales  
15 circunstancias, puede ser fundamental tomar medidas para frenar o detener el sangrado para que el sujeto pueda ser transportado a un centro médico.

Se han desarrollado varios métodos y composiciones hemostáticas para promover la coagulación de la sangre, y se pueden aplicar para ayudar a controlar el sangrado en tales situaciones. El campo continúa desarrollando composiciones hemostáticas adicionales que proporcionan, por ejemplo, inicio rápido de coagulación sanguínea, aumento de la tasa de coagulación sanguínea, suficiente coagulación sanguínea y/o efectos secundarios adversos reducidos. De interés son tales composiciones hemostáticas que se pueden aplicar de forma rápida y segura en una situación de emergencia, como en el campo de batalla o en la escena de un accidente, sin la necesidad de  
20 entrenamiento intensivo o equipo.

El documento US8257740B1 divulga una composición de nanopartículas con cubierta de quitosano y métodos de fabricación.

30 Smith *et al.* (2010) divulga que el polifosfato ejerce efectos diferenciales sobre la coagulación de la sangre en función del tamaño del polímero.

**Sumario**

35 La invención proporciona una composición hemostática para usar en un método para promover la coagulación sanguínea en un sujeto, en donde dicha composición hemostática se administra al sujeto durante un período de tiempo suficiente para al menos iniciar la coagulación sanguínea, en donde la composición hemostática comprende:

- 40 una cantidad hemostáticamente eficaz de agente hemostático que comprende:
  - una nanopartícula; y
  - un polímero de polifosfato unido a la nanopartícula.

La invención también proporciona la composición hemostática para el uso descrito en el presente documento, en donde (i) la administración comprende la administración intravenosa de la composición hemostática al sujeto; (ii) la  
45 composición hemostática inicia la coagulación sanguínea a través de la ruta de coagulación del FXa en el sujeto; o (iii) el sujeto tiene una afección coagulopática y el método es eficaz para tratar la afección coagulopática en el sujeto, opcionalmente en donde una concentración de un factor procoagulante en el sujeto es insuficiente para tener un efecto hemostático. La afección coagulopática puede comprender la dilución de un factor procoagulante, hipotermia o acidosis.

50 La invención también proporciona la composición hemostática para el uso descrito en el presente documento, en donde el método comprende además la administración de un agente biológicamente activo al sujeto junto con la composición hemostática. El agente biológicamente activo puede comprender un segundo agente hemostático, un agente antiinflamatorio o un agente antibiótico. El segundo agente hemostático puede comprender Factor VIIa o tromboxano A2.

La invención también proporciona la composición hemostática para el uso descrito en el presente documento, en donde: (i) el polímero de polifosfato está unido a la nanopartícula mediante un grupo de enlace; (ii) la composición hemostática comprende un grupo protector, opcionalmente en donde el grupo protector está unido al agente hemostático mediante un grupo de enlace escindible, opcionalmente además en donde el método comprende además escindir el grupo de enlace escindible para liberar el agente hemostático del grupo protector en un lugar de acción diana en el sujeto; (iii) la composición hemostática comprende un agente de unión específico que se une específicamente a un lugar de acción diana en el sujeto; o (iv) el método comprende además el seguimiento de la composición hemostática en el sujeto, opcionalmente en donde el método comprende además la obtención de  
60 imágenes de la composición hemostática en el sujeto.

La invención también proporciona un método para fabricar una composición hemostática, comprendiendo el método unir covalentemente un polímero de polifosfato a la superficie de una nanopartícula. El método puede comprender además tratar térmicamente la nanopartícula. El método puede comprender además centrifugar la composición hemostática.

- 5 La invención también proporciona el método de fabricación de una composición hemostática como se describe en el presente documento, en donde (i) el polímero de polifosfato está unido covalentemente a la nanopartícula; (ii) la nanopartícula comprende una nanopartícula de sílice, opcionalmente en donde la nanopartícula de sílice comprende esferas de sílice o una espuma mesocelular; (iii) la nanopartícula comprende un material seleccionado del grupo  
 10 consistente en óxido de hierro, tierra de diatomeas, un aluminosilicato, un óxido de un metal de transición y dióxido de titanio; (iv) el polímero de polifosfato comprende 20 o más monómeros de fosfato; (v) el polímero de polifosfato comprende de 100 a 1500 monómeros de fosfato; (vi) el agente hemostático tiene una proporción de masa del polímero de polifosfato con respecto a las nanopartícula de 1:1 o mayor; (vii) el método comprende además la unión de un polipéptido a la nanopartícula, opcionalmente en donde el polipéptido comprende una enzima, opcionalmente  
 15 además en donde la enzima comprende trombina; o (viii) el método comprende además unir un polímero a la nanopartícula, opcionalmente en donde el polímero se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP) poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), polipropilenglicol, poli(carboxibetaína), poli(sulfobetaína), poli(metacrilato de carboxibetaína) (PCBMA), poloxámeros, ácido polilactónico, ácido hialurónico, celulosa, poliuretano, poli(acetato de etilenvinilo), silicona, ácido poliacrílico, polietileno, polipropileno, poliamida, poli(éster uretano), poli(éter uretano), poli(éster urea), poliéter, polivinilo, parileno, poli(hidroxibutilato), poli(carbonato de alquilo), poli(ortoéster), poliéster, poli(ácido hidroxivalérico), polidioxanona, poli(tereftalato de etileno), poli(ácido málico), poli(ácido tartárico), polianhídrido y polifosfoazeno, y copolímeros de los mismos. El polímero puede comprender PEG y puede tener opcionalmente una masa molecular promedio de 1000 Da o mayor.
- 25 La invención también proporciona una composición hemostática que comprende una cantidad hemostáticamente eficaz de un agente hemostático que comprende: (i) una nanopartícula que consiste en un núcleo de plata y una cubierta de sílice; y un polímero de polifosfato unido a la nanopartícula; o (ii) una nanopartícula que comprende poliestireno; y un polímero de polifosfato unido a la nanopartícula.

### 30 Breve descripción de los dibujos

- FIG. 1 muestra un gráfico del tamaño medio de partícula (nm) frente a la cantidad de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (%) añadido a una reacción para producir nanopartículas de sílice, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- 35 FIG. 2 muestra un gráfico del rendimiento (%) frente a la cantidad de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (%) añadido a una reacción para producir nanopartículas de sílice, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- FIG. 3 muestra un gráfico del valor R (min) frente a la concentración (mg/ml) de nanopartículas de sílice (SNP) y nanopartículas de sílice funcionalizadas con polímero de polifosfato (SNP-P70) (70 cadenas de longitud de monómero) a 37 °C y 10,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- 40 FIG. 4 muestra micrografías TEM de nanopartículas de sílice de tamaño medio de 55 nm, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- FIG. 5 muestra un gráfico del tiempo de coagulación, R, para SNP-P70 y factor de tejido lipidado (LTF) a diversas diluciones de plasma normal combinado (PNP) a 37 °C y  $\text{Ca}^{2+}$  10,8 mM, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- 45 FIG. 6 muestra un gráfico del tiempo de coagulación (R) para diversas condiciones usando plasma deficiente en FXII, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. SNP-P70 mostró el valor R más pequeño y más coherente. La última barra en el gráfico era un control que usaba factor de tejido lipidado (LTF) en plasma normal combinado (PNP).
- FIG. 7 muestra un gráfico del índice de coagulación (IC) para diversas afecciones usando plasma deficiente en FXII (un índice más alto indica un aumento de la coagulación), de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. SNP-P70 tuvo el valor de CI más alto y más coherente. La última barra en el gráfico era un control que usaba factor de tejido lipidado (LTF) en plasma normal combinado (PNP).
- 50 FIG. 8 muestra un gráfico del tiempo de coagulación, R, para varias relaciones diferentes de polifosfato (P700) a SNP (0,2, 0,4, 0,6 y 1), de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación.
- FIG. 9 muestra imágenes de microscopio de fluorescencia de un experimento de colorante de cumarina azul específico de trombina para determinar cualitativamente la respuesta del umbral de coagulación, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. FIG. 9 (izquierda) muestra una imagen del experimento del colorante de cumarina azul a tiempo 0 min, y la FIG. 9 (derecha) muestra una imagen del experimento del colorante de cumarina azul a los 20 minutos.
- 55 FIG. 10 muestra un gráfico de intensidad de fluorescencia (u.a.) frente al tiempo para diversas concentraciones de SNP y SNP-P70 (véase FIG. 10(a)), y un gráfico del tiempo de coagulación (tiempo medio, s) frente a la concentración (mg/ml) para SNP y SNP-P70 (véase FIG. 10(b)), de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- 60 FIG. 11(a) muestra un gráfico del tiempo de coagulación, R, (min.) frente al % de plasma normal combinado (PNP) para experimentos para determinar la actividad hemostática en muestras diluidas, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. FIG. 11(b) muestra un gráfico del tamaño del coágulo, MA, (mm) frente al % del plasma normal combinado (PNP), de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- 65

- FIG. 12(a) muestra un gráfico de fluorescencia frente al tiempo (s) para tiempos de generación de trombina de 100 % de plasma a 25 % de plasma (es decir, 100 % de plasma es 100 % de plasma y 0 % de diluyente) sin SNP-P70 añadido. FIG. 12(b) muestra un gráfico de fluorescencia frente a tiempo (s) para tiempos de generación de trombina en diversas condiciones de dilución para muestras con SNP-P70 añadido, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- 5 FIG. 13(a) muestra un gráfico del tiempo de coagulación, R, (min.) frente a temperatura (°C) para experimentos para determinar la actividad hemostática de SNP-P70 en condiciones hipotérmicas, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. FIG. 13(b) muestra un gráfico del índice de coagulación (IC) frente a la temperatura (°C) para SNP-P70 en condiciones hipotérmicas, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- 10 FIG. 14 muestra un esquema de una nanopartícula de sílice que incluye PEG unido a la nanopartícula mediante un grupo de enlace peptídico escindible que puede ser escindido por el Factor Xa, trombina u otras enzimas, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- FIG. 15 muestra un gráfico del tiempo de coagulación, R, frente a 3-aminopropil trietoxisilano (APTES) para proporción de SNP, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- 15 FIG. 16 muestra un gráfico del tiempo de coagulación, R, para SNP no funcionalizado y varios SNP funcionalizados (Pép: péptido; SPDP: 3-(2-Piridilditio)propionato de succinimidilo; PEG usado fue 2kDa), de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- FIG. 17 muestra gráficos de la dependencia del tamaño de las actividades procoagulantes de un polímero de fosfato (poliP), de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. Los datos se trazan como % de actividades máximas frente a la longitud del polímero de polímero de fosfato (polip).
- 20 FIG. 18 muestra un gráfico de la eficiencia de la conjugación de dendrímero-poliP a diferentes condiciones de pH, temperatura y tiempo, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- FIG. 19 muestra un gráfico de la estabilidad de poliP a 37 °C y varias condiciones de pH, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- 25 FIG. 20 muestra un gráfico de dendrímero que atraviesa las columnas Econo-Pac 10 DG, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. La fase de realización fue agua DI.
- FIG. 21 muestra un gráfico de dendrímero que atraviesa las columnas Econo-Pac 10 DG, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. La fase de ejecución fue tampón ácido de borato 25 mM a pH 9.
- 30 FIG. 22 muestra un gráfico de dendrímero-poliP que atraviesa las columnas Econo-Pac 10 DG, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. La fase de ejecución fue tampón ácido de borato. La lectura era para dendrímero.
- FIG. 23 muestra un gráfico de dendrímero-poliP que atraviesa las columnas Econo-Pac 10 DG, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. La fase de ejecución fue tampón ácido de borato. La fase de ejecución fue tampón ácido de borato. La lectura fue para poliP.
- 35 FIG. 24 muestra un gráfico de dendrímero-poliP que atraviesa las columnas empaquetadas en gel BG P-10, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. La fase de ejecución fue LiCl 1M. La lectura era para dendrímero.
- FIG. 25 muestra un gráfico de dendrímero-poliP que atraviesa las columnas empaquetadas en gel BG P-10, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. La fase de ejecución fue LiCl 1M. La lectura fue para PoliP.
- 40 FIG. 26 muestra un gráfico de la concentración de PoliP antes y después del ensayo *glass milk* realizado en dos reacciones anteriores, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- FIG. 27 muestra un gráfico de la concentración de amina primaria y PoliP antes y después del ensayo de separación con *glass milk*, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- 45 FIG. 28 muestra un gráfico de un ensayo de coagulación sanguínea para la conjugación Dendrímero-PoliP, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- FIG. 29 muestra un gráfico de la conjugación PS-poliP, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. Las condiciones de reacción fueron a temperatura ambiente, pH 4, y 24 horas.
- FIG. 30 muestra un gráfico de la cantidad de amina expuesta en la superficie de las partículas de PS a pH 4, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- 50 FIG. 31 muestra un gráfico de la concentración de amina primaria de 24 y 48 horas de una reacción de ligando poliP frente a control en condiciones sin EDAC (1-etil-3- [3-dimetilamino]propil]carbodiimida), de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- FIG. 32 muestra una curva de calibración de la concentración de amina primaria a longitudes de onda de excitación y emisión de 410 y 480 nm, respectivamente, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- 55 FIG. 33 muestra un gráfico de la concentración de amina primaria después de que el ligando de amina-tiol reaccionara con poliP, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- FIG. 34A muestra la mezcla de ligando de nanopartículas de oro antes de la centrifugación, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. FIG. 34B muestra microgránulos de partículas de oro después de la centrifugación, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- 60 FIG. 35A y 35B muestran un esquema de la síntesis de nanopartículas de sílice basada en PLGA, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. Como se muestra en la FIG. 35A, las muestras se insertan en el canal de dispersión. El canal de entrada contiene sílice sol-gel, que precipita en contacto con los medios para formar nanopartículas esféricas. FIG. 35B muestra una vista lateral del esquema, que ilustra cómo se forman las nanopartículas esféricas. Los tamaños de partícula para PLGA promediaron aproximadamente 125 nm.
- 65 FIG. 36 muestra un gráfico de potenciales zeta de FMSnf, FMS-nf cargado con poliP, y FMS-nf cargado con partículas APTES, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 37 muestra imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de nanopartículas de sílice (NP), por ejemplo, espuma mesocelular, preparada usando el sistema PLGA, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. El diámetro medio de partícula fue de 125 +/- 25 nm según se determinó por dispersión dinámica de luz. La naturaleza conjunta de las partículas separadas se produjo debido a la pulverización catódica de imágenes SEM.

FIG. 38 muestra un gráfico de distribución del tamaño de poro de la rama de desorción calculada de las espumas mesocelulares por el método BJH, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 39 muestra un gráfico de la distribución del tamaño de poro de la rama de desorción calculada de sílice porosa por el método BJH, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 40 muestra imágenes SEM de TiO<sub>2</sub> sintetizado mediante la ruta del ácido fosfórico, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. La naturaleza conjunta de las partículas separadas se produjo debido a la pulverización catódica de imágenes SEM.

FIG. 41 muestra un espectro FT-IR de nanopartículas de titanina no modificadas y modificadas por APTES, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. Las bandas de C-H, N-H, y Si-O-Si indicaron una unión exitosa de APTES a moléculas de TiO<sub>2</sub>.

FIG. 42 muestra un gráfico de titulación de potencial zeta de nanopartículas de titanina modificadas y no modificadas, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 43, izquierda, muestra imágenes de la captación de varias muestras por HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana), con una concentración de Ag NP de 10 µg/ml; Concentración de caolín de 10 µg/ml; y concentración de MCF-26 de 100 µg/ml. FIG. 43, derecha, muestra imágenes de la captación de varias muestras por HDF, con una concentración de Ag NP de 20 µg/ml; Concentración de caolín de 20 µg/ml; y concentración de MCF-26 de 100 µg/ml.

FIG. 44 muestra un mecanismo para unir trombina a sílice sólida usando un reticulador de proteínas, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 45 muestra un flujo de trabajo del proceso y una imagen de un ensayo colorimétrico con detección de tior para verificar la desprotección de hidroxilamina de nanopartículas de sílice sólidas, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 46 muestra un gráfico del tiempo de coagulación (R, min) frente al tamaño de partícula (nm) de nanopartículas de sílice a una concentración de 0,68 mg/ml, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. Condiciones experimentales: 37 °C, Ca<sup>2+</sup> 22 mM.

FIG. 47 muestra un gráfico del tiempo de coagulación (R, min) frente a la concentración final (mg/ml) de nanopartículas de sílice de 55 nm de tamaño en el TEG, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. 0,68 a 1,35 mg/ml se consideró óptimo, con el umbral siendo ~0,5 mg/ml. Condiciones experimentales: 37 °C, Ca<sup>2+</sup> 11 mM.

FIG. 48 muestra un gráfico del tamaño de partícula y el índice de polidispersidad (PDI) frente a la concentración de las nanopartículas de sílice, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. Las partículas fueron estables en todo el intervalo de concentraciones experimentales. Condiciones experimentales: 20 °C, pH 6,8.

FIG. 49 muestra un gráfico del tiempo de coagulación (R, min) frente a la concentración de nanopartículas de sílice con y sin polifosfato, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. Condiciones experimentales: 37 °C, relación de peso SiO<sub>2</sub>:P-70 = 1:1, 116 nm, Ca<sup>2+</sup> 11 mM.

FIG. 50 muestra un gráfico de la relación entre el potencial zeta y el pH para las partículas de sílice recubiertas con APTES, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. Condiciones experimentales: 20 °C, 12,5 mg/ml, 112 nm de diámetro, el lote contenía partículas con bajo contenido de amina.

FIG. 51 muestra un gráfico del tiempo de coagulación (R, min) de las partículas de sílice recubiertas con APTES, con y sin PEGilación de amina, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. Delta R fue óptimo en la densidad baja de amina. Condiciones experimentales: 37 °C, 1,35 mg/ml, 112 nm.

FIG. 52 muestra un gráfico de los efectos de las nanopartículas de poliP45-Au (10 nm) en el tiempo de coagulación mediado por Factor Xa, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. La concentración de fosfato se mantuvo a 9,8 µM.

FIG. 53 muestra un gráfico del tiempo de coagulación frente a la concentración de polifosfato, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. La concentración de nanopartículas fue de 12,9 nM.

FIG. 54 muestra micrografías TEM de SNP de ~55 nm de tamaño, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 55 muestra un gráfico del tamaño de partícula de SNP basado en % NH<sub>4</sub>OH añadido, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 56 muestra un gráfico de rendimiento de sílice basado en % NH<sub>4</sub>OH añadido, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 57 muestra micrografías TEM de Ag@SNP y un esquema de la partícula: núcleo de plata (Ag) y cubierta de sílice (SiO<sub>2</sub>), de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 58 muestra un gráfico del tiempo de coagulación (R, min) frente a la concentración de reserva (mg/ml) de las nanopartículas de sílice de diferentes tamaños, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. 50 mg/ml corresponden a 1,35 mg/ml en una taza de TEG. Condiciones experimentales: 37 °C, Ca<sup>2+</sup> 11 mM.

FIG. 59 (a) muestra un gráfico del tiempo de coagulación de SNP con y sin polifosfato (P70) en función de la concentración; y la FIG. 59 (b) muestra un gráfico del tiempo de coagulación de diferentes muestras, incluyendo SNP, SNP-P70 y caolín, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 60 muestra un gráfico del tiempo de coagulación (R) para diversas condiciones usando plasma deficiente en

- FXII, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. SiO<sub>2</sub>-P70 tenía el valor R más pequeño y más coherente. La última barra fue un control usando plasma normal combinado.
- FIG. 61 muestra un gráfico del Índice de coagulación (IC) para diversas afecciones usando plasma deficiente en FXII, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. SiO<sub>2</sub>-P70 tenía el valor de CI más alto y más coherente. La última barra fue un control usando plasma normal combinado.
- 5 FIG. 62 muestra un gráfico del tiempo de coagulación (R) frente a APTES/SNP (μl/g) para APTES, 5k PEG y 20k PEG SNP, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- FIG. 63 muestra un esquema de FXa (que se encuentra en el sitio de la herida) que reconoce la secuencia de péptidos (IEGR) y separa el PEG del TSP para activar selectivamente la coagulación, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- 10 FIG. 64 muestra un gráfico de tiempos de coagulación de partículas de sílice funcionalizadas, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. (Pé: péptido, PEG usado es 2k).
- FIG. 65 muestra un gráfico del tiempo de coagulación (R) de varias síntesis de titania anatasa a diferentes concentraciones de reserva, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. Condiciones experimentales: 37 °C, Ca<sup>2+</sup> 11 mM.
- 15 FIG. 66 muestra un gráfico de tiempos de coagulación de TNP con y sin polifosfato (P70) a una concentración de 100 mg/ml (reserva), de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- FIG. 67 muestra un gráfico de tiempos de coagulación para TNP PEGilado, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- 20 FIG. 68 muestra un gráfico de la hidrólisis dependiente del pH del enlace P-N del conjugado de poliP-cistamina, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- FIG. 69 muestra gráficos de los datos de coagulación para las partículas de oro presentadas en la Tabla 8 cuando se analiza la capacidad de activar la ruta de contacto, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- 25 FIG. 70 muestra imágenes de: (Izquierda) Experimento de colorante de cumarina azul a tiempo 0 min; y (Derecha) experimento de cumarina azul a tiempo 20 min, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- FIG. 71 muestra una imagen de electroforesis en gel de poli(acrilamida) (PAGE) del material adquirido durante el transcurso del tiempo de hidrólisis con LiCl no tamponado, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- 30 FIG. 72 muestra una imagen del material PAGE adquirido durante el transcurso del tiempo de hidrólisis con LiCl alcalino, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- FIG. 73 muestra una imagen de PAGE de poliP de alto rendimiento fraccionado por tamaño, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- 35 FIG. 74 muestra gráficos de distribución de tamaños de nanopartículas de oro medidas por DLS, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. La relación molar de citrato a oro fue (A) 4:1 (B) 3:1 y (C) 1:1.
- FIG. 75A y FIG. 75B muestran esquemas del proceso de síntesis de nanopartículas de oro conjugadas con poliP, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. FIG. 75A muestra poliP conjugado con cistamina, y FIG. 75B muestra poliP-cistamina unida a la superficie de nanopartículas de oro.
- 40 FIG. 76 muestra un esquema de la determinación del radio mínimo y máximo basado en la geometría de una centrifuga, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- FIG. 77 muestra un gráfico de la actividad de coagulación acumulativa para nanopartículas de poliP45-oro de 10 nm, 15 nm, y 50 nm (consulte la Tabla 13 para obtener información de muestra), de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- 45 FIG. 78 muestra un gráfico de la actividad de coagulación acumulativa para nanopartículas de poliP70-oro de 10 nm, 15 nm, y 50 nm (consulte las Tablas 14 y 15 para obtener información de muestra), de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- FIG. 79 muestra un gráfico de activación de la ruta de contacto de nanopartículas de poliP70-50 nm oro (consulte la Tabla 14 para obtener información de la muestra) a una concentración constante de partículas de oro, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- 50 FIG. 80 muestra los datos de activación de la ruta de contacto para nanopartículas de poliP70-50 nm oro (consulte la Tabla 14 para obtener información de la muestra) a una concentración constante de fosfato, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- FIG. 81 muestra los datos de activación de la ruta de contacto para las nanopartículas de poliP70-Peg (3:1)-50 nm oro (consulte la Tabla 15 para obtener información de muestra) a una concentración constante de nanopartículas de oro, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- 55 FIG. 82 muestra un gráfico de mediciones fluorescentes para la inducción de la ruta de contacto con poliP45 acuoso usando un sustrato de trombina fluorogénica, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.
- FIGS. 83A-83D muestran el montaje y desmontaje de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre PAAc y PAAm, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. FIG. 83A muestra una representación esquemática. FIG. 83B muestra una imagen de PAAc y las soluciones acuosas de PAAm se mezclaron completamente a 20 °C. FIG. 83C muestra una imagen de una mezcla que se calentó a 40 °C. FIG. 83D muestra una imagen de una solución que se enfrió nuevamente a 20 °C.
- 60 FIGS. 84A y 84B muestran esquemas del proceso de síntesis de nanopartículas de oro conjugadas con los polímeros termosensibles, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. FIG. 84A muestra una reacción para la conjugación de PAAc o PAAm con cistamina o DDA. FIG. 84B muestra PAAc-cistamina o
- 65

PAAm-DDA unidas a la superficie de nanopartículas de oro.

FIG. 85 muestra un gráfico de la distribución de tamaños de las nanopartículas después de mezclar PAAc\_10nm\_poliP (13) con PAAm\_10nm\_poliP (13) en una relación 1:1 a 25 °C, 33 °C y 37 °C, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

5 FIG. 86 muestra un gráfico de la distribución de tamaños de las nanopartículas después de mezclar PAAc\_10nm\_poliP (11) con PAAm\_10nm\_poliP (11) en una relación 1:1 a 25 °C y 37 °C, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 87 muestra un gráfico del tamaño de partícula de SNP basado en % de NH<sub>4</sub>OH añadido, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

10 FIG. 88 muestra un gráfico de rendimiento de sílice basado en % NH<sub>4</sub>OH añadido, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 89 muestra un gráfico del tiempo de coagulación para SNP-P70, que tuvo un tiempo de coagulación más corto (R, min) a la mitad de la concentración que la sílice desnuda, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. Condiciones experimentales: 37 °C, Ca<sup>2+</sup> 11 mM.

15 FIG. 90 muestra un gráfico del tiempo de coagulación para diversas relaciones de P700:SNP (0,2, 0,4, 0,6 y 1), de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 91 muestra un gráfico de intensidad de fluorescencia en el tiempo, que muestra que SNP-P70 generó trombina más rápido que SNP, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

20 FIG. 92 muestra un gráfico de los mismos datos de fluorescencia que en la FIG. 91, presentado en términos de tiempo de coagulación.

FIG. 93 muestra un gráfico de tiempos de generación de trombina desde 100 % de plasma hasta 25 % de plasma; es decir: 100 % es 100 % de plasma y 0 % de diluyente, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

25 FIG. 94 muestra un gráfico de fluorescencia en el tiempo, lo que indicaba que la adición de SNP-P70 generaba trombina rápidamente incluso bajo dilución plasmática severa, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 95 muestra un gráfico del tiempo de coagulación frente a temperatura, que indicó que TSP de SNP-P70 comenzaban con los coágulos más rápido bajo hipotermia, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

30 FIG. 96 muestra un gráfico del índice de coagulación (IC) frente a la temperatura, que indicó que SNP-P70 mejoró la formación de coágulos en comparación con el factor de tejido lipidado (LTF), de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 97 muestra un gráfico de tiempos de coagulación para varios SNP, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. FIG. 98 muestra un gráfico de la relación entre el potencial zeta y el tiempo de coagulación para SNP con y sin APTES, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

35 FIG. 99 muestra un gráfico del potencial zeta frente a la relación APTES/TEOS usada en la síntesis de SNP, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 100 muestra un gráfico del potencial zeta frente a la relación APTES/TEOS para SNP calcinados y no calcinados, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

40 FIG. 101 muestra un gráfico del tiempo de coagulación frente al potencial zeta para SNP calcinados y no calcinados, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 102 muestra un esquema del polifosfato "corona", según realizaciones de la presente divulgación. El polifosfato cubre la superficie de nanopartículas, haciendo que el polifosfato sea el único agente activo.

45 FIG. 103 muestra un gráfico del potencial zeta frente a las cuentas totales para SNP funcionalizado solo con APTES (arriba) y SNP funcionalizado con poliP "corona" (abajo), de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 104 muestra un gráfico del tiempo de coagulación frente al agente usado, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. LTF significa factor de tejido lipidado. NP significa SNP-poliP "corona".

50 FIG. 105 muestra un gráfico de distribución de tamaño frente a intensidad para la nanopartícula SNP-poliP "corona", de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 106 muestra un gráfico del tiempo de coagulación frente al mecanismo de entrega de SNP-poliP "corona" sintetizada mediante la formación de éster, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. De izquierda a derecha, las partículas fueron suspendidas en agua (H<sub>2</sub>O), solución de fosfolípidos (PL), solución de fosfolípidos y factor de tejido lipidado (PL+LTF) y con factor de tejido lipidado solo en agua (solo LTF).

55 FIG. 107 muestra una imagen TEM de nanopartículas de óxido de hierro sintetizadas con oleilamina, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 108 muestra un gráfico del potencial zeta frente a las cuentas totales de nanopartículas de óxido de hierro desnudo y nanopartículas de óxido de hierro cubiertas con poliP usando un enlace éster, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

60 FIG. 109 muestra un gráfico de tiempos de coagulación que compara nanopartículas de óxido de hierro desnudo con nanopartículas de óxido de hierro con recubrimiento de PoliP a diferentes concentraciones, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 110 muestra un gráfico del potencial zeta frente a las cuentas totales de nanopartículas de óxido de hierro funcionalizadas con PAAc, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

65 FIG. 111 muestra un gráfico de tiempos de coagulación que compara nanopartículas de óxido de hierro con tapa de PAA y plasma recalcificado (sin agente), de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

FIG. 112 muestra un gráfico de tiempos de coagulación que compara las partículas de SNP protegidas con poliP 1 semana después de la síntesis con las mismas partículas después de 9 meses para mostrar la estabilidad de la partícula a temperatura y presión ambiente estándar, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

## 5 Definiciones

Un "agente hemostático" se refiere a un agente que promueve la coagulación sanguínea, por ejemplo, después de la administración al sitio de hemorragia (por ejemplo, una herida externa o interna). Los agentes hemostáticos incluyen, por ejemplo, materiales inorgánicos (por ejemplo, nanopartículas de sílice, polifosfato, y similares, como se describe en el presente documento), así como iones biológicamente activos (por ejemplo, iones que actúan como cofactores en la cascada de coagulación (por ejemplo, sirviendo como puente iónico)), y/o precipitación coloidal facilitada (por ejemplo, precipitación de glóbulos rojos), proteínas del factor de coagulación (por ejemplo, trombina, etc.), combinaciones de los mismos y similares.

Una "composición hemostática" se refiere a una composición que incluye al menos un agente hemostático. Una composición hemostática puede incluir además uno o más componentes adicionales, que puede ser hemostáticamente activa (por ejemplo, promover la coagulación sanguínea o promover la actividad del agente hemostático en la composición hemostática en la coagulación sanguínea). Las composiciones hemostáticas también pueden contener agentes que son hemostáticamente inertes.

El término "hemostasia" como se usa en el presente documento se refiere a la inhibición del sangrado, incluyendo la parada del sangrado, que va acompañada por formación de coágulos sanguíneos.

Una "cantidad hemostáticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una composición hemostática que, después de aplicación a un sitio de hemorragia, es eficaz para facilitar la coagulación de la sangre (por ejemplo, en comparación con el tiempo de formación de coágulos en ausencia del agente hemostático), aumentar la velocidad de coagulación sanguínea en comparación con una velocidad de coagulación sanguínea en ausencia del agente hemostático, y/o mejorar la resistencia a la coagulación sanguínea en comparación con la fuerza de coagulación sanguínea en ausencia del agente hemostático. La fuerza del coágulo se puede medir mediante mediciones de Thrombelastograph® (TEG). En la técnica se conocen ensayos para evaluar la actividad hemostática, con métodos ejemplares descritos en el presente documento.

El término "aislado" significa que el compuesto está presente en un entorno diferente al que se encuentra en la naturaleza. "Aislado" pretende incluir compuestos que están dentro de muestras que están sustancialmente enriquecidas para el compuesto de interés y/o en donde el compuesto de interés está purificado parcial o sustancialmente.

Como se usa en el presente documento, el término "purificado" se refiere a un compuesto que se elimina de su entorno natural y está libre al menos en un 60 %, tal como 75 % o más libre, o el 90 % o más libre de otros componentes con los que está naturalmente asociado.

Los términos "individuo", "sujeto", "huésped" y "paciente", que se usan de manera indistinta en el presente documento, se refieren a cualquier sujeto que necesite tratamiento, por ejemplo, mamíferos, incluyendo, aunque no de forma limitante, seres humanos, simios, felinos, caninos, equinos, bovinos, animales de granja mamíferos, animales deportivos mamíferos y mascotas mamíferas. Los sujetos humanos que necesitan tratamiento son de interés.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud. A menos que se indique específicamente de otra manera, "polipéptido", "péptido" y "proteína" pueden incluir aminoácidos genéticamente codificados y no codificados, aminoácidos modificados o derivatizados químicamente o bioquímicamente y polipéptidos que tienen cadenas principales peptídicas modificadas. El término incluye proteínas de fusión, incluyendo, aunque no de forma limitante, proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heteróloga, fusiones con secuencias líder heterólogas y homólogas, proteínas que contienen al menos un resto de metionina N-terminal (por ejemplo, para facilitar la producción en una célula hospedadora bacteriana recombinante); proteínas marcadas inmunológicamente; y similares.

Antes de describir adicionalmente la presente invención, ha de comprenderse que la presente invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, ya que pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento únicamente tiene el fin de describir realizaciones particulares y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, al décimo de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor declarado o intermedio en el intervalo indicado, está comprendido dentro de la

invención. Pueden incluirse independientemente los límites superiores e inferiores de estos intervalos más pequeños y también se incluyen en la presente invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en la invención.

5 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Aunque también pueden usarse en la puesta en práctica o el ensayo de la presente invención cualesquier métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

15 Cabe destacar que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "y" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, La referencia a "un agente hemostático" incluye una pluralidad de tales agentes y la referencia a "el agente hemostático" incluye referencia a uno o más agentes y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, etc. Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta afirmación pretende servir como fundamento para el uso de dicha terminología excluyente tal como "solamente", "solo" y similares en relación con la cita de los elementos de las reivindicaciones o para el uso de una limitación "negativa". Además, cualquier elemento de la divulgación mencionado positivamente proporciona una base para una limitación negativa para excluir ese elemento de las reivindicaciones.

20 Las publicaciones discutidas en el presente documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. No ha de interpretarse que nada en el presente documento constituya una admisión de que la presente invención no tenga derecho a anteponer dicha publicación por virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar su confirmación independientemente.

#### Descripción detallada

30 Las realizaciones de la presente divulgación se refieren a composiciones hemostáticas que incluyen una cantidad hemostáticamente eficaz de un agente hemostático que incluye una nanopartícula y un polímero de polifosfato unido a la nanopartícula para usar en un método para promover la coagulación sanguínea.

#### **AGENTES HEMOSTÁTICOS**

35 Los aspectos de la presente divulgación incluyen agentes biológicamente activos configurados para promover la coagulación sanguínea. Estos agentes hemostáticos incluyen una nanopartícula y un polímero de polifosfato unido a la nanopartícula. Por "nanopartícula" se entiende una partícula que tiene dimensiones en la escala nanométrica, tales como dimensiones de 1000 nm o menos, como 750 nm o menos, incluyendo 500 nm o menos, o 250 nm o menos, o 200 nm o menos, o 150 nm o menos, o 100 nm o menos, o 50 nm o menos, o 40 nm o menos, o 30 nm o menos, o 25 nm o menos, o 20 nm o menos, o 15 nm o menos, o 10 nm o menos, o 5 nm o menos. En algunos casos, la nanopartícula tiene dimensiones de 100 nm o menos. El término "promedio" como se usa en el presente documento pretende ser la media aritmética.

45 En ciertas realizaciones, la nanopartícula tiene forma esférica, aunque en otras realizaciones, también se pueden incluir otras formas de nanopartícula. Por ejemplo, algunas realizaciones de la nanopartícula tienen una forma tal como, aunque no de forma limitante, un elipsoide, una varilla, un cono, un cubo, un cuboide (por ejemplo, una caja rectangular), una pirámide, una forma irregular, etc. En determinados casos, se pueden incluir combinaciones de diferentes formas de nanopartículas. Como se ha indicado anteriormente, la nanopartícula puede tener una forma sustancialmente esférica y, por lo tanto, puede tener dimensiones medidas como un diámetro de la esfera, como un diámetro promedio de 1000 nm o menos, como 750 nm o menos, incluyendo 500 nm o menos, o 250 nm o menos, o 200 nm o menos, o 150 nm o menos, o 100 nm o menos, o 50 nm o menos, o 40 nm o menos, o 30 nm o menos, o 25 nm o menos, o 20 nm o menos, o 15 nm o menos, o 10 nm o menos, o 5 nm o menos. En algunos casos, una nanopartícula sustancialmente esférica tiene un diámetro promedio de 100 nm o menos.

55 En ciertas realizaciones, la nanopartícula no es porosa. Por "no poroso" se entiende que la nanopartícula es sustancialmente sólida, tal que la superficie accesible (por ejemplo, superficie accesible al disolvente, tal como una superficie exterior de la partícula con la que puede contactarse un fluido circundante) de la nanopartícula es la superficie exterior de la nanopartícula. En algunos casos, una nanopartícula no porosa no tiene poros expuestos en la superficie de la nanopartícula. En otras realizaciones, la nanopartícula es porosa. Una nanopartícula porosa puede tener uno o más poros expuestos en la superficie de la nanopartícula, de manera que la superficie accesible de la nanopartícula incluye la superficie exterior de la nanopartícula y las superficies interiores de uno o más poros dentro de la nanopartícula. En determinados casos, una nanopartícula porosa tiene un área de superficie accesible mayor que una nanopartícula no porosa de la misma forma y dimensiones promedio.

65 El tamaño de poro de una nanopartícula porosa se puede seleccionar para proporcionar la actividad deseada

promotora de coágulos (por ejemplo, tasa de coagulación, tiempo de coagulación, fuerza del coágulo, etc.). El tamaño promedio del poro generalmente se determina mediante el cálculo BET-BJH de datos de isoterma de desorción/adsorción de N<sub>2</sub>. En algunas realizaciones, el tamaño promedio del poro de una nanopartícula porosa varía de 1 a 100 nm, Tal como de 1 nm a 75 nm, incluyendo 1 nm a 50 nm, o 5 nm a 50 nm, o 5 nm a 40 nm, o 5 nm a 30 nm, o 10 nm a 30 nm. En determinados casos, El tamaño medio del poro de la nanopartícula porosa es de 10 nm a 30 nm. En algunas realizaciones, la nanopartícula porosa tiene un tamaño de poro promedio de 1 nm o más, tal como 5 nm o más, incluyendo 10 nm o más, o 15 nm o más, o 20 nm o más, o 25 nm o más, o 30 nm o más, o 35 nm o más, o 40 nm o más, o 45 nm o más, o 50 nm o más, con la condición de que el tamaño de poro promedio sea de 100 nm o menos. En ciertas realizaciones, la nanopartícula porosa tiene un tamaño de poro promedio de 10 nm o más. En algunas realizaciones, la nanopartícula porosa puede tener un tamaño de poro promedio de 50 nm o menos, como 45 nm o menos, incluyendo 40 nm o menos, o 35 nm o menos, o 30 nm o menos, o 25 nm o menos, o 20 nm o menos, o 15 nm o menos, o 10 nm o menos, o 5 nm o menos, o 1 nm o menos. En ciertas realizaciones, la nanopartícula porosa puede tener un tamaño de poro promedio de 30 nm o menos.

En ciertas realizaciones, la nanopartícula está compuesta de un óxido de silicio, aluminio, un metal de transición (por ejemplo, titanio, circonio, y similares), aluminosilicato, o combinación de los mismos. Los materiales ejemplares para la nanopartícula incluyen, pero sin limitación, dióxido de silicio (por ejemplo, sílice), dióxido de titanio, óxido de silicio-aluminio, óxido de aluminio, óxido de hierro, polímeros (por ejemplo, poliestireno), metales (por ejemplo, oro) y similares. En algunos casos, La nanopartícula está compuesta de otros materiales inorgánicos, tal como, aunque no de forma limitante, tierra de diatomeas, hidroxiapatita cálcica, y similares. También se pueden incluir combinaciones de los materiales anteriores.

En ciertas realizaciones, la nanopartícula es una nanopartícula tratada térmicamente. Por ejemplo, la nanopartícula puede tratarse a alta temperatura, como en un proceso de calcinación. En algunos casos, Las nanopartículas se tratan (por ejemplo, se calcinan) a una temperatura de 200 °C o más, como 250 °C o más, o 300 °C o más, o 350 °C o más, o 400 °C o más, o 450 °C o más, o 500 °C o más, o 550 °C o más, o 600 °C o más, o 650 °C o más, o 700 °C o más, o 750 °C o más. En ciertas realizaciones, Las nanopartículas son tratadas (por ejemplo, se calcinan) a una temperatura de 250 °C. En ciertas realizaciones, Las nanopartículas se tratan (por ejemplo, se calcinan) a una temperatura de 550 °C. En ciertas ocasiones, el tratamiento térmico de las nanopartículas facilita una reducción en el potencial zeta de las nanopartículas. En algunos casos, un agente hemostático con un potencial zeta más bajo ha aumentado la actividad hemostática. En algunos casos, el agente hemostático tiene un potencial zeta de 0 mV o menos, tal como -1 mV o menos, o -5 mV o menos, o -10 mV o menos, o -15 mV o menos, o -20 mV o menos, o -25 mV o menos, o -30 mV o menos. En ciertas realizaciones, el agente hemostático tiene un potencial zeta de -15 mV o menos.

En ciertas realizaciones, la nanopartícula puede tener actividad hemostática, tal que la nanopartícula promueva la coagulación de la sangre (por ejemplo, en comparación con la coagulación de la sangre en ausencia del agente hemostático). Como tal, una nanopartícula con actividad hemostática puede describirse como hemostáticamente eficaz. Por ejemplo, sin limitarse a ninguna teoría particular, la nanopartícula puede tener una carga superficial negativa en el fluido corporal (por ejemplo, sangre), que puede facilitar la activación de la cascada de coagulación activando el Factor XII. La promoción de la coagulación de la sangre puede describirse por uno o más de los siguientes factores: (1) reducción del tiempo inicial para la formación de coágulos sanguíneos (R, min); (2) aumento de la velocidad de formación de coágulos ( $\alpha$ , grados); (3) aumento de la fuerza del coágulo o amplitud máxima (MA, mm); y (4) reducción en el tiempo hasta que el coágulo alcance 20 mm (K, min).

Como se ha descrito anteriormente, en ciertas realizaciones, el agente hemostático incluye un polímero de polifosfato (poliP) unido a la nanopartícula. En determinados casos, el polímero de polifosfato es hemostáticamente eficaz para promover la coagulación sanguínea (por ejemplo, en comparación con la coagulación sanguínea en ausencia del agente hemostático). Por ejemplo, sin limitarse a ninguna teoría particular, el polímero de polifosfato puede facilitar la activación de la cascada de coagulación a través de la activación del Factor Xa. Como tal, el polímero de polifosfato puede facilitar la coagulación de la sangre mediante la activación de una diana diferente (por ejemplo, enzima o zimógeno) en la cascada de coagulación que la nanopartícula.

En algunos casos, un agente hemostático que incluye un polímero de polifosfato unido a una nanopartícula tiene una mayor actividad hemostática que la propia nanopartícula. Por ejemplo, un agente hemostático que incluye un polímero de polifosfato unido a una nanopartícula puede tener un tiempo de coagulación, R, (por ejemplo, tiempo hasta que se detecta la primera evidencia de un coágulo) medido por una trombelastografía que es menor que el tiempo de coagulación de la propia nanopartícula. En algunos casos, un agente hemostático que incluye un polímero de polifosfato unido a una nanopartícula tiene un tiempo de coagulación, R, de 15 min o menos, tal como 10 min o menos, o 5 min o menos, o 4,5 min o menos, o 4 min o menos, o 3,5 min o menos, o 3 min o menos, o 2,5 min o menos, o 2 min o menos, o 1,5 min o menos, o 1 min o menos, o 0,5 min o menos. En algunas realizaciones, un agente hemostático que incluye un polímero de polifosfato unido a una nanopartícula tiene un tiempo de coagulación, R, de 3 min o menos. En algunas realizaciones, un agente hemostático que incluye un polímero de polifosfato unido a una nanopartícula tiene un tiempo de coagulación, R, de 2,5 min o menos. En algunas realizaciones, un agente hemostático que incluye un polímero de polifosfato unido a una nanopartícula tiene un tiempo de coagulación, R, de 2 min o menos. En algunas realizaciones, un agente hemostático que incluye un

polímero de polifosfato unido a una nanopartícula tiene un tiempo de coagulación, R, de 1,5 min o menos. En algunas realizaciones, un agente hemostático que incluye un polímero de polifosfato unido a una nanopartícula tiene un tiempo de coagulación, R, de 1 min o menos.

- 5 En ciertas realizaciones, un agente hemostático que incluye un polímero de polifosfato unido a una nanopartícula tiene una mayor actividad hemostática que el propio polímero de polifosfato. Por ejemplo, un agente hemostático que incluye un polímero de polifosfato unido a una nanopartícula puede tener un tiempo de coagulación, R, (como se describió anteriormente) que es menor que el tiempo de coagulación del propio polifosfato. En algunos casos, un agente hemostático que incluye un polímero de polifosfato unido a una nanopartícula puede promover la coagulación
- 10 sanguínea con una longitud de polímero de polifosfato más corta en comparación con el polifosfato solo (es decir, un polímero de polifosfato libre). Por ejemplo, un agente hemostático que incluye un polímero de polifosfato corto (por ejemplo, 100 meros o menos, tal como 70 meros) unido a una nanopartícula puede producir una reducción significativa del tiempo de coagulación en comparación con un polímero de polifosfato corto solo. En algunos casos, el tiempo de coagulación de un agente hemostático que incluye un polímero de polifosfato corto (por ejemplo, 100
- 15 meros o menos, tal como 70 meros) unido a una nanopartícula puede ser menor o igual que el tiempo de coagulación de un polímero de polifosfato largo (por ejemplo, 500 meros o mayor) solo.

El polímero de polifosfato puede estar compuesto de dos o más monómeros de fosfato unidos entre sí para formar el polímero de polifosfato. Por ejemplo, el polímero de polifosfato puede incluir 2 o más monómeros, tal como 5 o más,

20 incluyendo 10 o más, o 20 o más, o 30 o más, o 40 o más, o 50 o más, o 60 o más, o 70 o más, u 80 o más, o 90 o más, o 100 o más, o 150 o más, o 200 o más, o 250 o más, o más, o 300 o más, o 400 o más, o 500 o más, o 600 o más, o 700 o más, u 800 o más, o 900 o más, o 1000 o más, o 1100 o más, o 1200 o más, o 1300 o más, o 1400 o más, o 1500 o más monómeros de fosfato. En determinados casos, la composición de polímero de polifosfato incluye un promedio de 70 monómeros de fosfato por polímero. En otras realizaciones, la composición de polímero

25 de polifosfato incluye un promedio de 700 monómeros de fosfato por polímero. También se pueden incluir combinaciones de polímeros de fosfato de diferentes tamaños. Por ejemplo, la composición de polímero de polifosfato puede tener de 2 a 200 monómeros de fosfato por polímero, tal como de 5 a 200, incluyendo de 10 a 200, o de 10 a 150, o de 10 a 100, de 20 a 100, o de 30 a 100, o de 40 a 100, o de 50 a 100 monómeros de fosfato por polímero. En otros casos, la composición de polímero de polifosfato puede tener de 100 a 1500 monómeros de fosfato por polímero, tal como de 100 a 1400, o de 100 a 1300, o de 200 a 1300 monómeros de fosfato por polímero.

30

En ciertas realizaciones, el polímero de polifosfato está unido a la nanopartícula. Por ejemplo, el polímero de polifosfato puede estar adsorbido en la superficie de la nanopartícula. La interacción de unión puede basarse en una o más de una variedad de interacciones de unión entre el polímero de polifosfato y la nanopartícula, tales como, pero

35 sin limitación, enlaces covalentes, enlaces iónicos, interacciones electrostáticas, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals (p. ej., fuerzas de dispersión de London), interacciones dipolo-dipolo, combinaciones de las mismas, y similares. El polímero de polifosfato se puede unir a la nanopartícula mediante un grupo de enlace entre la superficie o poros de la nanopartícula y el polímero de polifosfato. Las interacciones de unión pueden ser sustancialmente permanentes (por ejemplo, requieren una cantidad relativamente grande de energía para superar la interacción de unión, como con enlaces covalentes) o puede ser reversible (por ejemplo, requiere una cantidad relativamente baja de energía para interrumpir la interacción de unión, como con las interacciones dipolo-dipolo). Por ejemplo, el polímero de polifosfato puede unirse a la nanopartícula a través de un enlace fosforamidado, enlace éster, enlace ácido carboxílico, u otra forma de enlace. En ciertas realizaciones, la fuerza de los enlaces puede verse alterada dependiendo de los factores presentes o que surjan en el cuerpo (por

40 ejemplo, enzimas, fibrina, etc.), o afectados por campos aplicados externamente (por ejemplo, magnético, etc.), o por inyección de un agente modificador dirigido al polímero de polifosfato, enlace, o nanopartícula.

45

Las realizaciones del agente hemostático incluyen una nanopartícula y un polímero de polifosfato, tal como se ha descrito anteriormente. En ciertas realizaciones, el agente hemostático tiene una composición con una relación de masa particular del polímero de polifosfato a nanopartícula. Por ejemplo, el agente hemostático puede tener una relación de masa de polímero de polifosfato a nanopartícula de 1:10 o más, tal como 1:9 o más, incluyendo 1:8 o más, o 1:7 o más, o 1:6 o más, o 1:5 o más, o 1:4 o más, o 1:3 o más, o 1:2 o más, o 1:1 o más, o 2:1 o más, o 3:1 o más, o 4:1 o más, o 5:1 o más. En algunas realizaciones, el agente hemostático tiene una relación de masa de polímero de polifosfato a nanopartícula de 1:2 o más, como 1:2. En algunas realizaciones, el agente hemostático

50

55 tiene una relación de masa de polímero de polifosfato a nanopartícula de 1:1 o más, como 1:1.

En ciertas realizaciones, El agente hemostático incluye un agente protector. El agente protector puede ser sustancialmente no reactivo en el cuerpo, tal como sustancialmente no reactivo hacia elementos de la cascada de coagulación. El agente protector se puede configurar para reducir o inhibir la actividad hemostática del agente hemostático. Por ejemplo, en determinados casos, el agente protector puede configurarse para bloquear o cubrir la superficie accesible del polímero de polifosfato, tal que las interacciones entre el polímero de polifosfato y su diana (por ejemplo, enzima o zimógeno o superficies de fibrina) se reducen o inhiben. Esta reducción o inhibición en la interacción entre el polímero de polifosfato y su diana puede ser suficiente para facilitar una reducción en la activación de la diana en comparación con cuando el agente protector no está presente. Por ejemplo, un agente hemostático que incluye un agente protector puede no tener sustancialmente actividad hemostática, tal que el agente hemostático que incluye un agente protector no promueve significativamente la coagulación sanguínea en

60

65

comparación con la coagulación sanguínea en ausencia del agente hemostático.

En ciertas realizaciones, el agente protector se une al agente hemostático. En algunos casos, el agente protector se une de manera removible al agente hemostático. En estas realizaciones, el grupo protector puede unirse al agente hemostático y posteriormente puede separarse (por ejemplo, escindirse) del agente hemostático para liberar el agente hemostático del agente protector. Cuando el agente protector se elimina del agente hemostático, el polímero de polifosfato unido a la superficie de la nanopartícula puede estar expuesto y, por lo tanto, puede ser accesible para interacciones con su diana como se describió anteriormente. En estas realizaciones, un agente protector removible puede facilitar la activación del agente hemostático en un sitio de acción deseado, por ejemplo, un sitio de hemorragia, como un sitio de hemorragia interna en un sujeto. Por ejemplo, la eliminación del grupo protector del agente hemostático puede producir un agente hemostático libre que tiene actividad hemostática, tal que el agente hemostático libre promueve la coagulación de la sangre en comparación con la coagulación de la sangre en presencia del agente hemostático unido al grupo protector (o en comparación con la coagulación de la sangre en ausencia del agente hemostático).

En ciertas realizaciones, el agente protector está unido a la nanopartícula. En algunos casos, el agente protector está unido al polímero de polifosfato. El agente protector puede estar unido al extremo del polímero de polifosfato, o unido a una fracción de los átomos de oxígeno de fosfato en el polímero de polifosfato. En determinados casos, el agente protector se une al agente hemostático en una combinación de sitios que incluyen la nanopartícula y el polímero de polifosfato (por ejemplo, el extremo del polímero de polifosfato y/o un sitio de unión interna). El grupo protector puede asociarse covalentemente o no covalentemente al agente hemostático usando un mediador que tenga afinidad con la nanopartícula (por ejemplo, sílice) o el polifosfato (por ejemplo, enlace de fosforamidato). El mediador puede ser escindido por una o más proteasas. El mediador puede estar compuesto de repeticiones alternas de partes de afinidad, conectores y piezas divisibles. En determinados casos, la afinidad resumida (avidez) es más fuerte que cualquier producto parcialmente escindido. El mediador también se puede reticular a otros mediadores en el agente hemostático, covalente o no covalentemente.

En determinados casos, el agente protector está compuesto de un polímero. El polímero puede configurarse para ser sustancialmente no reactivo en el cuerpo, tal como sustancialmente no reactivo hacia elementos de la cascada de coagulación. Como tal, el polímero puede configurarse para reducir o inhibir la actividad hemostática del agente hemostático como se describió anteriormente. En algunos casos, el agente protector incluye un polímero de polietilenglicol (PEG). El polímero PEG puede ser ramificado o no ramificado según se desee, siempre que la función del polímero PEG se mantenga como se describió anteriormente. En algunos casos, el polímero PEG tiene una masa molecular promedio de 1000 Da o más, tal como 1500 Da o más, incluyendo 2000 Da o más, o 3000 Da o más, o 4000 Da o más, o 5000 Da o más, o 6000 Da o más, o 7000 Da o más, u 8000 Da o más, o 9000 Da o más, o 10.000 Da o más, o 15.000 Da o más, o 20.000 Da o más. En determinados casos, el polímero PEG tiene una masa molecular promedio de 2000 Da. En determinados casos, el polímero PEG tiene una masa molecular promedio de 1000 Da.

En ciertas realizaciones, la relación de masa de PEG a polifosfato varía de 1:1000 a 1000:1, tal como de 1:900 a 900:1, incluyendo de 1:800 a 800:1, o de 1:700 a 700:1, o de 1:600 a 600:1, o de 1:500 a 500:1, o de 1:400 a 400:1, o de 1:300 a 300:1, o de 1:200 a 200:1, o de 1:100 a 100:1, o de 1:75 a 75:1, o de 1:50 a 50:1, o de 1:25 a 25:1, o de 1:10 a 10:1, o de 1:5 a 5:1. En algunos casos, la relación de masa de PEG a polifosfato varía de 1:50 a 50:1. En ciertas realizaciones, el agente protector está compuesto por uno o más de los siguientes: PEG; polivinilpirrolidona (PVP); poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA); polipropilenglicol; poli(carboxbetaína); poli(sulfobetaina); poli(metacrilato de carboxbetaína) (PCBMA); polioxámeros; polipéptidos; materiales biodegradables tal como ácido polilactónico y sus derivados, colágenos, albúmina, gelatina, ácido hialurónico, almidón, celulosa (por ejemplo, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de carboximetilcelulosa, caseína, dextrano, polisacáridos, fibrinógeno, poli(D,L-lactida), poli(D,L-lactida-co-glicólido) y similares; poliuretanos; acetato de polietileno y vinilo); siliconas; polímeros acrílicos tales como ácidos poliacrílicos, ácido polimetilacrílico, poliacrilianoacrilato; polietileno; polipropileno; poliamida; poli(éster uretano); poli(éter uretano); poli(éster urea); poliéteres tales como óxido de polietileno, óxido de polipropileno, pluronics, politetrametilenglicol; polímeros de vinilo tales como polivinilpirrolidona, poli(alcohol de vinilo), poli(ftalato de acetato de vinilo); parilenos; poliuretano; poli(hidroxibutilato); poli(alquil carbonatos); poli(ortoésteres); poliésteres; poli(ácido hidroxivalérico); polidioxanona; tereftalato de poli(etileno); poli(ácido málico); poli(ácido tartrónico); polianhídridos; polifosfacenos; y similares, o copolímeros de los mismos. Las variaciones de polímeros se describen adicionalmente en el documento EP 1830902 A2.

En ciertas realizaciones, el agente protector está unido al agente hemostático por un grupo de enlace. En algunos casos, el grupo de enlace es un grupo de enlace escindible enzimáticamente. Por ejemplo, el grupo de enlace puede ser un grupo de enlace peptídico escindible enzimáticamente. El grupo de unión del péptido escindible puede configurarse de modo que sea específicamente reconocido y escindido por una enzima diana. Por ejemplo, la enzima diana puede ser una enzima que tiene una actividad localizada en un área o áreas particulares en un sujeto, tal como un sitio de acción diana particular para el agente hemostático. En algunos casos, la enzima diana puede tener una actividad localizada en un sitio de hemorragia en un sujeto, como un sitio de hemorragia interna en un sujeto o un sitio de hemorragia externa en un sujeto. Por ejemplo, el grupo de enlace escindible enzimáticamente

puede configurarse de modo que sea escindido específicamente por una o más enzimas involucradas en la cascada de coagulación, tal como, aunque no de forma limitante, trombina (Factor IIa), Factor VIIa, Factor IX, Factor Xa, Factor Xii, Factor Xia, Factor XIia, Factor XIIIa, activador del plasminógeno tisular (tPA), activador de plasminógeno de uroquinasa (uPA), proteína C activada, plasmina, y similares.

5 En estas realizaciones, el agente hemostático protegido correspondiente proporciona liberación controlada del agente hemostático, activada después de la administración, porque requiere escisión enzimática para iniciar la liberación del agente hemostático del grupo protector. En determinados casos, la tasa de liberación del agente hemostático depende de la tasa de escisión enzimática en el sitio de acción diana. En consecuencia, el agente hemostático protegido puede configurarse de modo que no proporcione niveles plasmáticos significativos del agente hemostático activo y no se descomponga fácilmente para proporcionar el agente hemostático biológicamente activo que no sea por escisión enzimática en el sitio de acción diana.

15 La enzima capaz de escindir el grupo de enlace escindible enzimáticamente puede ser una peptidasa; el grupo de enlace escindible enzimáticamente se une al agente hemostático a través de un enlace amida (por ejemplo, un peptidasa: -NHCO-). En algunas realizaciones, la enzima es una peptidasa como las que participan en la cascada de coagulación. Los ejemplos incluyen Factor Xa, Factor Xii, Factor VIIa, y trombina, y similares.

20 El grupo de enlace enzimáticamente escindible unido al agente hemostático mediante un enlace amida puede ser, por ejemplo, un resto de un aminoácido o un péptido. El péptido puede contener, por ejemplo, hasta 10 restos de aminoácido. Por ejemplo, puede ser un dipéptido o tripéptido. En ciertas realizaciones, cada aminoácido es un L-aminoácido. Ejemplos de aminoácidos naturales son alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glicina, glutamina, ácido glutámico, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, lisina y valina. En consecuencia, los ejemplos de grupos de enlace escindibles enzimáticamente incluyen restos de los L-aminoácidos enumerados anteriormente y dipéptidos y tripéptidos, o péptidos más largos, formados a partir de los L-aminoácidos enumerados anteriormente.

30 En ciertas realizaciones, el grupo de enlace enzimáticamente escindible está unido a la nanopartícula, tal como unido covalentemente a la nanopartícula. El grupo de enlace escindible enzimáticamente puede unirse covalentemente a la superficie de la nanopartícula usando cualquiera de una variedad de compuestos usados generalmente para funcionalizar la superficie de las moléculas, tal como, aunque no de forma limitante, reactivos de silanización, tal como un aminosilano, por ejemplo, (3-aminopropil)trietoxisilano (APTES), y similares. En ciertas realizaciones, la relación de reactivo de silanización (por ejemplo, APTES) a nanopartículas es de 1,5 µl/g o más, como 1,6 µl/g o más, incluyendo 1,7 µl/g o más, o 1,8 µl/g o más, o 1,9 µl/g o más, o 2 µl/g o más. En algunos casos, la relación de reactivo de silanización (por ejemplo, APTES) a nanopartículas varía de 1,5 µl/g a 2 µl/g, tal como de 1,6 µl/g a 2 µl/g.

40 En ciertas realizaciones, el agente hemostático puede incluir un agente de unión específico. Un agente de unión específico puede ser cualquier molécula que se una específicamente a una proteína o secuencia de ácido nucleico o biomacromolécula a la que se dirige (por ejemplo, una diana ubicada en un sitio diana de interés, tal como un sitio de hemorragia). Dependiendo de la naturaleza de la diana, un agente de unión específico puede ser, pero sin limitación, un anticuerpo contra un epítipo de un péptido diana, o cualquier molécula de reconocimiento, como un miembro de un par de enlace específico. Por ejemplo, los pares de unión específicos adecuados incluyen, pero sin limitación: un miembro de un par de receptor/ligando; una parte de unión a ligando de un receptor; un miembro de un par de anticuerpo/antígeno; un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo; un hapteno; un miembro de un par de lectina/carbohidrato; un miembro de un par de enzima/sustrato; biotina/avidina; biotina/estreptavidina; digoxina/antidigoxina; un miembro de un par de unión de aptámero péptidico; y similares. Por ejemplo, un agente de unión específico puede ser parte del agente protector, que puede configurarse para unirse a células o superficies en la sangre, paredes de vasos o tejidos, alterando de ese modo la dispersión o concentración del agente hemostático en el sujeto. La afinidad puede derivarse de grupos dentro o unidos al agente protector (por ejemplo, en el extremo de PEG), o puede derivarse del componente de polifosfato, o un agente de unión específico separado del agente protector (por ejemplo, unido por separado a la nanopartícula o el polímero de polifosfato).

55 Los ejemplos de un agente de unión específico incluyen, pero sin limitación: un ligando de unión a fibrina (por ejemplo, un péptido de unión a fibrina tal como CREKA, un aptámero de unión a fibrina, una proteína de unión a fibrina, un anticuerpo de unión a fibrina, etc.); un péptido de unión a colágeno (por ejemplo, KLWVLPK); un ligando de afinidad por plaquetas activadas, complejos de trombomodulina/trombina, células endoteliales específicas (por ejemplo, péptido activable del inhibidor de fibrinólisis activable por trombina (TAFI), factor tisular, membranas lipídicas, y similares; una enzima con un motivo de unión a fibrina expuesto; un ligando configurado para formar un enlace covalente con la fibrina (por ejemplo, péptido alfa2AP N-terminal H-NQEQVSPLTGLK-NH<sub>2</sub>); un ligando de unión a trombina (por ejemplo, un aptámero o péptido de unión a trombina); dominios de anticuerpos; inhibidores (por ejemplo, péptidos con una cetona reactiva, etc.); combinaciones de los mismos y similares.

65 En ciertas realizaciones para uso interno, la superficie de nanopartículas está protegida para reducir o prevenir la activación prematura de la cascada de coagulación. Como se ha descrito anteriormente, en algunos casos, se usa PEG y un péptido escindible para dirigir la activación del agente hemostático en el sitio de la herida. En ciertas

realizaciones, la superficie de las nanopartículas está cubierta con un agente hemostático (por ejemplo, poliP) que acelera la coagulación. Esta estrategia se conoce como "corona" ya que el agente hemostático cubre la superficie, dando como resultado que la superficie esté protegida contra la activación de la cascada de coagulación. Véase FIG. 102. La corona poliP facilita la localización de los sitios de lesión si poliP cubre la superficie de la partícula y actúa como el único agente. La cobertura puede referirse a la cobertura total de la partícula o al lugar donde se cubre suficiente superficie de la partícula para hacer que la actividad hemostática de la superficie no sea funcional. Este efecto corona puede facilitar el uso interno del agente hemostático para mejorar la focalización del agente al reducir o prevenir la activación prematura de la cascada de coagulación.

10 En ciertas realizaciones, el poliP cubre sustancialmente toda la superficie de la nanopartícula. En algunos casos, el poliP cubre 75 % o más, u 80 % o más, u 85 % o más, o 90 % o más, o 95 % o más, o 97 % o más, o 99 % o más de la superficie de la nanopartícula.

15 La corona poliP se puede producir a través de estrategias de protección de poliP. Por ejemplo, la estrategia de puente APTES descrita en el presente documento puede usarse para unir el poliP a la nanopartícula. En determinados casos, el efecto poliP "corona" se puede producir usando un enlace APTES, enlace éster de 1-etil-3-[3-dimetilamino]propil]carbodiimida (EDAC), enlace de ácido carboxílico u otras formas de enlaces para unir el poliP a la superficie de la nanopartícula.

## 20 **AGENTES ADICIONALES PARA USO CON EL AGENTE HEMOSTÁTICO EN UNA COMPOSICIÓN HEMOSTÁTICA**

25 Los agentes hemostáticos descritos en el presente documento pueden proporcionarse solos como una composición hemostática o pueden proporcionarse en combinación con uno o más agentes biológicamente activos adicionales (por ejemplo, agentes hemostáticos, antibióticos, iones (por ejemplo, calcio, potasio, etc.) y similares) en una composición hemostática. En general, opcionalmente, los agentes adicionales pueden incluir componentes que pueden ser activos o inertes con respecto a la actividad de la composición hemostática para promover la coagulación de la sangre, o pueden proporcionar una actividad biológica adicional o diferente (por ejemplo, antibacteriana, antiinflamatoria, y similares). Dichos agentes adicionales se pueden proporcionar en mezcla (por ejemplo, en secos o hidratados (por ejemplo, solución)) con el agente hemostático (por ejemplo, en una suspensión) o en la superficie (por ejemplo, para un agente hemostático no poroso) o cargados en la propia estructura del agente hemostático (por ejemplo, para un agente hemostático poroso).

35 En algunas realizaciones, la composición hemostática incluye un agente biológicamente activo adicional que puede facilitar la coagulación sanguínea, cicatrización de heridas y/o reducir el riesgo de infección. Dichos agentes adicionales ejemplares pueden incluir un agente con actividad hemostática, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citoquina, y similares, que puede promover la cicatrización de heridas y/o reducir el riesgo de infección. Dichos componentes pueden ser de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, una fuente recombinante del mismo o diferente origen animal que el sujeto a tratar (por ejemplo, ser humano, bovino, etc.). El agente hemostático se puede cargar con el agente biológicamente activo para proporcionar actividad biológica como un porcentaje en peso variable de la composición hemostática, por ejemplo, 1 % o más, 2 % o más, 5 % o más, 10 % o más, 15 % o más, 20 % o más, 25 % o más, o porcentajes de peso aún mayores, dependiendo de la cantidad biológicamente eficaz necesaria para producir el efecto deseado en el sujeto.

45 En algunas realizaciones, la composición hemostática incluye un factor promotor de coágulos además del agente hemostático descrito en el presente documento. Por ejemplo, la composición hemostática puede incluir un factor de coagulación o un agente activador de plaquetas. Agentes ejemplares incluyen trombina, Factor VII, Factor VIIa, serotonina, colágeno, tromboxano A2, y ADP, combinaciones de los mismos y similares. Dichos componentes pueden ser de una fuente recombinante del mismo o diferente origen animal que el sujeto a tratar (por ejemplo, ser humano, bovino, etc.).

50 En algunas realizaciones, el agente hemostático en la composición hemostática se modifica para incluir un agente biológicamente activo unido, que puede ser una proteína, un ion, o similar. Los agentes que tienen actividad hemostática son de interés. Por ejemplo, una superficie (por ejemplo, superficie externa y/o interna) del agente hemostático puede modificarse para proporcionar un factor promotor de coágulo unido (por ejemplo, trombina, Factor VIIa recombinante, etc.), un antibiótico (por ejemplo, iones plata) y similares. El término "unido" como se usa en este contexto (que puede usarse indistintamente con el término "cargado") abarca la unión covalente y no covalente, incluyendo fuerzas de van der Waals, enlaces de hidrógeno, quimisorción, fisisorción, fuerzas electrostáticas, atrapamiento físico dentro de poros y/o canales del agente hemostático, y similares. Por lo tanto, un agente que está "unido" a una superficie del agente hemostático incluye la unión mediante absorción, adsorción, adhesión, enlace covalente, y similares.

65 El agente hemostático cargado de agente biológicamente activo se puede producir mediante una variedad de métodos diferentes. Por ejemplo, el agente hemostático puede empaparse en una solución que contiene uno o más agentes de interés para proporcionar la adsorción del agente (s) en una superficie (por ejemplo, superficie externa y/o interna) del agente hemostático. Después de remojar durante un periodo de tiempo deseado (por ejemplo, para

proporcionar una cantidad deseada de agente cargado en y/o en el agente hemostático), El agente hemostático cargado de agente biológicamente activo se puede lavar para eliminar el material no unido. El agente hemostático cargado puede entonces secarse o almacenarse en forma hidratada o parcialmente hidratada, según se desee según el agente biológicamente activo usado.

5 En otro ejemplo, el agente hemostático puede tratarse térmicamente para presentar una superficie hidroxilada para la unión por condensación de un agente biológicamente activo que expresa grupos oxo o hidro. Este método de producción puede proporcionar la unión covalente del agente biológicamente activo (por ejemplo, proteína, polifosfato, agente silanizante, hidroxilo-PEG) a una superficie externa y/o interna del agente hemostático.

10 En otro ejemplo, la superficie del agente hemostático puede funcionalizarse con, por ejemplo, organosilanos, aminoácidos, ácidos carboxílicos, ésteres y/o grupos fosfato, para promover la unión no covalente o covalente de un agente activo. Por ejemplo, el agente hemostático puede funcionalizarse con grupos amina (por ejemplo, primaria, secundaria o terciaria) para expresar una carga superficial positiva capaz de atraer electrostáticamente sustituyentes cargados negativamente en solución. Alternativamente, el agente hemostático se puede funcionalizar con grupos carboxilato para expresar una carga superficial negativa capaz de atraer electrostáticamente sustituyentes cargados positivamente en solución. Se pueden usar otros grupos químicos que aumentan, disminuyen, o neutralizan la carga superficial.

20 En otro ejemplo, la superficie de óxido del agente hemostático se puede funcionalizar con, por ejemplo, organosilanos, aminoácidos, aminos, ácidos carboxílicos, y/o grupos fosfato, para promover la fijación de materiales biológicamente activos. Por ejemplo, el dióxido de silicio puede expresar una superficie negativa cargada cuando se sumerge en una solución con un pH mayor que el punto isoeléctrico del dióxido de silicio. Sin embargo, si el dióxido de silicio se funcionaliza primero uniendo grupos amina a la superficie del dióxido de silicio, la carga superficial eficaz puede ser positiva como consecuencia de los grupos amino cargados positivamente en la periferia. La sílice funcionalizada con amina puede atraer electrostáticamente sustituyentes cargados negativamente. La sílice cargada negativamente, grupos funcionales amino ausentes, pueden repeler electrostáticamente los sustituyentes cargados negativamente.

30 Los agentes biológicamente activos que encuentran uso en la composición hemostática de la presente divulgación, y que pueden usarse para proporcionar un agente hemostático cargado de agente biológicamente activo pueden seleccionarse entre una variedad de agentes activos diferentes. Los agentes activos ejemplares incluyen, pero sin limitación, polipéptidos (por ejemplo, enzimas (incluyendo zimógenos y enzimas activadas), glicoproteínas, péptidos, y similares), fosfolípidos, iones, tal como iones que actúan como cofactores en la cascada de coagulación (por ejemplo, al servir como puente iónico) y/o iones que facilitan la precipitación coloidal (por ejemplo, precipitación de glóbulos rojos) y/o iones que tienen actividad antibiótica (por ejemplo, plata iones) y similares) y otros agentes activos que tienen una actividad biológica de interés (por ejemplo, agentes promotores de coágulos, antibióticos, antiinflamatorios, y similares). Cuando el agente activo es un polipéptido o ácido nucleico, el agente puede ser recombinante o sintético (por ejemplo, producido por métodos no genéticos). Son de interés los agentes activos que tienen actividad para promover la coagulación de la sangre (por ejemplo, trombina) y/o actividad antibacteriana (por ejemplo, iones plata). Los agentes biológicamente activos, tales como polipéptidos, pueden ser de cualquier origen adecuado, por ejemplo, ser humano, bovino, etc.

45 Los ejemplos de agentes polipeptídicos biológicamente activos incluyen, pero sin limitación, protrombina, trombina, Factor VII, Factor VIIa, Factor X, Factor Xa, Factor XI, Factor XIa, Factor XII, Factor XIIa, Factor XIII, Factor XIIIa, fibrina, colágeno, fibrinógeno, factores de crecimiento (por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factores de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento transformante, y similares), precalicreína, quinínogeno de alto peso molecular, concentrados de proteínas (por ejemplo, concentrados de factor de coagulación (por ejemplo, concentrado de alfanato FVIII, concentrado de bioclato FVIII, Concentrado de monoclato-P FVIII, hemato P FVIII, concentrado de Factor von Willebrand, concentrado de helixato FVIII, concentrado de hemofil-M FVIII, concentrado de humato-P FVIII, hyante-C™, concentrado de FVIII porcino, concentrado de koate HP FVIII, concentrado de kogenate FVIII, concentrado de FVIII, concentrado de mononine FIX, concentrado de fibrogamina p FXIII, y similares), combinaciones de los mismos, y fragmentos biológicamente activos de los mismos. Debe observarse que la expresión "agentes de polipéptidos biológicamente activos" pretende abarcar formas activas (por ejemplo, procesadas) así como formas activables (por ejemplo, zimógeno) de polipéptidos (por ejemplo, en donde los polipéptidos son una enzima).

60 Los iones ejemplares que encuentran uso como agente biológicamente activo incluyen, pero no se limitan necesariamente a,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $NO_3^-$ , y similares. Tales iones se pueden proporcionar en forma de sal, por ejemplo, un agente hemostático cargado de sal.

65 Las sales ejemplares que encuentran uso en las composiciones hemostáticas incluyen, pero sin limitación, sulfato de aluminio, nitrato de plata, cloruro de calcio, cloruro de magnesio y similares. En ciertas realizaciones, la composición hemostática puede incluir nitrato de plata.

Los agentes antiinflamatorios ejemplares que encuentran uso en las composiciones hemostáticas desveladas en el

presente documento incluyen, pero no se limitan necesariamente a, agentes que previenen la migración de leucocitos, sulfadiazina de plata, ácido acetilsalicílico, indometacina, nafazatrom, y similares.

- 5 Otros agentes biológicamente activos que pueden encontrar uso en las composiciones hemostáticas desveladas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, antibióticos (por ejemplo, bactericidas, bacteriostáticos, fungicidas, antivirales, y similares). Los ejemplos de tales agentes activos incluyen, pero sin limitación, iones  $Ag^+$ , que se pueden proporcionar como una sal de plata, por ejemplo,  $AgNO_3$ ;  $\beta$ -lactamas, cefoxitina, n-formamidoil tienamicina, derivados de tienamicina, neomicina, metronidazol gramicidina, bacitracina, sulfonamidas, aminoglicósidos como gentamicina, kanamicina, amikacina, sisomicina, o tobramicina, ácidos nalidíxicos y análogos como norfloxicán, combinaciones de fluoroalanina/pentizidona, nitrofurazonas, combinaciones de los mismos y similares. Dichos antibióticos generalmente se seleccionan para que sean compatibles con el sitio de administración (por ejemplo, tipo de sitio de hemorragia a tratar, el sitio de la herida, y similares) y la infección microbiana que se debe prevenir y/o tratar.
- 10
- 15 Otros ejemplos de agentes biológicamente activos pueden incluir analgésicos, anestésicos, esteroides, vasoconstrictores, linfocinas, citocinas, vitaminas, y similares.

### **COMPOSICIONES HEMOSTÁTICAS Y DISPOSITIVOS**

- 20 Como se aprecia anteriormente, el agente hemostático se puede proporcionar solo o en combinación con uno o más agentes biológicamente activos adicionales. Cuando la composición hemostática se compone de un agente hemostático con uno o más agentes biológicamente activos adicionales, tales composiciones hemostáticas se pueden proporcionar en una variedad de formatos. Por ejemplo, los agentes biológicamente activos de la composición hemostática pueden proporcionarse como una mezcla (por ejemplo, mezclada o combinada), pueden proporcionarse como un recubrimiento sobre un sustrato (por ejemplo, cuando uno o ambos del agente biológicamente activo y/o agente hemostático se proporciona como un recubrimiento adherido a un sustrato), o puede proporcionarse en un solo paquete en el mismo o por separado compartimentos del paquete. El agente hemostático y el agente(s) biológicamente activo(s) adicional(es) también pueden proporcionarse en dos o más paquetes que deben abrirse y administrarse simultáneamente (por ejemplo, concurrente o consecutivamente) a un sitio de hemorragia.
- 25
- 30

- En ciertas realizaciones, la composición hemostática incluye un agente hemostático, como se describe en el presente documento. En algunos casos, el agente hemostático incluye una nanopartícula y un polímero de polifosfato unido a la nanopartícula, como se describe en el presente documento. En algunos casos, el agente hemostático incluye una nanopartícula, un polímero de polifosfato unido a la nanopartícula, y un agente protector unido a la nanopartícula o polímero de polifosfato mediante un grupo de unión enzimáticamente escindible, como se describe en el presente documento. En algunos casos, la composición hemostática incluye un primer agente hemostático que incluye una nanopartícula y un polímero de polifosfato unido a la nanopartícula, y un segundo agente hemostático que incluye una nanopartícula, un polímero de polifosfato unido a la nanopartícula, y un agente protector unido a la nanopartícula o polímero de polifosfato mediante un grupo de unión enzimáticamente escindible.
- 35
- 40

- En general, una composición hemostática se puede proporcionar como una composición estéril, y como tal generalmente se proporciona en un sellado. El recipiente estéril que mantiene la esterilidad de la composición hemostática hasta su uso. Cuando se desee, el recipiente puede proporcionar además el mantenimiento de un estado de hidratación de la composición hemostática, por ejemplo, mediante el uso de materiales que proporcionan una barrera resistente al vapor de agua (por ejemplo, mylar, plástico, etc.). Por ejemplo, la composición hemostática se puede proporcionar en un recipiente estéril en forma de una bolsa de aluminio mylar sellable.
- 45

- La composición hemostática puede incluir además cargas (por ejemplo, sulfato de aluminio) o agentes espesantes que facilitan la aplicación selectiva de la composición hemostática en diversas formas (por ejemplo, como una pasta, gel, polvo, pulverización, aerosol, cemento, o miembro sólido erosionable (por ejemplo, biodegradable)). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la composición hemostática puede configurarse para la administración a un sitio de hemorragia externa y, por lo tanto, puede estar en varias formas, como una pasta, gel, polvo, pulverización, aerosol, cemento, o composición erosionable como se describió anteriormente. En otras realizaciones, el agente hemostático puede configurarse para la administración a un sitio de hemorragia interna. En estos casos, la composición hemostática puede administrarse en una forma compatible con la administración intravenosa de la composición hemostática, tal como una formulación acuosa, inyectable (por ejemplo, una solución, una suspensión, y similares).
- 50
- 55

### **Formas de dosificación y vehículos**

- 60 La composición hemostática de la presente divulgación se puede proporcionar en una variedad de formas de dosificación, y, opcionalmente, se puede proporcionar en combinación con una variedad de vehículos diferentes, compatibles. Los vehículos ejemplares incluyen aquellos que facilitan la aplicación a un sitio de hemorragia, como una herida externa, por ejemplo, facilitando la administración de la composición hemostática desde su embalaje a una herida, facilitar la aplicación y/o mantenimiento en el sitio de una herida, y similares. En consecuencia, la composición hemostática, cuando sea compatible con la actividad hemostática de la composición hemostática,
- 65

puede proporcionarse como una formulación seca (por ejemplo, un polvo u otra formulación que no contenga un líquido como vehículo), una pasta, gel, o similar. En algunas realizaciones, la composición hemostática se proporciona como un producto seco, forma de dosificación fluida que puede dispensarse desde un recipiente (por ejemplo, desde una bolsa u otro recipiente sellado). La composición hemostática también se puede proporcionar en forma de aerosol y, por lo tanto, se puede proporcionar en un aerosol estéril (por ejemplo, que se puede proporcionar en combinación con un propulsor, o en una solución pulverizable). Las composiciones hemostáticas se pueden almacenar en un recipiente estéril adecuado, por ejemplo, en un recipiente resistente al vapor de agua, opcionalmente bajo un sellado hermético y/o de vacío. En otras realizaciones, cuando la composición hemostática está configurada para la administración a un sitio de hemorragia interna, la forma de dosificación puede incluir un vehículo adecuado para la administración intravenosa de la composición hemostática, tal como una solución acuosa, solución salina, solución tampón, sustituto de sangre, y similar.

**Dispositivos hemostáticos**

La composición hemostática desvelada en el presente documento puede proporcionarse en conexión con un dispositivo adaptado para el almacenamiento y/o suministro de una composición hemostática a un sitio de hemorragia. Como se mencionó anteriormente, la composición hemostática se proporciona generalmente en un recipiente estéril, que puede proporcionar además una barrera resistente al agua y/o al vapor para evitar la hidratación de la composición hemostática, como se desee.

El recipiente puede tener la forma de una bolsa (por ejemplo, una bolsa de mylar), frasco, tubo, u otro recipiente. El contenedor puede incluir una parte frangible para facilitar la apertura rápida del recipiente para proporcionar un acceso rápido y la administración de la composición hemostática contenida en el mismo. Para formulaciones basadas en soluciones, el recipiente puede incluir una bolsa, un vial, frasco, u otro recipiente adecuado para contener una formulación líquida. Por ejemplo, el recipiente puede incluir una bolsa intravenosa configurada para la administración intravenosa de la composición hemostática, o un vial sellado del que se puede extraer una dosis deseada de la composición hemostática, por ejemplo, mediante una jeringa, para administración al sujeto.

La composición hemostática se puede proporcionar junto con una variedad de dispositivos diferentes, que puede adaptarse para facilitar la administración de la composición hemostática a un sitio de hemorragia. Por ejemplo, la composición hemostática puede envasarse en el mismo recipiente o en un recipiente separado con una o más esponjas estériles, gasa, vendaje, hisopo, pulverización, aerosol, gel, cemento, vendaje de compresión, almohada (por ejemplo, para facilitar la aplicación a una herida en la cabeza), manga (por ejemplo, para cubrir una herida en una extremidad), y similares. En algunas realizaciones, el dispositivo sirve como sustrato para la composición hemostática, en donde el agente hemostático en la composición hemostática puede adherirse al dispositivo. Por ejemplo, la composición hemostática se puede proporcionar en una superficie del dispositivo accesible para la sangre (por ejemplo, como un recubrimiento superficial), y/o dentro del dispositivo (por ejemplo, permeando al menos una porción de un material absorbente, tal como una gasa). Debe entenderse que un "recubrimiento" está al menos en la superficie del sustrato al que se aplica, y puede penetrar más allá de la superficie, tal como cuando el sustrato es un material absorbente.

Cuando la composición hemostática contiene el agente hemostático y uno o más agentes biológicamente activos adicionales, el agente hemostático y otro agente(s) pueden estar presentes como una mezcla suelta (por ejemplo, como en una bolsa que se abrirá antes del uso). En ciertas realizaciones, uno o más agentes biológicamente activos se cargan en un agente hemostático en la composición hemostática. En otras realizaciones, la composición hemostática se proporciona como un recubrimiento sobre un sustrato, en donde el agente hemostático puede cargarse opcionalmente con un agente biológicamente activo (por ejemplo, trombina). Como alternativa o adicionalmente, el agente hemostático puede proporcionarse como un recubrimiento sobre un sustrato (por ejemplo, vendaje o esponja) y un segundo agente biológicamente activo puede proporcionarse suelto y en el mismo envase sellado que el sustrato.

Cuando la composición hemostática está configurada para la administración a un sitio de hemorragia interna, la composición hemostática puede incluir el agente hemostático y uno o más agentes biológicamente activos adicionales, donde el agente hemostático y otros agentes pueden estar presentes en la misma solución (o suspensión). En ciertas realizaciones, uno o más agentes biológicamente activos se cargan en un agente hemostático en la composición hemostática y, por lo tanto, se pueden proporcionar en una única solución (o suspensión). En otras realizaciones, los otros agentes activos pueden proporcionarse en recipientes separados de la composición hemostática y pueden administrarse simultáneamente (por ejemplo, concurrente o consecutivamente) al sujeto.

**MÉTODOS DE USO DE COMPOSICIONES Y DISPOSITIVOS HEMOSTÁTICOS**

Las composiciones hemostáticas desveladas en el presente documento pueden usarse para facilitar la coagulación de una herida sangrante interna o externa. Como tal, las composiciones hemostáticas pueden usarse para mejorar la coagulación de la sangre en un sitio de hemorragia de un sujeto que lo necesita, y al menos estabilizar temporalmente una herida (por ejemplo, estabilizar temporalmente al paciente que de otro modo podría haber

muerto como resultado de desangrado). Tales métodos generalmente implican poner en contacto una composición hemostática descrita en el presente documento con una herida externa o interna sangrante de un sujeto durante un tiempo suficiente para promover la formación de coágulos sanguíneos. Como tal, el método puede incluir administrar a un sitio de hemorragia en un sujeto la composición hemostática como se describe en el presente documento durante un periodo de tiempo suficiente para al menos iniciar la coagulación de la sangre en el sitio de la hemorragia.

La composición hemostática puede contactar con una herida a la que se puede acceder externamente mediante, por ejemplo, accediendo a la herida y vertiendo la composición hemostática sobre la herida. Como alternativa o adicionalmente, la composición hemostática se puede administrar a una herida externa aplicando un dispositivo hemostático a la herida, donde el dispositivo incluye una composición hemostática recubierta sobre un sustrato. El contacto se puede mantener mediante la aplicación de presión, y se puede mantener en su lugar con la mano y/o mediante el uso de un vendaje. El contacto puede mantenerse al menos hasta que el flujo sanguíneo de la herida se haya ralentizado o haya cesado de manera detectable, es decir, hasta que la herida se estabilice mediante la formación de un coágulo. Una vez que se forma el coágulo, la composición hemostática se puede eliminar de la herida. Cuando sea necesario, la herida se puede irrigar para eliminar cualquier agente hemostático suelto en la herida.

Cuando la composición hemostática está configurada para la administración a un sitio de hemorragia interna, el método puede incluir la administración intravenosa de la composición hemostática al sujeto. Como tal, el método puede incluir localizar un sitio intravenoso apropiado en el sujeto e inyectar la composición hemostática en el sujeto en el sitio intravenoso. En ciertas realizaciones, como se describe en el presente documento, el agente hemostático puede incluir un agente protector que está configurado para reducir o inhibir la actividad hemostática del agente hemostático. Tras la inyección del agente hemostático protegido en el sujeto, el agente hemostático puede circular por el cuerpo del sujeto hasta que se active en un sitio diana (por ejemplo, un sitio diana de hemorragia interna). Como se ha descrito anteriormente, el agente protector puede eliminarse del agente hemostático mediante la escisión de un grupo de unión escindible por una enzima localizada en el sitio diana, restaurando así la actividad hemostática del agente hemostático en el sitio diana deseado. En ciertas realizaciones, el agente protector no se elimina significativamente en otros sitios no específicos del sujeto, tal que el agente hemostático protegido no tiene actividad hemostática no específica detectable en otros sitios en el sujeto, y por lo tanto solo tiene actividad hemostática detectable cuando se activa específicamente en el sitio diana deseado (por ejemplo, el sitio diana deseado de hemorragia interna).

Estos métodos son aplicables a una variedad de diferentes tipos de heridas, que pueden haberse infligido intencionadamente o por accidente y en cualquier parte del cuerpo susceptible de aplicación de una composición hemostática desvelada en el presente documento. La composición hemostática se utiliza en heridas de todos los grados de gravedad, desde heridas sangrantes en la superficie de la piel hasta heridas que implican laceración de la arteria femoral u otra arteria o vena principal.

Los sujetos incluyen cualquier sujeto que necesite tratamiento en un sitio de hemorragia externa o interna, y pueden incluir aplicaciones tanto humanas como veterinarias (por ejemplo, mamíferos tal como perros, gatos, ganado (por ejemplo, ganado vacuno, caballos, ovejas, cabras, etc.), y similares).

#### **UTILIDAD**

Las composiciones hemostáticas, dispositivos y métodos objeto encuentran uso en una variedad de aplicaciones diferentes donde se desea el tratamiento de un sitio de hemorragia externa o interna en un sujeto. En algunos casos, La herida puede ser un sitio de hemorragia externa. En otras realizaciones, La herida puede ser un sitio de hemorragia interna. En algunos casos, la herida puede incluir sitios de hemorragia externa e interna. La herida puede ser una herida quirúrgica o una herida traumática, tal como, aunque no de forma limitante, una herida quirúrgica o traumática de tejidos blandos.

Como se describe en el presente documento, las composiciones hemostáticas, dispositivos y métodos objeto encuentran uso en promover la coagulación de la sangre en un sitio de hemorragia, ya sea un sitio de hemorragia externa o interna. En ciertas realizaciones, las composiciones hemostáticas, dispositivos y métodos objeto encuentran uso en promover la coagulación de la sangre en un sitio de hemorragia en condiciones de coagulopatía. Por "coagulopatía" se entiende una afección en donde se altera la formación de coágulos en un sujeto, como una afección en donde la cascada de coagulación del sujeto se ve afectada. La coagulopatía puede incluir uno o más de un subconjunto de afecciones, tal como dilución, hipotermia y acidosis. Como tal, las composiciones hemostáticas, dispositivos y métodos objeto se utilizan para promover la coagulación de la sangre en un sitio de hemorragia cuando la cascada de coagulación de un sujeto se ve afectada, como en una o más afecciones de coagulopatía, tal como dilución, hipotermia y acidosis.

Por ejemplo, las composiciones hemostáticas, dispositivos y métodos objeto se utilizan para promover la coagulación de la sangre en un sitio de hemorragia en condiciones de dilución, por ejemplo, las composiciones hemostáticas, dispositivos y métodos objeto son hemostáticamente eficaces incluso cuando la concentración de

factores procoagulantes en el sitio de la hemorragia es insuficiente para tener un efecto hemostático significativo, como puede ocurrir como resultado de un traumatismo y/o pérdida de sangre. De forma similar, en ciertas realizaciones, las composiciones hemostáticas, dispositivos y métodos objeto encuentran uso en promover la coagulación de la sangre en un sitio de hemorragia bajo una condición de hipotermia, por ejemplo, las composiciones hemostáticas, dispositivos y métodos objeto son hemostáticamente eficaces incluso cuando la temperatura corporal del sujeto cae por debajo de 37 °C, como puede ocurrir como resultado de un traumatismo y/o pérdida de sangre. Además, en algunas realizaciones, las composiciones hemostáticas, dispositivos y métodos objeto encuentran uso en promover la coagulación de la sangre en un sitio de hemorragia bajo una condición de acidosis, por ejemplo, las composiciones hemostáticas, dispositivos y métodos objeto son hemostáticamente eficaces incluso cuando el pH de la sangre está por debajo de su valor habitual de pH 7,4, como puede ocurrir como resultado de un traumatismo. En ciertas realizaciones, las composiciones hemostáticas, dispositivos y métodos objeto encuentran uso en promover la coagulación de la sangre en un sitio de hemorragia bajo de una, o una combinación de dos o más, afecciones de coagulopatía.

## 15 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación completa y una descripción de cómo hacer y usar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni pretenden representar que los experimentos que se presentan a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio, la temperatura está en grados Celsius y la presión es igual o cercana a la atmosférica.

## 25 Ejemplo 1

### Materiales

Etanol (99 %), tetraortosilicato (TEOS), amoniaco  $\text{NH}_4\text{OH}$  (28 %), (3-aminopropil)triatoxisilano (APTES) fueron suministrados por Sigma Aldrich. El agua desionizada se obtuvo usando un sistema de purificación de agua Milli-Q. El plasma normal combinado congelado (PNP) y el plasma deficiente en factor XII se adquirieron en George King Biomedical (Overland Park, KS) y se manipularon de acuerdo con los prospectos. Las soluciones fosfolipídicas en cloroformo se adquirieron en Avanti Polar Lipids: L-alfa-fosfatidicolina (PC) y L-alfa-fosfatidilserina (PS). Cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato de sodio, fosfato dibásico y potásico para solución salina tamponada con fosfato (PBS), fueron suministrados por Sigma Aldrich.

### Síntesis de nanopartículas de sílice

Las nanopartículas de sílice (SNP) se sintetizaron siguiendo un método Stöber modificado. (W. Stober, A. Fink, E. Bohn, Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range, Journal of Colloid and Interface Science. 26 (1968) 62-69). Para la síntesis de nanopartículas de sílice, se añadieron tetraetoxisilano (TEOS) y amoniaco gota a gota y consecutivamente a 57 ml de etanol mientras se agitaba a 300 rpm a temperatura ambiente. La agitación continuó durante 24 h. El pH y el tamaño de partícula se midieron después de la síntesis. El material se recuperó por centrifugación (14 k, 30 min), se lavó con etanol para eliminar el amoniaco y TEOS sin reaccionar (3 veces). Después de redispersar el material en etanol por sonicación (FS20 Fisher Scientific), los productos se secaron durante la noche a 60 °C y una vez homogeneizados, se calcinó a 550 °C durante 4 h. Se usaron diferentes cantidades de TEOS (0,5 - 4 ml) y amoniaco (0,5 - 4 ml) para producir diferentes tamaños de partículas.

Las partículas por encima de 10 nm se sintetizaron siguiendo el método Stöber modificado y se recuperaron usando centrifugación como se describió anteriormente. Se obtuvieron diferentes tamaños de nanopartículas variando las cantidades de TEOS y amoniaco ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ). FIG. 1 muestra un gráfico del tamaño medio de partícula (nm) de las nanopartículas de sílice frente a la cantidad de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (%) añadido a la reacción. El tamaño promedio aumentó a medida que la cantidad de  $\text{NH}_4\text{OH}$  añadido aumentaba. Sigma Aldrich suministró nanopartículas de sílice Ludox para nanopartículas con tamaños promedio inferiores a 10 nm. Se aislaron nanopartículas de sílice por debajo de 50 nm por ultrafiltración y ultracentrifugación para proporcionar una reserva para experimentos de coagulación y funcionalización. FIG. 2 muestra un gráfico del rendimiento (%) de nanopartículas de sílice frente a la cantidad de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (%) añadido a la reacción. El rendimiento aumentó significativamente para  $\text{NH}_4\text{OH}$  en 4 % o más. La síntesis por debajo del 4 % de  $\text{NH}_4\text{OH}$  produjo un rendimiento inferior al 40 %. En algunos casos, una baja cantidad de amoniaco puede retrasar la catálisis de la reacción de hidrólisis de TEOS.

### Preparación de polímero de polifosfato

Polifosfato de cadena media (30-130 meros, "P70" se purificó a partir de vidrio de fosfato de fuente industrial disponible en el mercado ("P70", BK Guilini GmbH, Alemania). El polifosfato de cadena larga ("P700"), fue solubilizado a partir de vidrio de fosfato, calidad práctica, insoluble en agua (Sigma Aldrich) en  $\text{LiCl}$  250 mM +  $\text{LiOH}$  50 mM, pH 10,5 a 100 °C. El material se precipitó luego con  $\text{NaCl}$  50 mM en 2 veces el volumen de isopropanol, y se

resuspendió en H<sub>2</sub>O doblemente destilada.

Se usaron dos tamaños diferentes de polímero de polifosfato: P70, con una longitud de cadena promedio de 70 monómeros, y P700, con un intervalo de tamaños entre 200 y 1300 monómeros y una concentración máxima de aproximadamente 700 monómeros.

### Síntesis de nanopartículas de sílice-polifosfato

El polifosfato sintetizado se utilizó para funcionalizar las nanopartículas de sílice. Las nanopartículas de sílice se dispersaron por sonicación en agua Milli-Q y se colocaron a 30 °C. Luego se añadió polifosfato bajo agitación vigorosa. La agitación continuó durante 12 h. Las nanopartículas funcionalizadas se recuperaron después de dos etapas de centrifugación (14 k, 30 min), lavando con etanol, redispersar por sonicación en etanol y finalmente secar durante la noche a 60 °C. La funcionalización exitosa de las nanopartículas se identificó utilizando un instrumento de dispersión dinámica de luz (DLS).

### Caracterización de las nanopartículas

#### *Determinación del potencial Zeta y del tamaño de partícula*

El potencial Zeta y el tamaño de partícula se midieron por difracción láser usando un instrumento Zetasizer Nano ZS (ZEN 3600, Malvern Instruments) a 20 °C con una longitud de onda incidente de 633 nm y un ángulo de retrodispersión de 173°. El potencial Zeta se midió en agua a diferentes pH y en tampón PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, fosfato 12 mM). Las células desechables se limpiaron con etanol y agua antes de cargar la muestra. El tamaño de partícula se midió justo después de sintetizar las partículas (con etanol como disolvente) y después de la etapa de calcinación, se redispersó por sonicación en agua a 1 mg/ml. Las células desechables se limpiaron con cada disolvente respectivo antes de cargar la muestra.

Los ensayos de potencial Zeta mostraron que SNP tenían una carga negativa en el fluido corporal simulado, que puede facilitar la activación de la ruta intrínseca activando el Factor XII. El potencial Zeta no mostró cambios sistemáticos en la coagulación con respecto al tamaño o al pH.

FIG. 97 muestra un gráfico de tiempos de coagulación para varios SNP (por ejemplo, SNP, SNP+APTES, SNP+conector, SNP+APTES+conector, SNP+péptido, SNP+APTES+péptido, SNP+PEG y SNP+APTES+PEG; ver ejemplos a continuación para una descripción del conector y péptido). Los potenciales Zeta para cada tipo de partícula también se indican en el gráfico. SNP+PEG y SNP+APTES+PEG tenían potenciales zeta que eran menos negativos que otras partículas, que correspondían a tiempos de coagulación más largos. R. La relación entre el potencial zeta y el tiempo de coagulación para SNP con y sin 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) se muestra en la FIG. 98.

FIG. 99 muestra un gráfico del potencial zeta frente a la proporción de APTES/TEOS usada en la síntesis de SNP. Un potencial zeta más positivo indicó la presencia de grupos amino en la superficie de la partícula. FIG. 100 muestra un gráfico del potencial zeta frente a la relación APTES/TEOS para SNP calcinados y no calcinados. Con calcinación, el grupo amino se descompuso y el potencial zeta fue más negativo. FIG. 101 muestra un gráfico del tiempo de coagulación frente al potencial zeta para los SNP calcinados y no calcinados. Un potencial zeta negativo produjo un menor tiempo de coagulación.

#### *Morfología y estructura de las partículas*

La morfología, la estructura y el tamaño de partícula de las nanopartículas se determinaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las micrografías TEM se obtuvieron en un microscopio electrónico FEI Tecnai G2 Sphera con un voltaje de aceleración de 200kV.

Se descubrió que P70 directamente adsorbido en sílice aumenta ligeramente el tamaño de partícula (en varios nm). FIG. 4 muestra micrografías TEM de nanopartículas de sílice de tamaño medio de 55 nm.

#### *Cuantificación del polifosfato*

El contenido de polifosfato en las partículas se cuantificó por hidrólisis en monofosfato usando fosfatasa alcalina intestinal de ternera, seguido por análisis de fosfato usando un ensayo de verde malaquita.

### Determinación de la actividad de coagulación

La actividad de coagulación se determinó mediante dos métodos diferentes: coagulometría estándar y tromboelastometría rotacional (TEG) en un tromboelastograma (TEG® 5000, Haemonetics). Estos ensayos miden varios parámetros que son relevantes para la coagulación, como el tiempo inicial para la formación de coágulos (R, min), tasa de formación de coágulos ( $\alpha$ , grados), tiempo hasta que el coágulo alcance 20 mm (K, min) y la fuerza del

coágulo o la amplitud máxima (MA, mm). Para los ensayos, las partículas se dispersaron en HBS que contenía vesículas de fosfolípidos y se sonicaron. Los fosfolípidos eran 80 % de fosfatidicolina (PC) y 20 % de fosfatidilserina (PS) y se prepararon por sonicación a partir de las soluciones comerciales en cloroformo. Las diluciones posteriores se realizaron diluyendo la dispersión de reserva en este mismo disolvente.

Para los ensayos de coagulometría, se colocaron 50  $\mu$ l de las partículas en una cubeta de coagulómetro precalentada seguida de 50  $\mu$ l de plasma normal combinado (PNP). Después de incubar durante 33 minutos a 37 °C, para activar la ruta de contacto y permitir que la mezcla alcance la temperatura adecuada, se añadieron 50  $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub> 25 mM precalentado a la cubeta. Los resultados fueron los valores promedio de los ensayos duplicados.

En los ensayos TEG, primero se añadieron 340  $\mu$ l de plasma normal combinado (PNP) y 10  $\mu$ l del agente de coagulación en la copa de TEG y se incubaron a 37 °C. Después de 3 minutos, se añadieron 20  $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub> 0,2 M a la taza y el ensayo se inició inmediatamente después. Los resultados mostrados fueron el valor promedio de, normalmente, 4 a 6 repeticiones. Se realizaron análisis dependientes de la concentración y el tamaño.

### Resultados y análisis

Los experimentos se realizaron con nanopartículas de sílice (SNP) y nanopartículas de sílice funcionalizadas con polifosfato (SNP-P70) para medir el efecto del tamaño y la concentración de las partículas de sílice en la coagulación. Los experimentos de coagulación compararon las partículas de sílice a una concentración fija de 0,68 mg/ml (solución madre de 25 mg/ml) o a un tamaño fijo de 55 nm para determinar los límites del intervalo de alta actividad. Cada partícula formó un coágulo inicial (R) entre 3 y 5 min. El umbral para el valor R mínimo se produjo a un tamaño de partícula de ~30 nm. Los experimentos en donde se sintetizaron partículas por debajo de 20 nm exhibieron una distribución de tamaño bimodal cuando se midieron usando DLS, que puede atribuirse a una cantidad de amoníaco que era demasiado baja para la catálisis de la reacción de hidrólisis de TEOS.

Se realizaron experimentos de TEG para determinar el tiempo de coagulación, R, frente a la concentración (mg/ml) de nanopartículas de sílice (SNP) y nanopartículas de sílice funcionalizadas con polímero de polifosfato (SNP-P70) (70 cadenas de longitud de monómero) a 37 °C y Ca<sup>2+</sup> 10,8 mM. Como se muestra en la Figura 3, se examinó la dependencia de la concentración de R para SNP y SNP-P70. P70 era una cadena de polifosfato que tenía aproximadamente 70 monómeros de longitud. A bajas concentraciones de partículas, el valor R fue relativamente alto (por ejemplo, el tiempo de coagulación fue largo). A medida que aumentaba la concentración de partículas, R disminuyó hasta que se obtuvo un valor R mínimo. Para sílice desnuda (es decir, no funcionalizada), el valor R mínimo se produjo a 0,54 mg/ml.

SNP-P70 alcanzó un valor R mínimo a una concentración de 0,27 mg/ml, la mitad que el SNP desnudo. SNP-P70 también mejoró el tiempo de coagulación en comparación con P70 añadido directamente al plasma.

Se realizaron experimentos de TEG para determinar el tiempo de coagulación, R, para SNP-P70 y factor de tejido lipídico (LTF), un iniciador de proteínas de la ruta extrínseca, a varias diluciones de plasma normal combinado (PNP) a 37 °C y Ca<sup>2+</sup> 10,8 mM. La concentración de LTF usada fue de 0,5 ng/ml y la concentración de SNP-P70 usada fue de 0,27 mg/ml. Como se muestra en la FIG. 5, en comparación con LTF, SNP-P70 indujo una coagulación rápida incluso en condiciones de hemodilución.

Se realizaron experimentos para determinar el mecanismo por el cual las nanopartículas unidas a P70 inducen la coagulación determinando los tiempos de coagulación usando plasma deficiente en FXII (Figuras 6 y 7). A medida que activan la coagulación a través de la activación FXII y la ruta intrínseca, las nanopartículas desnudas en frío no inducen la coagulación. Con la ruta intrínseca bloqueada, la coagulación solo se produjo mediante la adición de factor tisular (TF) y la ruta extrínseca. Como P70 aceleró la coagulación mediante FXa, una combinación de TF y sílice unida a P70 mejoró la coagulación. Se probaron diversas mezclas de TF y nanopartículas. Los dos tiempos de coagulación más bajos (R) ocurrieron como resultado de 1 ng/ml de TF o 0,5 ng/ml de TF mezclado con 0,676 mg/ml de SNP-P70 (FIG. 6). Aunque las dos condiciones comparten un tiempo de coagulación similar, la sílice unida a P70 aceleró rápidamente el crecimiento del coágulo como se muestra por la puntuación de índice de coagulación (CI) significativamente mayor (FIG. 7). La sílice unida a P70 también exhibió la mejor reproducibilidad de todas las condiciones, lo que puede facilitar una reducción de los efectos secundarios adversos. El factor tisular formó un pequeño coágulo al agregarlo al plasma, pero el coágulo creció a un ritmo lento. Estos ensayos mostraron que las partículas unidas a P70 aumentaron la coagulación a través de la mediación de FXa y trombina, que puede facilitar el tratamiento de la hemorragia.

Se realizaron experimentos para determinar el tiempo de coagulación, R, para varias relaciones diferentes de polifosfato a SNP. En los experimentos se usó polifosfato que incluía aproximadamente 700 polifosfato monómero (P700). Se demostró que el polifosfato con un intervalo de tamaño superior a 500 meros acelera el contacto o la ruta intrínseca activando FXII. El P700 se unió al SNP usando los mismos métodos descritos anteriormente. Se probaron cuatro proporciones diferentes de P700:SNP:0,2, 0,4, 0,6 y 1. Similar a P70, los ensayos de coagulación mostraron que el tiempo de coagulación disminuyó con una relación de P700:SNP superior a 0,5. Como se muestra en la FIG. 8, una relación 1:1 de P700:SNP minimizó el tiempo de coagulación.

Se realizaron experimentos para determinar el efecto que la cantidad de polifosfato en el SNP funcionalizado tenía sobre la coagulación. Se probaron muestras de 200 mg de nanopartículas de SNP, SNP-P70 y SNP-P700 para cuantificación de polifosfato y los ensayos de coagulación. Estos ensayos mostraron que las partículas SNP-P70 con una concentración 25 nmolar de  $PO_4$ / mg de SNP (cuantificado por hidrólisis) exhibió una mayor actividad procoagulante que las partículas SNP-P70 con un mayor concentración nmolar de  $PO_4$ / mg de SNP.

Además de TEG, la respuesta del umbral de coagulación también se observó usando un colorante de cumarina azul específico de trombina. Estos experimentos usarán un método desarrollado por el grupo Ismagilov (Kastrup, C J, Shen, F, Runyon, M K, *et al.* (2007). Characterization of the threshold response of initiation of blood clotting to stimulus patch size. *Biophysical Journal*, 93(8), 2969-77). Se añadió una pequeña concentración de colorante al plasma recalcificado. A medida que progresaba la coagulación y se producía trombina, la trombina escindió el colorante de cumarina que causó la fluorescencia de la solución. Representado por fluorescencia rápida, el estallido de trombina condujo rápidamente a la formación de coágulos. Un microscopio de fluorescencia capturó el cambio cualitativo como se muestra en la FIG. 9.

La generación de trombina también se controló usando un lector de placas. Al leer la fluorescencia cada 10 segundos, se identificó el estallido de trombina. Como la coagulación se produjo cerca de la sección de rápido aumento de la explosión de trombina, el tiempo de coagulación se determinó a partir del gráfico de datos de fluorescencia. FIG. 10 muestra un gráfico de intensidad de fluorescencia (u.a.) frente al tiempo para diversas concentraciones de SNP y SNP-P70 (véase FIG. 10(a)), y un gráfico del tiempo de coagulación (tiempo medio, s) frente a la concentración (mg/ml) para SNP y SNP-P70 (véase FIG. 10(b)).

Se realizaron experimentos para determinar la actividad hemostática en diversas condiciones de coagulopatía, tal como dilución, hipotermia y acidosis. Se probó una condición de dilución usando una solución tamponada con fosfato (PBS). La hipotermia se probó incubando plasma por debajo de los 37 °C habituales, Creando una condición hipotérmica. La acidosis se probó usando una solución diluida de ácido fosfórico para acidificar el plasma a pH inferior a 7,1. Los experimentos usaron una concentración establecida de factor de tejido lipidado (LTF) - 0,5 ng/ml para ensayos de TEG, 0,185 ng/ml para ensayos de colorante de fluorescencia - para garantizar el inicio oportuno de la cascada de coagulación a través de la ruta extrínseca y la respuesta principal del cuerpo a la lesión del vaso. El SNP-P70 se probó a 0,25 mg/ml sin LTF para comparar su capacidad de formar coágulos.

Usando TEG y fluorescencia de colorante, se estableció una línea base de dilución. Se añadió SNP-P70 a la concentración umbral (es decir, concentración que dio como resultado un tiempo de coagulación mínimo, R) de 0,25 mg/ml identificado en los experimentos de TEG anteriores. Como se muestra en la FIG. 11(a), SNP-P70 redujo el tiempo de coagulación en muestras diluidas. FIG. 11(b) muestra un gráfico del tamaño del coágulo, MA, (mm) frente a % del plasma normal combinado (PNP). Los resultados de los experimentos de fluorescencia de colorante en diversas condiciones de dilución se muestran en las Figs. 12(a) y 12(b). FIG. 12(a) muestra un gráfico de fluorescencia frente al tiempo (s) para tiempos de generación de trombina de 100 % de plasma a 25 % de plasma (es decir, 100 % de plasma es 100 % de plasma y 0 % de diluyente) sin SNP-P70 añadido. FIG. 12(b) muestra un gráfico de fluorescencia frente a tiempo (s) para tiempos de generación de trombina en diversas condiciones de dilución para muestras con SNP-P70 añadido. Como se muestra en la FIG. 12(b), la adición de SNP-P70 generó trombina rápidamente incluso en condiciones de dilución de plasma.

La hipotermia ocurre cuando la temperatura corporal cae por debajo de los 37 °C. La caída de la temperatura puede conducir a una disminución en la cinética de muchos de los factores de coagulación, como formación del complejo factor tisular - FVIIa (TF-FVIIa) durante la fase de iniciación de la coagulación.

FIG. 13(a) muestra un gráfico del tiempo de coagulación, R, (min) frente a temperatura (°C) para experimentos para determinar la actividad hemostática de SNP-P70 en condiciones hipotérmicas. FIG. 13(b) muestra un gráfico del índice de coagulación (IC) frente a la temperatura (°C) para SNP-P70 en condiciones hipotérmicas. La adición de SNP-P70 al plasma hipotérmico dio como resultado mejor coagulación en todos los parámetros de TEG, incluyendo una disminución del tiempo de coagulación y un aumento del índice de coagulación. El índice de coagulación (IC) mostró que SNP-P70 tenía una actividad procoagulante significativa. El índice de coagulación (IC) combina las cuatro facetas del TEG - R, K, alfa y MA - en un solo valor; cuanto más positivo sea el CI, más fuerte es el procoagulante.

Los experimentos descritos anteriormente muestran que SNP-P70 tiene una actividad hemostática significativamente mayor que SNP y LTF desnudos en la reducción de los tiempos de coagulación mientras se forman coágulos fuertes. Los experimentos con plasma deficiente en FXII mostraron que SNP-P70 inició la coagulación a través de la ruta de coagulación FXa. SNP-P70 también disminuyó el tiempo de coagulación y aceleró la generación de trombina en condiciones coagulopáticas, tales como dilución e hipotermia.

### Nanopartículas PEGiladas

*Protocolos experimentales*

Funcionalización de SNP con APTES

Se añadieron 0,5 g de SNP y 50 ml de etanol a un matraz y se sonicó. Se añadió 1 µl de APTES mientras se agitaba vigorosamente. La mezcla se agitó 24 horas a TA. Después de 24 horas, la mezcla se puso en tubos de centrifuga y se centrifugó durante 30 minutos a 14k. El sobrenadante se descartó, se añadió etanol y la mezcla se sonicó. La mezcla se centrifugó durante 30 minutos a 14k. El sobrenadante se descartó, se añadió etanol y la mezcla se sonicó. El SNP-APTES resultante se secó durante la noche a 60 °C.

PEGilación de SNP para producir SNP-APTES-PEG-OCH<sub>3</sub>

Se prepararon 12,5 mg de SNP-APTES en 250 µl de NaOH 1 mM (50 mg/ml). Se prepararon 2 mg de NHS-PEG-OCH<sub>3</sub> en 25 µl de DMSO (2 kDa, 5kDa, 20kDa). Se añadieron 25 µl de solución de PEG por 250 µl de SNP-APTES a los SNP-APTES. La mezcla se sonicó e incubó 15 minutos a TA. La mezcla se centrifugó 2x durante 5 minutos a 3,5k, y se limpió con DI. El volumen se llevó a 250 µl, y la mezcla se sonicó.

Adición de grupo de enlace a SNP-APTES

Se usaron cuatro conectores diferentes.

Conector	PM (g/mol)
SPDP-PEG8-NHS	735,87
SPDP-PEG16-NHS	1087,30
SPDP-PEG2k-NHS	2000
SPDP-NHS	312

Se dispersaron 50 mg/ml de las partículas SNP-APTES en NaOH 10 mM (por ejemplo, 25 mg en 495 µl de DI y 5 µl de NaOH 0,1 M). La mezcla se sonicó. Se añadieron 5 µl del conector en DMSO (10 mM) por 500 µl de SNP-APTES, pH 7-8 (conector final 100 µM). La mezcla se sonicó. La mezcla se incubó de 30 minutos a 2 horas a TA. La mezcla se centrifugó 2x durante 10 minutos a 6k, y se limpió con DI, pH 5-8. El volumen se llevó a 500 µl con agua Milli-Q.

Adición de péptido a SNP-APTES-Conector

Se usaron los siguientes péptidos.

Nombre largo	Nombre corto	Uso	PM
<b>Ac-CGGIEGRGGSGGKG-NH<sub>2</sub></b>	<b>C-IE-GK (CG-14)</b>	Este péptido incluye: una Cys, para unirse al conector OPSS; una secuencia IEGR para su reconocimiento por FXa; y una Lys, en donde se añadió el PEG.	1232,34
<b>Ac-CGGIEGRGGK(FAM)GGKG-NH<sub>2</sub></b>	<b>C-IE-FK (CG-14)</b>	Este péptido incluía una Cys para unirse al conector; una secuencia IEGR para escisión; un colorante de fluoresceína (FAM) usado para controlar la escisión; y una Lys para la unión NHS-PEG. La fluoresceína (FAM) estaba en el lado derecho del sitio de escisión, dando como resultado fluoresceína en el sobrenadante después de la escisión por FXa.	1631,78
<b>FAM-x-CGGIEGRGGSGGKG-NH<sub>2</sub></b>	<b>CF-IE-GK (CG-14)</b>	Este péptido incluía una Cys para unirse al conector; una secuencia IEGR para escisión; un colorante usado para controlar la escisión; y una Lys para la unión NHS-PEG. La fluoresceína (FAM) estaba en el lado izquierdo del sitio de escisión, dando como resultado fluoresceína restante en la partícula después de la escisión por FXa.	1661,79
<b>FAM-x-CGGERGIGGSGGKG-NH<sub>2</sub></b>	<b>CF-Ersc-GK (CG-14)</b>	Este péptido incluía una Cys para unirse al conector; un colorante usado para controlar la escisión; y una Lys para la unión NHS-PEG. El péptido no incluye la secuencia IEGR necesaria para la escisión por FXa.	1661,79

Se prepararon soluciones peptídicas en agua Milli-Q, por ejemplo, 0,75 mM. Las concentraciones de péptido usadas fueron: (a) 1,1 mg/ml de C-IE-GK, (b) 2 mg/ml de C-IE-FK, (c) 2,1 mg/ml CF-IE-GK, y (d) 2,1 mg/ml CF-Ersc-GK. Se añadieron 50 µl de la solución de péptido a 500 µl de solución de partículas (partículas de 50 mg/ml). La mezcla se incubó durante 10 minutos a TA, y luego se centrifugó 10 minutos a 6k. El sobrenadante se eliminó y el producto de reacción se lavó con DI, y el volumen se llevó a 500 µl. La centrifugación y el lavado se repitieron, y el volumen se llevó a 500 µl con agua Milli-Q.

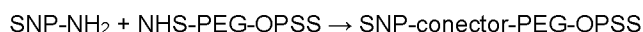
Funcionalización de SNP mediante SPDP

Se prepararon nanopartículas con la siguiente estructura: SNP-APTES-SPDP-cysPep-K-PEG-OCH<sub>3</sub>.

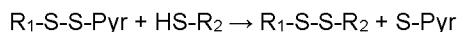
- 5 El SNP se preparó añadiendo gota a gota 7,6 ml de TEOS a una solución agitada de 280 ml de etanol. Se añadieron 11,4 ml de NH<sub>4</sub>OH (28 %) gota a gota y la mezcla se agitó durante 24 horas. La mezcla se centrifugó 3x durante 30 minutos a 13k y se lavó con etanol. Los SNP se secaron durante la noche a 60 °C. Los SNP se calcinaron a 550 °C durante 4 horas.
- 10 SNP-APTES se preparó añadiendo 0,5 g de SNP en 50 ml de etanol y sonicando. Se añadió APTES mientras se agitaba vigorosamente. La mezcla se agitó durante 24 horas, y luego se centrifugó 2x durante 30 minutos a 13k, y se limpió con etanol. El SNP-APTES se secó a 60 °C durante la noche y luego se molió con un mortero.
- 15 Se añadió 3-(2-piridilditio)propionato de succinimidilo (SPDP) como sigue. Se dispersaron 50 mg/ml de SNP-APTES en NaOH 10 mM (por ejemplo, 25 mg en 495 µl de DI y 5 µl de NaOH 0,1 M) y se sonicó. Se prepararon 3,1 mg/ml de SPDP en DMSO (PM 312) (reserva 10 mM) (por ejemplo, 1 mg en 320 ml). Se añadieron 5 µl de SPDP por 500 µl de SNP-APTES, pH 7-8 (SPDP final 100 µM) y la mezcla se sonicó. La mezcla se incubó de 30 minutos a 2 horas a TA. La mezcla se centrifugó 2x durante 10 minutos a 6k, y se limpió con DI, pH 5-8. El volumen se llevó a 500 µl.
- 20 Se añadió un péptido como sigue. A la solución anterior se añadieron 50 µl de 2 mg/ml de cys-péptido-K (por ejemplo, biotina-x-CDGSRPARSGR"SAGGKDA-OH) y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó 2x durante 5 minutos a 6k, y se limpió con DI. El volumen se llevó a 500 µl.
- 25 SNP-APTES-SPDP-cysPep-K se PEGiló como sigue. Se prepararon 4 mg de NHS-PEG-OCH<sub>3</sub> en 50 µl de DMSO (2k PEG o más). Se añadieron 50 µl de solución de PEG por 500 µl de SNP-APTES-SPDP-cysPep-K y la mezcla se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó 2x durante 10 minutos a 6k, y se limpió con DI. El volumen se llevó a 500 µl.
- 30 La estructura resultante fue SNP-APTES-SPDP-cysPep-K-PEG-OCH<sub>3</sub>. Las nanopartículas protegidas con PEG no fueron coagulantes.
- El conector peptídico escindible se escindió añadiendo una enzima como sigue. Hasta 50 µl de SNP-APTES-SPDP-cysPep-K-PEG-OCH<sub>3</sub> se añadieron 50 µl de enzima uPA (activador de plasminógeno de uroquinasa) o tripsina, y la mezcla se sonicó, 10-60 min (por ejemplo, 30 min) a 37 °C. La mezcla se centrifugó, se lavó y el volumen se ajustó a 50 µl con DI.
- 35 La estructura ahora era SNP-APTES-SPDP-cysPepR-OH, y era hemostáticamente activa.

Conversión de SNP-APTES a PEG-OPSS y acoplamiento a biomolécula

- 40 Reacciones:



- 45 OPSS es S-S-Piridilo, que reacciona con tioles para formar un producto disulfuro:



- 50 en donde R<sub>1</sub> es la nanopartícula, R<sub>2</sub> es la biomolécula

- 0,1 g de SNP-APTES (220 nm de diámetro) se dispersaron en 5 ml de DI con sonicación. NHS-PEG-OPSS 5kDa, 10 mg, se disolvió en DMSO (0,5 ml). La solución de PEG se añadió a la solución SNP-APTES y la mezcla se sonicó. El pH se ajustó a pH 7 con tampón HEPES. La mezcla se sonicó e incubó 1 hora. La mezcla se centrifugó y se limpió 2-3x con tampón de lavado. El volumen se llevó a 5 ml. La reacción de acoplamiento a una biomolécula que contiene tiol se realizó mediante la adición de 200 µl de SNP-conector-PEG-OPSS, 200 µl de tampón (Hepes 1 M) y 20 µl de 1 mg/ml de péptido en Hepes 1 M. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, se aclaró 3 veces y se almacenó a 4 °C.

Resultados y análisis

- 60 Se prepararon nanopartículas PEGiladas que incluían un grupo de unión de péptido escindible con una secuencia IEGR que conectaba la nanopartícula al PEG (FIG. 14). El factor X activado (FXa) escindió el péptido en la secuencia IEGR, eliminando el PEG y dejando el SNP activado.
- 65 FIG. 15 muestra un gráfico del tiempo de coagulación, R, frente a 3-aminopropil trietoxisilano (APTES) para proporción de SNP, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. FIG. 16 muestra un gráfico del tiempo

de coagulación, R, para SNP no funcionalizado y varios SNP funcionalizados (Pép: péptido; SPDP: 3-(2-Piridilditio)propionato de succinimidilo; PEG usado fue 2kDa), de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

- 5 Cuando se unen a la superficie de nanopartículas, los reticuladores tales como 3-aminopropil trietoxisilano (APTES) redujeron la superficie activa para la coagulación (FIGS. 15 y 16). La proporción de APTES a sílice se redujo para obtener un SNP de PEG-conector-APTES-sílice que retendría una naturaleza doble - inerte en los vasos sanguíneos sanos mientras se convierte en procoagulante cuando se activa mediante una proteasa específica del conector. Cuando se funcionaliza únicamente con APTES, a baja cobertura, el SNP retuvo su naturaleza procoagulante.
- 10 Cuando el PEG se unió a estas nanopartículas mediante APTES, el SNP quedó protegido. El acoplamiento de PEG (2 kDa o más, por ejemplo, 5 kDa) aumentó los tiempos de coagulación hasta el del plasma recalcificado normal. La eliminación de PEG activó la actividad procoagulante del SNP.

## Ejemplo 2

### 15 Diseño de partículas y ensayos

Se realizaron experimentos para conjugar poliP sobre las superficies de partículas orgánicas e inorgánicas para investigar los efectos de las propiedades de la superficie de las partículas (es decir, cargas superficiales y ligandos) y los tamaños de las partículas. Las partículas híbridas se generaron con polímeros térmicamente sensibles o con respuesta química y poliP en la superficie. En las condiciones del interruptor (tales como temperatura más baja o productos químicos sobreexpresados), los cepillos de polímero se extendieron o se plegaron para proteger o exponer los ligandos de la superficie tal como poliP.

25 En ciertas realizaciones, poliP activa y acelera la cascada de coagulación. En algunos casos, las etapas en la coagulación son mejoradas por poliP. La dependencia del tamaño de las actividades procoagulantes de poliP mostró que los polímeros de poliP más cortos aceleraban la activación de los factores V y XI, mientras que los polímeros poliP más largos iniciaban la coagulación mediante la ruta de contacto (FIG. 17). En algunos casos, la actividad procoagulante específica de las nanopartículas que contienen poliP se puede adaptar variando las longitudes de polímero poliP usadas, así como controlando la cantidad de poliP por partícula. Las partículas de poliP pueden tener la capacidad de inducir la coagulación de manera controlada y dirigida, en comparación con poliP libre. Sin limitarse a ninguna teoría particular, en algunos casos, las partículas de poliP pueden interactuar con el plasma sanguíneo y causar una serie de eventos, incluyendo la adsorción de albúmina, IgG y fibrinógeno, adhesión y activación plaquetaria, y trombosis. PoliP de reducir el tiempo de coagulación, dependiendo de la concentración, tamaño y propiedades superficiales de las partículas.

Se realizaron experimentos para unir covalentemente poliP a aminas primarias, facilitando el ensamblaje de nanopartículas de poliP. Esta reacción usó el reactivo de reticulación de longitud cero, EDAC (1-etil-3-[3-dimetilamino]propil]carbodiimida), para promover la formación de enlaces estables de fosforamido entre aminas primarias y los fosfatos terminales de poliP. En los extremos de poliP pueden usarse otros grupos funcionales, con el fin de ampliar los tipos de reacciones de acoplamiento que pueden usarse. Casi el 80 % del marcado final se logró usando poliaminas como espermina y espermidina. El producto de reacción contenía aminas primarias unidas a los extremos de los polímeros poliP, que reaccionaron con una amplia variedad de reactivos derivados que se dirigen a las aminas primarias. Los grupos sulfhidrilos libres también se pueden introducir en los términos de los polímeros poliP marcados, para usar químicas de marcado de sulfhidrilo.

También se pueden usar múltiples grupos de superficie de aminas terminales para conjugar un número controlado de poliP con estas aminas de superficie. Los dendrímeros G4Poli(amido amina) (PAMAM) se asocian estrechamente con poliP y pueden servir como plataforma para ensamblar nanopartículas que contienen poliP. La conjugación de PoliP con tres tipos de partículas (por ejemplo, dendrímeros G4Poli(amido amina) (PAMAM), amino poliestireno, y ligandos de amina unidos a nanopartículas de oro) fueron investigados para verificar tres hipótesis: (1) la cinética y el mecanismo de coagulación del plasma se vieron afectados por el tamaño (o curvatura) de las partículas y se pudo seleccionar una condición optimizada; (2) la elección del material central biocompatible no tendría efectos significativos sobre la cinética o mecanismo de coagulación del plasma; y (3) las funcionalidades de las partículas se determinaron por las propiedades de la superficie (por ejemplo, neutro frente a cargado y la longitud de la cadena de los poliP).

En ciertas realizaciones, el número total de cadenas de PoliP afectó la coagulación del plasma. En algunos casos, el mecanismo y el tiempo de coagulación cambiaron con las cadenas libres de poliP. Se seleccionaron tres grupos de control para comparar con los conjugados de partículas-poliP: (1) poliP libre con el mismo peso molecular a la misma concentración; (2) poliP lineal con el peso molecular equivalente a la suma de poliP el peso molecular unido a una sola partícula (por ejemplo, peso molecular de poliP multiplicado por el número de conjugación); y (3) partículas sin poliP.

### Conjugación de Dendrímtero-poliP

PoliP (45-meros) se conjugó con el dendrímtero G4 PAMAM, que tenía 64 aminas primarias en la superficie. El reactivo de reticulación de longitud cero, EDAC se usó para acoplar aminas primarias a fosfatos mediante enlaces fosforamidato. La separación de poliP libre y conjugado de dendrímtero-poliP se realizó empleando columnas de tamaño exclusivo. La eficacia de la coagulación del plasma se probó usando un coagulómetro basándose en viscosidad.

Para descubrir las condiciones optimizadas para la conjugación, se probaron diversas condiciones, tales como la temperatura, pH y el tiempo de reacción. El ensayo de fluorescamina se usó para evaluar la cantidad de aminas primarias sin reaccionar en el dendrímtero, indicando la eficacia de conjugación.

La eficacia de conjugación bajo diversas condiciones se probó y se mostró en la FIG. 18. Las reacciones fueron más eficaces en condiciones de pH bajo. La concentración de amina antes de la reacción fue de aproximadamente 3400 nM. En algunos casos, hubo una mayor concentración de amina después de la reacción en comparación con el control, que se debió a la degradación del dendrímtero (discutido a continuación). La condición optimizada se seleccionó como 4 horas a 37 °C y pH 4, después de lo cual >80 % de la amina primaria en el dendrímtero había reaccionado con poliP.

### Estabilidad de dendrímtero y poliP

La estabilidad de poliP a 37 °C después de 24 horas se probó en función del pH (FIG. 19). En comparación con la muestra a pH 7,4, no hubo aumento de fosfato libre, lo que indica poca degradación. Por tanto, poliP fue estable durante las primeras 24 horas a 37 °C y tan bajo como pH 2. También se probó la estabilidad del dendrímtero en diversas condiciones. Por debajo de pH 4 y por encima de 32 °C, más del 25 % de dendrímtero se degradó en 4 horas. A 20 °C y pH 4, el dendrímtero fue estable durante las primeras 4 horas y aproximadamente el 10 % de la degradación ocurrió a las 24 horas. Las columnas de separación Econo-Pac 10DG se usaron primero para separar los conjugados libres de poliP y dendrímtero-poliP. La recuperación del dendrímtero dependía en gran medida de la fase de ejecución. Cuando se usó agua purificada como fase de ejecución, como se muestra en la FIG. 20, el dendrímtero eluyó en la fracción 9, pero la recuperación del dendrímtero fue solo de aproximadamente 5 %. En algunos casos, el dendrímtero puede haber quedado atrapado en la columna debido a interacciones iónicas. Por tanto, en experimentos posteriores, se usaron tampones con una concentración de sal de al menos 20 mM para eliminar el efecto de las interacciones iónicas entre el gel y el soluto. Como ejemplo, con tampón ácido de borato 25 mM a pH 9, el dendrímtero eluyó en la fracción 4 y la tasa de recuperación fue superior al 85 % (FIG. 21). El conjugado de dendrímtero-poliP se separó luego en la columna (FIGS. 22 y 23). Los dendrímteros eluyeron en la fracción 6, mientras que el pico de poliP fue de la fracción 5 a la fracción 7. Por tanto, no se logró la separación de poliP libre del conjugado a través de la Columna Econo-Pac 10 DG.

Las columnas de exclusión por tamaño empaquetadas con gel Bio-Gel® P-10 se usaron luego para la separación de poliP conjugado del poliP sin reaccionar. Se seleccionó el gel Bio-Gel® P-10 con un intervalo de fraccionamiento de peso molecular (PM) de 1.500-20.000, que era adecuado para separar la conjugación de dendrímtero poliP (PM>20.000) de los no reaccionados (PM<13.700). El dendrímtero eluyó en la fracción 10 y el poliP salió en la fracción 9 (FIGS. 24 y 25), que se consideró separación insuficiente.

Otro método de separación probado fue con "glass milk", que consistía en partículas de sílice en solución acuosa. Se añadió 1 µl de *glass milk* a 500 µl de reacción de dendrímtero-poliP. El *glass milk* y la reacción se mezclaron luego durante 30 minutos con agitación ocasional. Después de mezclar, la solución se centrifugó luego durante 10 minutos a 3.500 RPM. Se recogió el sobrenadante purificado y se realizó el ensayo de verde de malaquita (que cuantificó el fosfato después de la digestión ácida de poliP) para cuantificar la concentración de poliP frente a la misma reacción que no se había sometido a purificación de *glass milk*. FIG. 26 muestra una disminución en la concentración de fosfato de más del 90% antes y después de la separación de la *glass milk*.

El ensayo de *glass milk* se realizó nuevamente y se realizaron los ensayos de verde de malaquita y fluorescamina para garantizar que el *glass milk* solo eliminara el poliP libre y que el dendrímtero permaneciera en solución. Los resultados en la FIG. 27 indicaron una separación menos eficaz de poliP que en el experimento anterior, así como una disminución similar en las concentraciones de amina primaria y poliP antes y después del ensayo de *glass milk*. La concentración de amina primaria en la reacción de control aumentó desde la cantidad inicial esperada antes de la reacción, lo que puede deberse a la degradación del dendrímtero que reacciona con el tiempo.

### Ensayos de coagulación

Los tiempos de coagulación del plasma se probaron usando un coagulómetro. La muestra fue conjugado de dendrímtero-poliP que reaccionó a 37 °C, pH 4 durante 24 horas. El tiempo de coagulación para esta muestra fue de 143,8 segundos (FIG. 28).

### Conjugación de poliestireno (PS)-poliP

Se realizaron experimentos para hacer una conjugación de poliestireno (PS)-poliP. El procedimiento general para

realizar la conjugación PS-poliP fue el siguiente:

- Se prepararon reacciones de 1-2 ml usando condiciones descritas previamente en reacciones de amina poliP.
- Se añadieron 250 mM de poliP de 45-meros de una solución acuosa a granel hecha de vidrio de fosfato sódico adquirido en Sigma Aldrich.
- Se añadió a la reacción tampón MES 100 mM pH 4.
- Se añadió 300 mM de EDAC a la reacción para activar la reacción entre poliP y la amina primaria.
- La cantidad de amina primaria en la superficie de la partícula PS se caracterizó usando un ensayo de fluorescamina. Se añadieron 0,21 mM de amina primaria a la solución.

Esto fue aproximadamente 5 veces menos que la concentración de cadenas de poliP.

- La reacción se llevó a volumen con agua DI.
- Se permitió que la reacción continuara durante hasta 24 horas con agitación vigorosa con las concentraciones de amina primaria consumidas probadas en varios momentos.

Se usaron perlas de poliestireno (diámetro de 50 nm) con amina primaria como grupo funcional de superficie para conjugar poliP. La condición de reacción fue 20 °C y pH 4. Después de 24 horas, más del 60 % de la amina primaria se hizo reaccionar con poliP (FIG. 29).

Se probó la estabilidad de las perlas de PS. Como se muestra en la FIG. 30, la cantidad de amina era estable a 20 °C, pero aumentó a 37 °C. En algunos casos, esto puede deberse a que a mayor temperatura y pH bajo, los grupos amina enterrados dentro de las partículas podrían quedar expuestos en la superficie, lo que puede dar como resultado una subestimación de la eficacia de la reacción.

#### Conjugación de nanopartículas de oro-poliP

Se realizaron experimentos para hacer una conjugación de nanopartículas de oro-poliP. El procedimiento general para hacer la conjugación de nanopartículas de oro-poliP se muestra a continuación.

##### *Mecanismo de reacción general:*

- A. Se preparó una solución a granel de los ligandos de tiol-amina de 10,2 mM en agua y se almacenó a 4 °C.
- B. PoliP y los ligandos de amina se hicieron reaccionar como se describió previamente con una relación de exceso 5:1 de poliP. Las reacciones se realizaron en tampón MES a pH 4 a 37 °C y a temperatura ambiente (25 °C).
- C. La cantidad de ligando que reacciona se determinó usando el ensayo de fluorescamina.
- D. Los ligandos que reaccionan con tiol se unieron a nanopartículas de oro recubiertas con citrato de 5 nm mediante la adición de una dilución 20x de la reacción del ligando con un exceso de ligando de tiol 50:1 a las nanopartículas de oro. Aproximadamente 12-16 ligandos se unieron a cada nanopartícula basándose en estudios que encontraron que 130 ligandos normalmente se unían a nanopartículas de oro de 15 nm.
- E. La mezcla se sometió a vórtice periódicamente y se mezcló continuamente durante 8 horas.
- F. La mezcla de nanopartículas de oro se centrifugó a 13.500 RPM durante 20 minutos para eliminar el exceso de poliP y ligandos no unidos.
- G. El sobrenadante se retiró y el sedimento se lavó y se resuspendió con 450 µl de agua DI.
- H. La centrifugación y el lavado se repitieron dos veces.
- I. Espectroscopía UV, Se realizaron ensayos de verde de malaquita y ensayos de fluorescamina para cuantificar el número de cadenas de PoliP unidas a la superficie de la nanopartícula de oro.

Un estudio preliminar de la reacción de ligandos de amina con poliP a 37 °C demostró que los niveles de amina primaria disminuyeron aproximadamente el 75 % después de 24 horas de reacción, indicando un 75 % de reacción completa de amina con poliP. Sin embargo, el nivel de amina primaria aumentó a aproximadamente la mitad de su concentración de control después de 48 horas, lo que sugiere que los enlaces pueden haberse hidrolizado. La concentración de amina en el control a 37 °C no cambió sustancialmente, lo que puede indicar que la diferencia en la concentración de amina de reacción no puede explicarse por el ensayo en sí mismo (FIG. 31). Una curva de calibración de la concentración de amina primaria a longitudes de onda de excitación y emisión de 410 y 480 nm, respectivamente, se muestra en la FIG. 32.

Se demostró que la reacción del ligando de tiol-amina con poliP a temperatura ambiente se había completado entre el 75 % y el 80 % de los ligandos en solución. FIG. 33 detalla los resultados de la optimización de la reacción. Las concentraciones en el esquema de reacción anterior excepto con una concentración de 0,42 mM de ligando unido a amina, produjo aproximadamente una relación 5:1 de cadenas de poliP a amina. La comparación de las reacciones realizadas a 37 °C con las realizadas a temperatura ambiente indicó que los enlaces de la amina-poliP se hidrolizaron a 37 °C con el tiempo. Por tanto, ambas reacciones tuvieron eficacia similares y después de 72 horas a temperatura ambiente se consumió más del 75 % de amina.

Se probaron diferentes proporciones de poliP a amina, que puede afectar las relaciones finales de ligando de amina-tiol al ligando de poliP-tiol. Las reacciones completadas mezcladas con nanopartículas de oro se sedimentaron después de la centrifugación (FIG. 34).

- 5 La modificación de las nanopartículas de oro también se puede realizar, tal como, pero sin limitación: (1) producción de varios tamaños de partículas; (2) modificación con otros mecanismos de reacción; y (3) separación y purificación. Para demostrar que el material del núcleo no afecta sustancialmente la cinética de coagulación, se pueden realizar experimentos para: (1) comparar los conjugados de oro-poliP con otras partículas, y (2) reticular una fina capa de polímero y luego disolver el oro.

10

### Diseño de partículas y ensayos

Se realizaron experimentos para diseñar y sintetizar materiales de nanopartículas sólidas y porosas que presentan biocompatibilidad y rápida formación de trombos. En ciertas realizaciones, las nanopartículas restringieron la actividad a una región local de actividad de coagulación por encima del umbral. Se realizaron experimentos en dos nanopartículas - sílice procoagulante y titania compatible con implantes médicos. Los armazones de nanopartículas se funcionalizaron con un compuesto procoagulante - trombina, factor tisular, o poliP - para formar una partícula intercambiable de umbral (TSP) que promovió aún más la formación de coágulos. La trombina, una proteína en la cascada de coagulación, tiene un radio hidrodinámico de aproximadamente 8,4 nm. Una nanopartícula porosa con un tamaño de poro mínimo de 10 nm se puede cargar con trombina. La caracterización de las partículas incluyó microscopía, potencial zeta, dispersión dinámica de luz, y otros ensayos. Los experimentos de coagulación con plasma de tromboelastografía (TEG) se usaron para estudiar la actividad procoagulante de nanopartículas funcionalizadas y no funcionalizadas introducidas en plasma normal combinado recalcificado (PNP).

15

20

### 25 Síntesis de nanopartículas de sílice - espuma mesocelular

Se realizaron experimentos para sintetizar una nanopartícula porosa con un diámetro menor que 200 nm y un tamaño de poro mayor que 20 nm. Una nanopartícula de este tamaño puede facilitar una reducción en el daño a los órganos, mientras que es capaz de transportar y suministrar trombina y otros factores de coagulación.

30

Se realizaron experimentos para sintetizar una espuma mesocelular mesoporosa con un tamaño de poro de 26 nm (MCF-26) y un diámetro de partícula inferior a 1 µm. Se crearon espumas mesocelulares (MCF) con poros de 11,2 nm, 24,3 nm y 30,9 nm de tamaño de poro. Las espumas se caracterizaron usando BET. El tamaño de la ventana se determinó a partir de isotermas de desorción usando el método Broekhoff de Boer (BdB); el tamaño de poro de la isoterma de adsorción usando el mismo método BdB. Los diámetros de partícula se midieron usando imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM). Los experimentos demostraron la capacidad de definir con precisión los tamaños de poro en el intervalo deseado para la administración de enzimas y biomoléculas grandes usando un tamaño de partícula < 200 nm, que puede ser útil para la administración cardiovascular.

35

- 40 Se usó un segundo procedimiento de síntesis para la síntesis de partículas de sílice mesoporosa floculada (FMS) con morfología de nanofibras o nanoesferas (FMS-nf, FMS-ns). FMS-nf y FMS-ns fueron elegidos para sintetizar nanopartículas por debajo de 200 nm. La dispersión dinámica de la luz indicó un tamaño de partícula de 250 +/- 50 nm. Los experimentos de protección y coagulación se realizaron usando nanopartículas de sílice FMS.

40

- 45 Estos dos procedimientos usaron solución sol gel o precursores de sílice coloidal. La metodología de síntesis de sílice se basó en el método de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) para la administración de fármacos como se muestra en FIG. 35A y 35B. El procedimiento de síntesis de sílice utilizó trimetilbenceno (TMB) y NH<sub>4</sub>F usado en la síntesis de MCF; y un copolímero tribloque, P123, combinado con un tensioactivo catiónico, CTAB, para crear un precursor de sílice líquido. Usando esta estrategia, se sintetizaron partículas de sílice con un diámetro medio de nanopartículas de 125 +/- 25 nm. El tamaño de poro de 18,2 nm fue suficiente para incrustar trombina.

50

Se analizaron las isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno y la distribución del tamaño de poro para las tres espumas mesocelulares. FIG. 36 muestra el patrón de difracción de rayos X y FIG. 37 muestra las imágenes de microscopía electrónica de barrido para MCF-24. FIG. 38 muestra un gráfico de distribución del tamaño de poro de la rama de desorción calculada de las espumas mesocelulares por el método BJH. FIG. 39 muestra un gráfico de la distribución del tamaño de poro de la rama de desorción calculada de sílice porosa por el método BJH. Finalmente, La Tabla 1 enumera las propiedades de las tres espumas mesocelulares.

55

**Tabla 1 - Propiedades textuales de espumas mesocelulares sintetizadas**

Muestra MCF	Tamaño de ventana BJH (nm)	Tamaño de celda BJH (nm)	Área superficial BET (m <sup>2</sup> /g)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)
MCF-11	11,2	19,3	591,7	1,7
MCF-24	24,3	39,3	321,0	2,4
MCF-31	30,9	42,4	222,4	1,6

60

### Síntesis de nanopartículas de titanio

El uso de sílice sólida y nanopartículas de titanio como vehículos también puede facilitar una restricción de la actividad de coagulación a una región umbral localizada. Se pueden sintetizar nanopartículas de sílice sólidas con diámetros de partícula entre 5-100 nm. Los procedimientos de protección se pueden usar para unir las proteínas poliP y factor de coagulación a la superficie de nanopartículas. Las nanopartículas de sílice sólidas con cargas de poliP y trombina con tiempos de permanencia del sistema definidos pueden facilitar una restricción de su actividad a una región local de actividad de coagulación por encima del umbral.

Las nanopartículas de titanio se sintetizaron mediante una ruta de ácido fosfórico y se caracterizaron usando SEM y difracción de rayos X. Los diámetros de partícula promediaron 225 +/- 50 nm. Junto con la sílice FMS, se usaron partículas de titanio en estudios de funcionalización.

FIG. 40 muestra imágenes SEM de TiO<sub>2</sub> sintetizado mediante la ruta del ácido fosfórico. La naturaleza conjunta de las partículas separadas se produjo debido a la pulverización catódica de imágenes SEM.

### Oxido de hierro

El uso de nanopartículas de óxido de hierro como vehículos también puede facilitar una restricción de la actividad de coagulación a una región umbral localizada, así como mejorar la identificación de la distribución de partículas en todo el sistema cardiovascular. Los procedimientos de protección se pueden usar para unir las proteínas poliP y factor de coagulación a la superficie de nanopartículas. Las nanopartículas de sílice sólidas con cargas de poliP y trombina con tiempos de permanencia del sistema definidos pueden facilitar una restricción de su actividad a una región local de actividad de coagulación por encima del umbral.

Las nanopartículas sólidas de óxido de hierro con diámetros de partícula entre 5-500 nm pueden sintetizarse haciendo reaccionar tris(acetilacetato) de hierro(III) (Fe(acac)<sub>3</sub>) en disolventes orgánicos como oleilamina y ácido oleico, ácido benzoico u otro disolvente para producir óxido de hierro hidrófobo. Las partículas hidrófobas se pueden convertir en hidrófilas funcionalizando la superficie con poli(ácido acrílico) (PAAc) en dietilenglicol (DEG) a altas temperaturas superiores a 100 °C. Las partículas de óxido de hierro funcionalizadas con PAAc pueden ser partículas de óxido de hierro hidrófilas que pueden sintetizarse en soluciones acuosas usando cloruro de hierro (III) y cloruro de hierro (II) como precursor.

### Protección de PoliP

Los experimentos se realizaron en dos vías de protección poliP. La primera ruta utilizó las propiedades del ácido de Lewis de sílice y titanio. El proceso de Lorenz *et al.*, Anal. Biochem., 1994, 216:118-26, se adaptó reemplazando la circona con sílice o titanio. El cambio negativo en el potencial zeta ilustrado en la FIG. 36 indicó que poliP se unió con éxito a su diana.

La segunda ruta utilizó (3-aminopropil)-trietoxisilano (APTES) para formar un puente entre la nanopartícula y el material procoagulante. El terminal amina primaria de APTES se unió con proteínas o poliP modificado con EDAC. PoliP unido a pocillos de tira de superficie de amina usando EDAC, poliP, sílice modificada con APTES y ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES). El potencial zeta y la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) mostraron que las nanopartículas habían sido funcionalizadas con APTES. Se usaron mediciones de potencial Zeta para determinar que el poliP se unía a las partículas. FIG. 41 muestra un espectro FT-IR de nanopartículas de titanio no modificadas y modificadas con APTES. Las bandas de C-H, NH y Si-O-Si indicaron una unión exitosa de APTES a moléculas de TiO<sub>2</sub>. FIG. 42 muestra un gráfico de titulación de potencial zeta de nanopartículas de titanio modificadas y no modificadas.

La protección de poliP a la superficie de la nanopartícula mediante APTES puede dar como resultado un efecto de poliP "corona" donde el poliP cubre la superficie de la partícula y actúa como agente único. La cobertura puede referirse a la cobertura total de la partícula o al lugar donde se cubre suficiente superficie de la partícula para que la actividad de la superficie no funcione. Este efecto corona puede mejorar la viabilidad del agente para su uso interno para mejorar la orientación del agente. El efecto poliP "corona" puede inducirse usando el enlace APTES, enlace éster EDAC, enlace de ácido carboxílico u otras formas de enlace para unir el poliP a la superficie de la nanopartícula.

Una tercera ruta utilizó EDAC para formar un enlace éster entre las superficies de nanopartículas de óxido inorgánico y poliP. Las nanopartículas tales como sílice u óxido de hierro se dispersaron en agua desionizada a 70 °C. Se añadió una solución de poliP y EDAC en agua desionizada a la solución de nanopartículas. La solución resultante se agitó a 70 °C durante 75 minutos. Las nanopartículas sólidas se recuperaron mediante centrifugación y secado durante la noche.

PoliP también se puede limitar a nanopartículas usando PAAc como intermedio. La unión de PAAc a una partícula como óxido de hierro puede hacer que la partícula sea más estable en agua y, por lo tanto, más susceptible a la

protección de poliP.

**Protección de proteína**

5 Se realizaron experimentos para proteger nanopartículas sólidas con trombina usando el mecanismo APTES descrito anteriormente. El mecanismo implicaba la unión de un tiol desprotegido lentamente en el armazón de nanopartículas APTES al grupo reactivo con tiol en la proteína. Esta ruta puede minimizar la agregación de partículas y proteínas debido a una velocidad de reacción rápida que daría como resultado la unión de una partícula a una proteína.

10 Se pueden integrar otros agentes activos con las nanopartículas para tratar heridas internas. Por ejemplo, se puede usar un agente de factor tisular (TF)-Nanodisco para iniciar la coagulación. Además, administrar fibrinógeno adicional al sitio de la herida puede reponer la concentración de fibrinógeno y puede conducir a un coágulo más fuerte.

15 **Tromboelastografía**

20 Se analizaron varias muestras de sílice, tanto desnudas como protegidas con poliP, para determinar la actividad procoagulante usando plasma en un instrumento de tromboelastografía (TEG). La medición de TEG se centró en cuatro parámetros coagulantes: R, tiempo hasta el primer coágulo; K, tiempo desde la formación inicial del coágulo hasta diámetro del coágulo 20 mm; a, velocidad de formación de coágulos; MA, fuerza del coágulo. Como se enumera en la Tabla 2, estos datos indicaron que la sílice protegida con poliP disminuyó el tiempo y la velocidad de formación del coágulo.

25 Tabla 2 - Mediciones de TEG para plasma normal combinado controlado, FMS-ns, y FMS-ns modificado con polifosfato.

Ejecución	R (min)	K (min)	Ángulo (grados)	MA (mm)
Control Promedio	13,40	3,70	55,63	37,77
Control Desv. Est.	1,28	0,36	7,75	8,35
Promedio de FMS-ns	7,98	1,98	63,93	31,25
FMS-ns Desv. Est.	0,67	0,95	12,19	6,43
Promedio FMS-ns-PoliP	7,03	1,30	77,63	28,43
FMS-ns-PoliP Desv. Est.	0,50	0,46	3,52	2,32

**Biocompatibilidad**

30 Se realizaron experimentos para examinar la citotoxicidad de MCF-26 en células humanas. Se realizaron experimentos para evaluar la absorción de MCF-26 por HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana), HEK-a (riñón embrionario humano), HDF-a (fibroblastos dérmicos humanos), HPTC (túbulo proximal renal humano), HK-2 (Riñón humano 2), y células de fibroblastos NIH-3T3. Los estudios de citotoxicidad mostraron que las nanopartículas MCF-26 no son tóxicas, incluso a concentraciones elevadas. Típicamente, las partículas de sílice tienen valores de CI50 en el intervalo de concentraciones µg/ml. Incluso para las células HUVEC altamente sensibles, los valores de MCF-26 IC50 variaron entre 0,7-6,3 mg/ml. Las células no absorbieron fácilmente las partículas de MCF-26 hasta que las concentraciones alcanzaron la escala mg/ml. FIG. 43, izquierda, muestra imágenes de la captación de varias muestras por HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana), con una concentración de Ag NP de 10 µg/ml; Concentración de caolín de 10 µg/ml; y concentración de MCF-26 de 100 µg/ml. FIG. 43, derecha, muestra imágenes de la captación de varias muestras por HDF, con una concentración de Ag NP de 20 µg/ml; Concentración de caolín de 20 µg/ml; y concentración de MCF-26 de 100 µg/ml. La Tabla 3 muestra los valores de CI50 (mg/ml) y % de viabilidad del ensayo de absorción de rojo neural de MCF-26.

Tabla 3 - Valores de ensayo de absorción de rojo neural para MCF-26.

Tipo de célula	CI50 (mg/ml)	% de viabilidad a C <sub>máx</sub> = 7 mg/ml
HUVEC 5117	6,3 ± 0,2	50 % ± 3,4 %
HUVEC 5025	2,1 ± 0,8	26,6 % ± 6,7 %
HUVEC 3516	0,7 ± 0,0	20,8 % ± 2,0 %
HDF-a (ScienCell)	2,0 ± 0,2	13,4 % ± 2,8 %
HDF-a (PromoCell)	5,6 ± 1,4	39,5 % ± 8,0 %
HDF-a (ATCC)	5,0 ± 0,7	41,4 % ± 3,1 %
HEK-a 6940	> 7,0	91,9 ± 8,6 %
HEK-a 6937	> 7,0	59,8 % ± 4,4 %
HEK-a 6539	> 7,0	77,5 % ± 3,1 %

45 En resumen, Los experimentos anteriores demostraron: la coagulación se estimuló hasta 4 veces activando pares de

factores de coagulación, sin estimulación adicional usando tres pares activadores de factor de coagulación; las nanopartículas procoagulantes que contienen poliP, basado en dendrímero PAMAM, se sintetizaron y probaron para determinar su estabilidad y actividad; las nanopartículas de procoagulante de poliestireno que contienen poliP se sintetizaron y se probaron para determinar su estabilidad y actividad; las nanopartículas de procoagulante de oro que contienen poliP se sintetizaron y probaron para determinar su estabilidad y actividad; las nanopartículas sintetizadas tenían un diámetro de partícula de 125 +/- 25 nm y un tamaño de poro de 18,2 nm; se determinó que la sílice porosa era biocompatible con células humanas; se desarrollaron procedimientos de síntesis de partículas para el suministro de trombina, que tiene un radio hidrodinámico de 8,4 nm; se sintetizaron partículas de titania con un diámetro medio de 225 +/- 50 nm; las cadenas de poliP se unieron a nanopartículas de sílice y titania usando química de ácido-base de Lewis y mecanismo APTES-EDAC; y se cuantificó la actividad procoagulante de sílice y sílice unida a poliP.

### Ejemplo 3

Los experimentos se realizaron en nanopartículas de sílice sólidas con un diámetro de 10-150 nm. La sílice actuó como un almacén sobre el cual se unieron los agentes procoagulantes. Las partículas de este tamaño pueden fluir a través de pequeños vasos en el torrente sanguíneo.

Las nanopartículas de oro de 10 nm y 15 nm de diámetro se seleccionaron como partículas base además de las nanopartículas de oro de 5 nm que se investigaron inicialmente. Los números máximos de cadenas de polifosfato que se pueden añadir a cada partícula según el análisis teórico son: 64 y 144 para la partícula de oro de 10 nm y 15 nm, respectivamente. Las partículas de diferente tamaño contenían números conocidos, distintos de cadenas de polifosfato. En ciertas realizaciones, las nanopartículas con un tamaño superior al umbral con polifosfato conjugado mayor que el número crítico desencadenaron la coagulación de la sangre.

Los experimentos se realizaron en nanopartículas de sílice sólidas a menos de 200 nm como agente de administración. El polifosfato se unió a un almacén de sílice usando las propiedades ácido-base de Lewis de sílice y polifosfato. Se usó polifosfato de 70 metros de longitud (P70), ya que esta longitud se correlaciona aproximadamente con el tamaño del polifosfato secretado por las plaquetas humanas durante la coagulación.

Además, la trombina se unió a sílice sólida usando un reticulador de proteínas. El mecanismo de fijación se muestra en la FIG. 44. Al funcionalizar sílice con 3-Aminopropiltriethoxisilano (APTES), la sílice actuó como una proteína para fines de reticulación.

Se realizaron experimentos para probar nanopartículas de sílice sólidas con enlaces covalentes al recubrimiento. El primer sistema era polifosfato unido dativamente a óxido desnudo o covalentemente a nanopartículas de sílice terminadas con aminopropilo. El segundo era un sistema conector para el acoplamiento de proteínas y/o péptidos. Los resultados del acoplamiento usaron un recubrimiento de tioacetilo protegido sobre las partículas y un disulfuro de ortopiridilo reactivo con tiol (OPSS) transportado en lisinas de la proteína. La desprotección de hidroxilamina de las partículas se verificó usando el ensayo colorimétrico con detección de tiol (FIG. 45). OPSS-trombina y albúmina-OPSS marcada con colorante sirven como proteínas modelo (FIG. 44). La sílice-tioacetilo se preparó en dos etapas a partir de sílice. La desprotección del tiol se verificó mediante 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB). La muestra D tenía reactivos pero no sílice, y en la muestra E, sílice-SATP generó un color intenso que indica desprotección satisfactoria.

Los polímeros de polifosfato de una amplia variedad de longitudes de polímeros se prepararon mediante electroforesis preparativa a gran escala para polifosfato de fraccionamiento por tamaño. Estos materiales se usaron como una de las cargas útiles de procoagulantes para las nanopartículas. En algunos casos, la actividad procoagulante puede depender de las longitudes de polímero de polifosfato. Las químicas de unión para unir covalentemente el polifosfato a las moléculas y nanopartículas dirigidas incluyó el acoplamiento indirecto uniendo primero las poliaminas a los fosfatos terminales y luego usando sondas reactivas con aminas para unirse a los grupos amino terminales.

Para conjugar polifosfato en nanopartículas de oro se usó el mismo esquema de reacción. Las proporciones de los reactivos (tiol-polifosfato a nanopartículas de oro) y los gradientes de la fuerza iónica de la solución se variaron para producir la máxima conjugación de poliP en partículas de oro (5 nm, 10nm y 15nm). La separación de los conjugados del polifosfato libre se realizó por centrifugación. La centrifugación se probó a varias concentraciones de nanopartículas de oro y poliP para (1) eliminar el polifosfato libre de manera eficaz; (2) prevenir la agregación de partículas; y (3) para minimizar la pérdida de nanopartículas de oro. Después de la reacción entre el polifosfato unido a tio y las nanopartículas de oro, así como después de centrifugar, se tomaron imágenes TEM para determinar si se habían formado agregados no visibles más pequeños. Las imágenes indicaron que la agregación previa a la centrifugación fue mínima con un pequeño porcentaje de grupos de 2 y 3 partículas.

Los experimentos mostraron que una nanopartícula de sílice sólida de aproximadamente 250 nm unida a la coagulación acelerada de polifosfato en comparación con el plasma recalcificado mediante tromboelastografía (TEG). Se realizaron experimentos para cuantificar aún más las actividades procoagulantes de sílice, polifosfato y polifosfato unido a sílice. Se probaron varios tamaños y concentraciones de sílice. P70 se unió a un almacén de

sílice más pequeño. incluso a una concentración de mg menor, la sílice-P70 TSP mostró una disminución del tiempo R de aproximadamente 0,5 min.

Se realizaron experimentos para probar la actividad procoagulante del polifosfato en fases sólidas y en solución sin una unión de armazón. Los ensayos mostraron un aumento de los tiempos de coagulación y una fuerza debilitada del coágulo en comparación con el plasma recalificado, lo que indica que el polifosfato de tamaños de polímero relativamente cortos puede unirse a un armazón para funcionar como procoagulante. Unir múltiples copias de estos polímeros más cortos a la misma nanopartícula puede permitir un ensamblaje localizado de múltiples proteínas de coagulación similares a lo que se observaría con un solo polímero de polifosfato largo.

#### Ejemplo 4

Los experimentos se realizaron en nanopartículas de sílice (SNP). La sílice actuó como un armazón sobre el cual se unieron los agentes procoagulantes. Las partículas del tamaño estudiado pueden fluir a través de los vasos más pequeños en el torrente sanguíneo. Se probaron nanopartículas de sílice entre 1-10 nm y 50-150 nm.

Se midió el efecto del tamaño y la concentración de las partículas de sílice en la coagulación. Las partículas superiores a 50 nm se sintetizaron en el laboratorio siguiendo un método Stöber modificado (Stober W., et al., J. Colloid & Interface Sci., 26(1), 62-69) y se recuperaron mediante centrifugación. Los diferentes tamaños de nanopartículas se obtuvieron variando las cantidades de tetraetoxisilano (TEOS) y amoníaco. Sigma Aldrich suministró nanopartículas de sílice Ludox por debajo de 10 nm. Las nanopartículas de sílice por debajo de 50 nm se aislaron por ultrafiltración y ultracentrifugación.

Se realizaron experimentos de coagulación dependientes del tamaño para comparar las diversas partículas de sílice a una concentración fija de 0,68 mg/ml, que se definió en otros experimentos para estar en el intervalo de alta actividad (FIG. 46). Un valor de R mínimo, el tiempo de formación inicial del coágulo, ocurrió a un tamaño de partícula de 55 nm. Las partículas de 55 nm mostraron un valor R de 3 min (FIG. 47), que era adecuado para probar el polifosfato unido a la superficie.

Experimentos de concentración centrados en partículas de sílice de 55 nm, se probaron a concentraciones de 0,14 mg/ml, 0,34 mg/ml, 0,68 mg/ml, 1,35 mg/ml y 2,70 mg/ml. Los datos resultantes (FIG. 47) identificaron ~0,6 mg/ml de sílice desnuda como umbral para una minimización de R. A esta concentración, el valor R promedió 3 min. El valor R permaneció cerca de 3 minutos para el doble de sílice (1,35 mg/ml) y luego aumentó ligeramente a 3,5 minutos a 2,70 mg/ml. La alta concentración puede dar lugar a la agregación o dilución de los factores plasmáticos sobre el área superficial. Las partículas eran estables en un amplio intervalo de concentración (FIG. 48) y se ensayaron en tampones y condiciones de suero de alta salinidad.

El valor R dependía de la concentración hasta que se cumpliera la condición umbral, en la que R permanece bajo y estable.

Nanopartículas de oro marcadas con PoliP45 (5 nm, 10 nm, 15 nm y 50 nm) se separaron del poliP45 libre por centrifugación. Se recuperó más del 90 % de las nanopartículas de oro marcadas con poliP y se eliminó el 99 % de poliP45 que no estaba unido covalentemente a las partículas.

Como se muestra en la FIG. 47, las superficies a base de sílice aumentaron la coagulación por encima de un umbral de concentración. Se probaron diferentes tipos de recubrimientos. Se usó sílice funcionalizada con APTES para unir con una variedad de compuestos. Se utilizó la funcionalización de amina de la superficie y se compararon los efectos de la coagulación proporcionando una superficie procoagulante al tiempo que se introducen asas conjugadas para la unión de polímeros, péptidos, o proteínas.

Nanopartículas de sílice (SNP) (FIGS. 46-48)

- 1) -polifosfato (FIG. 49)
- 2) -APTES; Bajo a alto (FIGS. 50 y 51)

- a. -APTES-polifosfato
- b. -APTES-PEG (FIG. 49)
- c. -APTES-PEG-Péptido
- d. -APTES-unión-Péptido
- e. -APTES-unión-Péptido-PEG

El polifosfato usado en la FIG. 49 tenía una longitud de ~70 meros (P70) que se eligió por su similitud con el tamaño del polifosfato secretado por las plaquetas humanas durante la coagulación. Se encontró que P70 adsorbido directamente en sílice aumenta ligeramente el tamaño de partícula (en varios nm). El polifosfato se puede unir a la sílice mediante un puente APTES, basándose en la tecnología de derivatización covalente para polifosfato. Las nanopartículas de sílice con APTES se muestran en las FIGS. 50 y 51. El anclaje específico de APTES puede

producir una mayor densidad superficial o una conformación mejorada, por ejemplo, cepillo anclado solo por fosfatos terminales.

5 FIG. 50 muestra el factor de coagulación R para una serie de APTES-Sílice (SNP-NH<sub>2</sub>). El polifosfato se puede acoplar usando EDC, y se puede controlar el potencial zeta dependiente del pH en relación con el material de partida de SNP-NH<sub>2</sub> como en la FIG. 50. La misma estrategia APTES puede usarse como un punto para unir PEG, péptidos para direccionamiento o activación enzimática, y/o proteínas. Se pueden emplear conectores reactivos, por ejemplo, NHS-conector-Maleimida o NHS-conector-OPSS reactivo con aminas para la posterior unión de tiol. Los tioles pueden transportarse en los péptidos marcados con colorante o introducirse en proteínas usando 2-iminotiolano o S-acetiltiopropionato de N-succinimidilo (SATP).

15 En ciertas realizaciones, un recubrimiento sensible a la proteasa se puede quitar una vez que se cumplan las condiciones por encima del umbral, por ejemplo, una secuencia conectora de péptido IEGR sensible a protrombinasa. El recubrimiento puede incluir PEG de gran peso molecular unido mediante enlaces peptídicos a una nanopartícula de núcleo de sílice compartida, cuya actividad superficial se reduce por la presencia del PEG. Los péptidos marcados con fluoresceína pueden usarse para la cuantificación después del acoplamiento. Se pueden usar PEG u otros polímeros pasivantes para (i) aumentar la vida media de sílice en el torrente sanguíneo, (ii) reducir la captación celular y (iii) reducir la adsorción de proteínas al activo, superficie aún oculta.

20 Se realizaron experimentos para probar SNP con y sin polip adsorbido. Los SNP con poliP unido tenían una actividad procoagulante aumentada en comparación con los SNP sin poliP.

25 La cistamina (un compuesto de disulfuro con dos aminas primarias terminales) se conjugó con poliP45 con una eficacia de reacción del 90 % al amortiguar la reacción a pH 9 con MES y permitir que la reacción prosiguiera a temperatura ambiente durante 24 horas. La unión del polifosfato a la cistamina se produjo a través de la formación de enlaces fosforamido entre el fosfato terminal y la amina primaria. A continuación, se usó diálisis (MWCO 2000) para eliminar la cistamina sin reaccionar. El conjugado se añadió luego a las nanopartículas de oro para reemplazar el citrato. Al controlar el tiempo de reacción y la fuerza iónica de la suspensión, el número de cadenas de PoliP conjugadas con una nanopartícula puede variar. Las siguientes nanopartículas de poliP45-Au se sintetizaron y probaron en un coagulómetro para medir las actividades de coagulación mediadas por el Factor X, como se describe en la Tabla 4, a continuación:

**Tabla 4 - nanopartículas poliP45-Au**

Nombre muestra	Diámetro NP (nm)	Contiene PEG	MonoP (µM)	Au (nM)	Ag. N.º	Volumen (ul)
56_10	10	No	19,48	15,5	28	700
57_10	10	No	20,3	14,7	30,8	500
59_10	10	No	31,4	12,9	54,2	380
M9_10	10	No	10,6	6,1	38,7	930
M9_15	15	No	12,6	4,95	56,6	700
10_A1D	10	No	10,9	11,3	21,6	210
10_A1D-2:1peg	10	Sí	9,8	16,2	13,4	250
15_A1D	15	No	4,96	2,61	42,2	600
50_A1D	50	No	6,93	0,245	628	100
10_10	10	No	53,5	17,4	68	500
16_10	10	No	9,8	14,7	14	700
9_5	5	No	56	56	22	640
14_5	5	No	4,59	78	1	940

35 Según los ensayos de las muestras anteriores: (1) no hubo correlación entre el tiempo de coagulación y el número de agregación para partículas de 10 nm a una concentración de fosfato constante (9,8 µM) (FIG. 52); y (2) el tiempo de coagulación dependía de la concentración de fosfato (FIG. 53).

40 Se realizaron experimentos sobre mecanismos para unir polifosfato (P70) a la superficie de nanopartículas de sílice sólidas. APTES se utilizó para conectar el P70. La conjugación de PEG a las aminas moduló el valor R. En ciertas realizaciones, la escisión proteolítica podría desenmascarar y exponer la superficie procoagulante. Por ejemplo, los péptidos de reconocimiento de enzimas pueden usarse para mantener el PEG en una sílice de bajo APTES. En una orientación inversa, donde el péptido está en la punta externa del PEG, la superficie vascular dañada, superficies celulares activadas, o fibrina pueden ser la diana. Las proteínas como trombina y factor tisular enmascarado de manera similar por PEG pueden transportarse en forma protegida por nanopartículas al sitio de interés.

45 La sílice desnuda se probó para determinar los valores de coagulación basándose en el tamaño y la concentración (FIGS. 46-48). Los mismos se usaron en nanopartículas de sílice unidas a P70 para identificar umbrales que inducían la coagulación (FIG. 49). En ciertas realizaciones, los tiempos de coagulación cortos de la sílice unida a

P70 pueden facilitar los tratamientos dirigidos a una herida interna. Por ejemplo, las partículas cuyas concentraciones están por debajo del umbral pueden usarse para evitar la coagulación general no deseada cuando se encuentra en la circulación general. Los materiales pueden dirigirse espacialmente a superficies específicas (por ejemplo, endotelial herido) para concentrar el material en un comportamiento de coagulación por encima del umbral. La protección de las partículas con PEG, que se divide por factores presentes en el sitio de destino, puede facilitar el control en la ubicación donde se inicia la coagulación.

**Ejemplo 5**

Se realizaron experimentos en la reacción de conjugación para unir el polifosfato en nanopartículas de oro y el procedimiento de purificación. El proceso de purificación de las nanopartículas de oro implicaba la eliminación del exceso de polifosfato de flujo libre que queda en la solución. Una microcentrifugadora (Labnet Spectrafuge 16M Microcentrifuge, Labnet International, NJ) se utilizó para purificar las muestras. Los estudios de centrifugación se realizaron primero para obtener las condiciones para la eliminación de ~99 % de poliP de flujo libre y recuperar la mayoría de las partículas de oro (~90 %) sin causar agregación. Dependiendo del tamaño de las nanopartículas de oro, se utilizaron las siguientes condiciones (Tabla 5):

**Tabla 5. Condiciones de centrifugación dependientes del tamaño.**

Tamaño de Au NPs	Rpm	Fuerza G	Tiempo hasta granulación	Centrifugar
10nm	8600	6000	100 min	3x
15nm	10000	8176	30min	2x
50nm	8000	5223	10min	3x

El tiempo de granulación,  $t$ , se calculó usando la ecuación de flujo, (1)

$$t = \frac{k}{s} \quad (1)$$

en donde  $k$  es la eficacia de granulación del rotor y  $S$  es el coeficiente de sedimentación. La eficacia de granulación ( $k$ ) se calculó usando la ecuación 2 a continuación,

$$k = \frac{2,53 \times 10^{11} (En \frac{r_{m\acute{a}x}}{r_{m\acute{i}n}})}{(RPM)^2} \quad (2)$$

donde  $r_{m\acute{a}x}$  y  $r_{m\acute{i}n}$  son los radios máximos y mínimos de la centrifugadora, respectivamente, y RPM es la velocidad en revoluciones por minuto. Los valores  $r_{m\acute{a}x}$  y  $r_{m\acute{i}n}$  se midieron en función del tipo de centrifugadora usada.

El coeficiente de sedimentación,  $S$ , se puede calcular usando la ecuación,

$$S = \frac{2(\rho_s - \rho_l)}{9\eta} \left(\frac{d}{2}\right)^2 \quad (3)$$

en donde  $\rho_s$  y  $\rho_l$  son las densidades de nanopartículas de oro y agua, respectivamente,  $\eta$  es la viscosidad del agua, y  $d$  es el diámetro de las nanopartículas de oro.

Después de cada centrifugación, se retiró el sobrenadante que contenía poliP de flujo libre y los sedimentos se resuspendieron con MES 2 mM a pH 9 para garantizar la estabilidad del ligando poliP-cistamina. El pH de las muestras influyó en la hidrólisis del enlace P-N. Como tal, las partículas se resuspendieron con el tampón a un pH superior a 7. Las muestras resuspendidas se agitaron en vórtice durante 30 segundos y la centrifugación se repitió como se especifica en la Tabla 6.

**Tabla 6. Condiciones de centrifugación dependientes del tamaño.**

Tamaño de Au NPs	Rpm	Fuerza G	Tiempo hasta granulación	Repetir centrifugación
10nm	8600	6000	100 min	3x
15nm	10000	8176	30min	2x
50nm	8000	5223	10min	3x

Los experimentos se realizaron en nanopartículas de sílice (SNP) multifuncionalizadas, así como en titania (TNP) y nanopartículas de plata recubiertas de sílice (Ag@SNP). Los materiales inorgánicos actuaron como el almacén sobre el cual se unieron los agentes procoagulantes. Las partículas a escala nanométrica pueden fluir a través de pequeños vasos en el torrente sanguíneo. La PEGilación covalente selectiva puede usarse para minimizar los efectos adversos. FIG. 54 muestra imágenes TEM representativas del SNP sintetizado con dimensiones de diámetro medio en el intervalo sub-100 nm.

Se midió el efecto del tamaño y la concentración de las partículas de sílice en la coagulación. Las partículas por encima de 10 nm de diámetro medio se sintetizaron por tamaño selectivo siguiendo un método Stöber modificado y se recuperaron usando centrifugación. Los diferentes tamaños de nanopartículas se obtuvieron selectivamente variando las cantidades de tetraetoxisilano (TEOS) y amoníaco (NH<sub>4</sub>OH). FIG. 55 muestra el tamaño de partícula en función del porcentaje de NH<sub>4</sub>OH a concentraciones fijas de TEOS y etanol. También se examinaron nanopartículas de sílice Ludox por debajo de 10 nm (Sigma-Aldrich). Las nanopartículas de sílice por debajo de 50 nm se aislaron por ultrafiltración y ultracentrifugación. Los rendimientos fueron superiores al 50 % para síntesis usando más del 4 % de NH<sub>4</sub>OH (FIG. 56). La menor cantidad de amoníaco utilizada para hacer las partículas más pequeñas puede inhibir la catálisis del TEOS en la reacción de hidrólisis. Los experimentos que sintetizan partículas por debajo de 20 nm también exhibieron una distribución de tamaño bimodal cuando se midieron usando DLS. La distribución de tamaños bimodales puede deberse a la baja concentración de amoníaco.

El seguimiento del suministro de nanopartículas a la herida mediante imágenes puede facilitarse mediante el uso de nanopartículas de plata recubiertas con sílice de aproximadamente 10 nm de espesor (Ag@SNP, FIG. 57). Los experimentos iniciales con Ag@SNP mostraron un valor R promedio retrasado de  $13,8 \pm 1,3$  min. En ciertas ocasiones, se puede usar una cubierta de sílice más gruesa para aumentar la concentración en los ensayos de coagulación. Además de plata, las nanopartículas magnéticas también se pueden usar para la obtención de imágenes, así como para el control de grupos.

Además de las nanopartículas sólidas no porosas, se pueden usar nanoesferas mesoporosas de poro grande (MSN) de área de superficie elevada (500-1000 m<sup>2</sup>/g), para administrar proteínas procoagulantes como trombina o factor tisular, o protrombina a las heridas.

Las partículas de anatasa titania se sintetizaron mediante el método sol-gel y variando la cantidad de catalizador ácido añadido a cada síntesis. Las nanopartículas de titania resultantes se probaron usando difracción de rayos X y DLS para determinar la forma (amorfa, anatasa o rutilo) y el tamaño de la titania.

Nanopartículas de oro marcadas con PoliP45 (5 nm, 10 nm, 15 nm y 50 nm) se separaron del poliP45 libre por centrifugación. Se recuperó más del 90 % de las nanopartículas de oro marcadas con poliP y se eliminó el 99 % de poliP45 que no estaba unido covalentemente a las partículas.

Se usó polifosfato de alto PM (también conocido como "vidrio de fosfato insoluble") como material de partida para preparar fracciones de polifosfato de las longitudes de polímero deseadas. El polifosfato de alto PM era en gran medida insoluble en agua, ya que consistía principalmente en polímeros que tenían miles de unidades de fosfato de longitud. La suspensión del material en una solución de LiCl no tamponada y el calentamiento a 100 °C durante varias horas con agitación constante dieron como resultado que la mayoría del polifosfato se disolviera. Se observó un acortamiento dependiente del tiempo de la longitud media del polímero de los polifosfatos durante el calentamiento. El pH ligeramente ácido de las soluciones de polifosfato resultó en una hidrólisis ácida leve de los polímeros. La velocidad de la hidrólisis pareció aumentar con el tiempo, que fue el resultado de la acidificación gradual de la solución a medida que se hidrolizaban los polímeros de polifosfato. La acidificación gradual de la solución de polifosfato, por lo tanto, aceleró gradualmente la velocidad de hidrólisis del polifosfato.

La hidrólisis de los enlaces de fosfoanhídrido en polifosfato también puede hidrolizarse mediante base, y como tal la acidificación gradual de la solución puede disminuir gradualmente la velocidad de hidrólisis, a diferencia de la hidrólisis ácida cuya tasa aumentó con el tiempo. Los experimentos se realizaron mediante la adición de cantidades variables de LiOH a las soluciones de LiCl en donde el polifosfato se agitó a 100 °C. Se observó un acortamiento gradual dependiente del tiempo de las cadenas de polifosfato en función de la concentración inicial de LiOH. Como tal, se suspendió polifosfato PM, con agitación, en una combinación de LiCl y LiOH a 100 °C hasta que se obtuvieron las longitudes medias de polímero deseadas. Este método era robusto y reproducible, y era escalable a cantidades de gramo de polifosfato y superiores.

Las condiciones para solubilizar e hidrolizar parcialmente el polifosfato con LiOH/LiCl se ajustaron para producir las longitudes medias de polímero deseadas. En algunos casos, el método dio como resultado preparaciones de polifosfato con tamaños heterogéneos. Se pueden usar precipitación diferencial de los polifosfatos utilizando combinaciones variables de concentraciones de acetona y sal (por ejemplo, NaCl, KCl y LiCl). Además, las combinaciones de concentraciones variables de isopropanol y NaCl produjeron fracciones de polifosfato de tamaño relativamente estrecho, comenzando con polifosfato de alto PM que previamente se había solubilizado y parcialmente hidrolizado utilizando el procedimiento LiOH/LiCl descrito anteriormente. Usando estas condiciones, se obtuvo polifosfato, de ~40 a ~1500 unidades de fosfato de longitud, en cantidades de gramos y superiores.

Funcionalizar las nanopartículas de sílice y anatasa titania con polifosfato o trombina puede mejorar la naturaleza procoagulante de las partículas. El polifosfato se adhiere fácilmente a la superficie de las nanopartículas inorgánicas para crear un agente más potente. Además del polifosfato, la trombina puede unirse a las nanopartículas de sílice mediante el uso de 3-aminopropil trietoxisilano (APTES) y reticuladores de proteínas. Los tipos de recubrimientos que se pueden usar incluyen:

- SNP (FIGS. 54-56 y 58)

- 3) -polifosfato; diferente tamaño (FIGS. 59-61)
- 4) -APTES; bajo a alto (FIG. 62)

5

- a. -APTES-polifosfato
- b. -APTES-uni3n-PEG (FIG. 62)
- c. -APTES-PEG-P3ptido
- d. -APTES-uni3n-P3ptido
- e. -APTES-uni3n-P3ptido-PEG (FIGS. 63-64)

10

- TNP (FIG. 65)

- 1) -polifosfato; diferente tama3o (FIG. 66)
- 2) -APTES; bajo a alto (igual de a - e) (FIG. 67)

15

- Ag@SNP (FIG. 57)
- MSN

20

En comparaci3n con la hemorragia externa, las hemorragias internas no son directamente accesibles y deben ser dirigidas con precisi3n. Las part3culas est3n dise3nadas para inyectarse en el torrente sangu3neo y solo para apuntar y administrar en los sitios de sangrado. Se puede usar una segunda funcionalizaci3n para proteger las nanopart3culas de iniciar la coagulaci3n en vasos sanos. Las nanopart3culas dise3nadas para la administraci3n de f3rmacos pueden recubrirse con polietilenglicol (PEG) para evitar la activaci3n no deseada. Las nanopart3culas PEGiladas aumentaron la vida media de la s3lice en el torrente sangu3neo, absorci3n celular limitada, y adsorci3n de prote3nas limitada a la superficie activa, a3n oculta. En la herida, la part3cula puede liberar el PEG e iniciar la coagulaci3n. Se puede usar un p3ptido con una secuencia de IEGR que conecta la part3cula al PEG (FIG. 63). El factor X activado (FXa) escinde el p3ptido en la secuencia IEGR, eliminando el PEG y dejando el TSP activado. Como FXa solo existe por encima del umbral en los sitios de sangrado, el mecanismo de selecci3n asegura que el TSP se active solo cuando sea necesario.

25

30

Se puede utilizar una orientaci3n inversa en donde el p3ptido est3 en la punta externa del PEG para apuntar a una superficie vascular da3ada, superficies celulares activadas, o fibrina, por ejemplo. La trombina y el factor tisular enmascarados de manera similar por el PEG pueden usarse si se pueden transportar en forma protegida por nanopart3culas al sitio de inter3s.

35

El polifosfato se uni3 a su almac3n de nanopart3culas a trav3s de un puente APTES, bas3ndose en la tecnolog3a de derivatizaci3n covalente para polifosfato. El anclaje espec3fico de APTES de polifosfato puede producir una mayor densidad superficial y una conformaci3n mejorada. El recubrimiento de polifosfato puede aumentar la biocompatibilidad y especificidad, versatilidad de conjugaci3n y capacidad de orientaci3n general en relaci3n con la s3lice desnuda.

40

Se realizaron experimentos en nanopart3culas en donde un polifosfato con una longitud de -70-meros (P70) se uni3 a la s3lice para identificar umbrales para inducir la coagulaci3n. Los tiempos cortos de coagulaci3n de la s3lice unida a P70 pueden facilitar el direccionamiento de una herida interna. Las part3culas cuyas concentraciones est3n por debajo del umbral pueden usarse para evitar la coagulaci3n general no deseada cuando se encuentra en la circulaci3n general. La orientaci3n espacial de los materiales a las superficies espec3ficas (por ejemplo, endotelial herido) puede usarse para concentrar el material en un comportamiento de coagulaci3n por encima del umbral. La protecci3n de las part3culas con PEG, que se divide por factores presentes en el sitio de destino, a3adir3a un nivel adicional de control.

45

50

Se realizaron experimentos para evaluar las nanopart3culas procoagulantes con y sin poliP adsorbido, y para cuantificar la actividad procoagulante de las nanopart3culas con respecto a su capacidad para desencadenar la ruta de contacto de la coagulaci3n sangu3nea (inicio del co3gulo), as3 como su actividad para acelerar la capacidad de FXa para coagular plasma (propagaci3n del co3gulo).

55

PoliP70 se us3 para sintetizar un conjugado de poliP-disulfuro para unirse covalentemente a nanopart3culas de oro. La uni3n del polifosfato a la cistamina se produjo a trav3s de la formaci3n de enlaces de fosoramidita (P-N) entre el fosfato terminal y la amina primaria. El estudio de hidr3lisis del enlace P-N se realiz3 para evaluar la estabilidad del ligando poliP-cistamina. El pH de la reacci3n se ajust3 para observar el efecto del pH sobre la hidr3lisis. La estabilidad se cuantific3 mediante el ensayo de fluorescamina que detect3 la cantidad de cistamina sin reaccionar. El aumento en la cantidad de cistamina sin reaccionar indic3 que se hab3a producido hidr3lisis, indicando que el resto polifosfato se escindi3 de la cistamina. Bas3ndose en los resultados que se muestran en la FIG. 68, el enlace P-N se hidroliz3 en condiciones 3cidas a pH 6,02. Era estable a pH superior a 7.

60

65

Este estudio de hidr3lisis del ligando poliP-cistamina se utiliz3 para optimizar las condiciones para las reacciones

oro-poliP. El pH de estas reacciones se ajustó para que fuera superior a 7 ajustándolas con tampón MES 500 mM a pH 9. Además, el proceso de purificación también se optimizó. Las nanopartículas se resuspendieron con tampón MES 2 mM a pH 9 para garantizar que el poliP todavía se uniera a las nanopartículas de oro mediante el conector de

5 cistamina. Las condiciones anteriores se usaron para sintetizar nanopartículas de poliP45 y poliP70-oro con varios índices de agregación. Los volúmenes de las reacciones de oro-poliP también se incrementaron para obtener una mayor concentración de monofosfato para aumentar la sensibilidad de las mediciones de coagulación sanguínea.

Las siguientes nanopartículas de poliP45-Au (10 nm, 15 nm, 50 nm) se sintetizaron y se probaron en un coagulómetro para medir el tiempo de coagulación usando plasma humano.

10 **Tabla 7. Condiciones de la muestra para poliP45 conjugado con nanopartículas de oro (10 nm, 15nm y 50nm).**

Muestra	Tipo de PoliP	Conc. MonP (uM)	Conc. Partícula de Au (nM)	Agregación N.º	Pico de UV-vis Au en volumen	Pico de UV-vis después de centrifugar	Volumen (ul)
10_1	45	80,00	104,7	16,98	519	523	240
10_2	45	80,00	90,34	19,68	519	524	320
15_1	45	80,00	29,29	60,70	521	523	290
15_2	45	80,00	37,33	47,62	521	523	340
50_1	45	80,00	3,74	475,34	533	533	390
50_2	45	80,00	2,03	875,75	533	533	390

Se sintetizaron las siguientes nanopartículas de poliP70-Au (Tabla 8) y se analizaron las actividades procoagulantes.

15 **Tabla 8. Condiciones de la muestra para poliP70 conjugado con nanopartículas de oro (10 nm, 15 nm, y 50 nm).**

Muestra	Tipo de PoliP	Conc. MonoP (uM)	Conc. Partícula de oro (nM)	Agregación N.º	Pico UV-vis para oro en volumen	Pico después de centrifugar	Volumen (ul)
MS_26_10 nm	70	307,37	131,09	33,50	519	524	300
MS_27_15 nm	70	311,63	67,08	66,37	521	522	250
MS_28_50 nm	70	312,63	8,62	518,05	532	533	200

20 Los resultados (FIG. 69) usando las partículas en la Tabla 8 mostraron que las partículas de oro de 50 nm con el número de agregación más alto tenían las actividades procoagulantes más altas (es decir, los tiempos de coagulación más cortos cuando se ensayaron a ~6,5 uM de fosfato). Estos resultados demostraron que la actividad procoagulante de las partículas de oro fue modulada por el número de moléculas de polifosfato/partícula.

25 La unión del polifosfato P70 a la superficie de las nanopartículas de sílice sólidas mediante APTES puede facilitar la funcionalización específica de partículas intercambiables por umbral, TSP, induciendo la coagulación únicamente en el sitio deseado de la herida.

30 Además de P70, pueden usarse polifosfatos de cadena más larga (~700-meros, P700). El polifosfato con un intervalo de tamaños superior a 500-meros inició el contacto o la ruta intrínseca de la coagulación sanguínea. El P700 se puede conectar a los armazones utilizando los mismos métodos descritos anteriormente.

35 Los experimentos de coagulación descritos anteriormente compararon las partículas de sílice a una concentración fija de 0,68 mg/ml (solución madre de 25 mg/ml) o a un tamaño fijo de 55 nm para determinar los límites del intervalo de alta actividad. Cada partícula formó un coágulo inicial (R) entre 3 y 5 min. El umbral para el valor R mínimo se produjo a un tamaño de partícula de ~30 nm.

40 Usando partículas de sílice de 55 nm, ~0,6 mg/ml (reserva de 30 mg/ml) de sílice desnuda se identificó como el umbral requerido para minimizar R. A esta concentración, el valor R promedió 3 min (en comparación con 12-16 minutos sin sílice). El valor R permaneció aproximadamente 3 minutos para duplicar la sílice (1,35 mg/ml) y luego aumentó ligeramente a 3,5 minutos a 2,70 mg/ml. El aumento de R a altas concentraciones puede haber ocurrido como resultado de la agregación de partículas o la dilución de factores plasmáticos en el área de superficie de la partícula. Independientemente de la concentración, los ensayos de DLS confirmaron que las partículas mantienen la estabilidad y el tamaño. A bajas concentraciones de partículas, el valor R era alto. A medida que aumentaba la concentración de partículas, R disminuyó hasta que se cumplió la condición umbral. En este momento, R

45 permaneció bajo y estable hasta que la concentración de partículas se volvió lo suficientemente alta como para inhibir la coagulación. FIG. 58 muestra un estrecho intervalo de concentraciones cerca del valor óptimo para diferentes tamaños de partículas SNP. Además del tiempo de coagulación (R) también se evaluaron otros parámetros, como tasa de formación de coágulos y tamaño del coágulo, Como los agentes unidos a la partícula podrían no afectar el tiempo de formación inicial del coágulo, pero podrían acelerar la coagulación cuando se inicia o

podría dar lugar a la formación de un coágulo más grande.

El polifosfato utilizado en los ensayos tenía una longitud de ~70-meros (P70) elegido por su similitud con el tamaño del polifosfato secretado por las plaquetas humanas durante la coagulación, y que activan el FV. Se encontró que P70 adsorbido directamente en sílice aumenta ligeramente el tamaño de partícula (en varios nm). Se analizaron muestras de nanopartículas de sílice de 55 nm desnudas y unidas a P70 para la cuantificación y coagulación de polifosfato. Los resultados se muestran en FIG. 59(a) y 59(b), que muestran que los SNP unidos a P70 disminuyeron significativamente el tiempo de coagulación en comparación con los SNP desnudos.

También se probaron las propiedades de coagulación de la anatasa titania. Los tiempos de coagulación de las cuatro síntesis catalizadas por ácido compartieron tiempos de coagulación similares. La titania formada a pH neutro exhibió un menor tiempo de coagulación (T4 en FIG. 65). Los experimentos dependientes de la concentración también confirmaron que cuando se diluye, la actividad de coagulación disminuye. Cuando se funcionaliza con P70, las muestras T4 redujeron aún más el tiempo de coagulación (FIG. 66).

Los ensayos de coagulación se realizaron usando plasma deficiente en FXII (FIG. 60) para estudiar el mecanismo por el cual las nanopartículas unidas a P70 inducen la coagulación. A medida que activan la coagulación a través de la activación FXII y la ruta intrínseca, las nanopartículas desnudas no inducen la coagulación en el plasma deficiente en FXII. Con la ruta intrínseca bloqueada, la coagulación solo se produjo mediante la adición de factor tisular (TF) y la ruta extrínseca. Como P70 aceleró la coagulación mediante FVa, una combinación de TF y sílice unida a P70 mejoró la coagulación a través de la capacidad del polifosfato para acelerar la fase de propagación de la coagulación sanguínea. Se compararon diversas mezclas de TF y nanopartículas. Los dos tiempos de coagulación más bajos ocurrieron como resultado de 1 ng/ml de TF o 0,5 ng/ml de TF mezclado con 0,676 mg/ml de sílice unida a P70. Aunque las dos condiciones comparten un tiempo de coagulación similar, la sílice unida a P70 aceleró rápidamente el crecimiento del coágulo como se ilustra por la puntuación de índice de coagulación más grande (FIG. 61). La sílice unida a P70 también dio condiciones reproducibles, lo que puede facilitar una reducción de los efectos secundarios adversos. El factor tisular formó un pequeño coágulo rápidamente al añadirlo al plasma, pero el coágulo creció a un ritmo lento. Estos ensayos mostraron que incluso en condiciones adversas, las partículas unidas a P70 aumentaron rápidamente la coagulación a través de la mediación de FXa y trombina. Como tal, el polifosfato puede acelerar la producción de trombina en un sangrado en progreso y, por lo tanto, limitar la pérdida de sangre.

Cuando se unen a la superficie de nanopartículas, APTES y otros reticuladores redujeron la superficie activa para la coagulación (FIGS. 62 y 64). Se realizaron experimentos para variar la relación de APTES a sílice para optimizar un TSP que retendría una naturaleza inerte doble en vasos sanguíneos sanos y procoagulante cuando se activa. Cuando se funcionaliza únicamente con APTES, el TSP retuvo su naturaleza procoagulante. Cuando PEG se conecta al TSP mediante el puente APTES, el TSP estaba protegido. El uso de PEG de tamaño 5k o 20k disminuyó los tiempos de coagulación para que fueran comparables a los obtenidos con plasma recalcificado. Reemplazar sílice con titania como armazón dio como resultado tiempos de coagulación similares (FIG. 67).

Se preparó un TSP que permaneció inactivo en vasos sanguíneos sanos, mientras se activa en el sitio de la herida para obtener un agente terapéutico eficaz para el sangrado interno que solo está activo en el sitio del sangrado mientras permanece inactivo en los vasos sanguíneos sanos. La FIG. 64 muestra que, aparte de APTES, las nanopartículas permanecieron activas incluso cuando se unieron el conector SPDP y el péptido, ya que el tiempo de coagulación se mantuvo bajo. Cuando se unió el PEG, el tiempo de coagulación fue comparable al del plasma recalcificado sin las partículas, estableciendo así que las nanopartículas PEGiladas con un peso molecular de PEG superior a 5k no eran coagulantes. Las enzimas pueden usarse para escindir el péptido y liberar el PEG. Por ejemplo, se puede usar una secuencia IEGR en el péptido y FXa como enzima. La actividad proteolítica de la enzima se puede cuantificar por fluorescencia y su velocidad de reacción (cinética enzimática) en comparación con TCEP, un potente agente reductor versátil.

Además de TEG, La respuesta del umbral de coagulación se probó utilizando un colorante de cumarina azul específico para trombina. Se añadió una pequeña concentración de colorante al plasma recalcificado. A medida que avanzaba la coagulación y se activaba la trombina, la trombina escindió el colorante de cumarina haciendo que la solución fuera fluorescente. Por ejemplo, la explosión de trombina indicada por la fluorescencia puede indicar la formación de coágulos. Un microscopio de fluorescencia capturó el cambio cualitativo como se muestra en la FIG. 70. Se usó un microscopio y/o un lector de placas para controlar la coagulación a través de la fluorescencia del colorante. El lector de placas puede medir hasta 96 muestras al mismo tiempo. Esto permitió el estudio de varios TSP junto con una concentración estándar de trombina al mismo tiempo para determinar el TSP más activo. Se pueden estudiar las partículas agrupadas, así como las que están finamente dispersas en plasma.

## Ejemplo 6

### Partículas intercambiables por umbral (TSP)

Se realizaron experimentos para desarrollar la administración dirigida de nanopartículas funcionalizadas con cantidades controladas de poliP. Estas partículas sintonizables pueden dirigirse selectivamente a sitios de lesión en

respuesta a estímulos apropiados, tales como una caída de temperatura sin la inducción de coagulación en otros lugares del cuerpo.

5 Se usó una preparación de poliP de alto PM (también conocido como "vidrio de fosfato de sodio insoluble") como material de partida para preparar fracciones de poliP de las longitudes de polímero deseadas. El PoliP de alto PM era en gran medida insoluble en agua, ya que consistía principalmente en polímeros que tenían miles de unidades de fosfato de longitud. Se suspendió poliP de alto PM en una solución de LiCl 0,25 M no tamponada a 100 °C con agitación constante, y dio como resultado que la mayoría de la poliP se solubilizara y se disolviera. Se observó un acortamiento dependiente del tiempo de la longitud media del polímero de los poliP durante el calentamiento (FIG. 10 71). El pH ligeramente ácido de las soluciones de poliP resultó en una hidrólisis ácida leve de los polímeros. La velocidad de la hidrólisis pareció aumentar con el tiempo, que fue el resultado de la acidificación gradual de la solución a medida que los polímeros poliP se hidrolizaban. La acidificación gradual de la solución de poliP aceleró gradualmente la velocidad de hidrólisis de poliP.

15 La hidrólisis de los enlaces de fosfoanhídrido en poliP también se catalizó en condiciones básicas, y la acidificación gradual de la solución durante la hidrólisis de poliP disminuyó gradualmente la velocidad de hidrólisis, a diferencia de la hidrólisis ácida cuya tasa aumentó con el tiempo. Se añadieron cantidades variables de LiOH a las soluciones de LiCl en donde poliP se agitó a 100 °C. Se observó un acortamiento gradual dependiente del tiempo de las cadenas de poliP en función de la concentración inicial de LiOH, que estaba acompañado por los polímeros poliP "insolubles" que se hicieron solubles en agua (FIG. 72). El poliP de alto PM se suspendió, con agitación, en una combinación de 20 LiCl y LiOH a 100 °C hasta que se obtuvieron las longitudes medias de polímero deseadas y se solubilizó esencialmente el 100 % del material. Este método fue robusto y reproducible, y escalable a cantidades de gramo de poliP y superiores.

25 Las condiciones para solubilizar e hidrolizar parcialmente poliP con LiOH/LiCl se ajustaron para producir las longitudes medias de polímero deseadas. En algunos casos, El método dio como resultado preparaciones de poliP de tamaños heterogéneos. Los experimentos se realizaron para fraccionar más el poliP después de la hidrólisis de bases. Se probó la precipitación diferencial de poliP usando combinaciones variables de acetona y concentraciones de sal (por ejemplo, NaCl, KCl y LiCl). Además, concentraciones variables de isopropanol y NaCl permitieron la 30 producción de fracciones de poliP de tamaño relativamente estrecho, comenzando con poliP de alto PM que había sido previamente solubilizado y parcialmente hidrolizado usando el procedimiento LiOH/LiCl descrito anteriormente (ver la FIG. 73 para un ejemplo). Las condiciones anteriores se usaron para obtener intervalos de tamaño de poliP de ~40 a ~1500 unidades de fosfato de longitud, en cantidades de gramos y más.

### 35 Síntesis de nanopartículas de citrato de oro

Se sintetizaron nanopartículas de oro con un diámetro promedio de 10 nm, 15 nm y 50 nm utilizando el Método Turkevich. El tamaño promedio y la distribución del tamaño de las nanopartículas de oro se confirmaron por 40 dispersión dinámica de luz (DLS) y absorbancia UV-vis (Tabla 9 y FIG. 74).

**Tabla 9 - Comparación de Nanopartículas de oro de 10 nm, 15 nm, 50 nm y muestras comerciales con su pico UV-vis, Tamaño de partículas medido por DLS y polidispersidad**

	Relación molar (Cg: Cc)	Concentración de oro	Temperatura de reacción	Pico de UV	Tamaño	Polidispersidad
Reacción A	1:4	0,4 mM	95 °C	520nm	13,6nm	0,175
			60 °C	522nm	14,7nm	0,25
Reacción B	1:3	0,4 mM	95 °C	522nm	17,2nm	0,178
			60 °C	522nm	18,3nm	0,227
Reacción C	1:1	0,4 mM	95 °C	533nm	35,7nm	0,196
			60 °C	534nm	37,9nm	0,256
Comercial_10		0,29 mM		519nm	11,3nm	0,24
Comercial_15		0,24 mM		521nm	15,6nm	0,19
Comercial_50		2,89 mM		532nm	42,1nm	0,11

### 45 Conjugados de nanopartículas de PoliP-oro

La unión de poliP a las nanopartículas de oro se logró mediante reacciones en dos etapas. (1) Se permitió que PoliP reaccionara con cistamina; (2) Los conjugados de PoliP-cistamina se hicieron reaccionar luego con partículas de oro por desplazamiento de los grupos citrato (FIGS. 75A y 75B). Los compuestos que contienen aminas primarias como polietilenimina, Amina-PEG<sub>2</sub>-biotina, y espermidina se usaron para unir covalentemente grupos de amina primaria 50 con los fosfatos terminales de poliP mediante una reacción mediada por EDAC. Este método se usó para el acoplamiento de poliP con cistamina, una molécula de disulfuro que contiene dos grupos de aminas primarias. El resto disulfuro en la cistamina permitió la unión al oro. Diversas condiciones (incluyendo temperatura, tiempo de reacción, pH, y soluciones tampón) se probaron para optimizar la eficacia y el rendimiento de la reacción.

Se probaron los efectos de las nanopartículas de poliP-oro (con diferentes tamaños y números de agregación de poliP) en la cinética de coagulación de la sangre. Se seleccionaron los siguientes grupos de control para compararlos con los conjugados de nanopartículas de poliP-oro: (1) poliP libre con el mismo peso molecular a las mismas concentraciones; (2) nanopartículas de citrato de oro sin poliP; y (3) nanopartículas de oro PEGiladas. Se lograron varios números de agregación de poliP en nanopartículas de oro al agregar tiol PEG para competir con poliP-cistamina para el reemplazo de ligando.

**Reacción de conjugación de PoliP-cistamina**

Diversas condiciones (incluyendo temperatura, tiempo de reacción, pH, y soluciones tampón) se probaron para la reacción de acoplamiento de poliP con cistamina. Se permitió que Polip reaccionara con cistamina a temperatura ambiente de 48 a 72 horas. El pH para la reacción fue aproximadamente 8. Se usó un ensayo de fluorescamina para evaluar la cantidad de aminas primarias sin reaccionar en la cistamina, indicando la eficacia de conjugación. El rendimiento de la reacción fue aproximadamente del 90 % como se ve en (Tabla 10).

**Tabla 10 - Eficacia de conjugación de poliP y cistamina en diversas condiciones de pH.**

Tampón	pH de reacción	Eficacia (24 h)	Eficacia (48 h)	Eficacia (72 h)
MOPS (100 mM)	7,1	61,5 %	65,0 %	71,1 %
MOPS (100 mM)	7,6	72,7 %	74,3 %	78,7 %
MOPS (100 mM)	8,1	79,6 %	87,3 %	88,1 %
MOPS (100 mM)	8,5	83,5 %	87,3 %	88,6 %
MES (100 mM)	7,8	81,4 %	89,5 %	-

El estudio de hidrólisis del enlace P-N se llevó a cabo para evaluar la estabilidad del ligando de poliPcistamina. Después de 72 horas de reacción, el ensayo de fluorescamina se realizó para detectar la concentración de la cistamina sin reaccionar. Un aumento de la concentración de cistamina libre después del ajuste del pH de las reacciones indicó la hidrólisis del enlace P-N. Las muestras se analizaron durante dos semanas y se cuantificaron mediante el ensayo de fluorescamina. El enlace P-N se hidrolizó en condiciones ácidas a pH 6,02. Era estable por encima de pH 7 como se ve en la Tabla 11 a continuación.

**Tabla 11 - Concentración de cistamina libre (µM) antes y después del ajuste de pH**

pH	Concentración de amina primaria (µM)				
	Antes del ajuste de pH	Después de 1 día	Después de 5 días	Después de 8 días	Después de 13 días
6,02	16,4	30,0	26,4	27,6	37,18
7,07	16,4	186	14,5	12,9	13,72
9,05	16,4	17,1	14,8	14,2	1,31
10,01	16,4	17,2	14,8	12,7	14,73

**Reacción de poliP-cistamina con nanopartículas de oro**

El conjugado poliP-cistamina se dejó reaccionar con nanopartículas de oro de varios tamaños (10 nm, 15 nm, 50 nm) desplazando el grupo de citrato. Después de 24 horas de reacción, se inició la adición de sal para aumentar la cobertura de la nanopartícula de oro con poliP. El lento aumento en la concentración de sal en la reacción durante un periodo de cuatro días (concentración final de NaCl 0,1 M) permitió que el poliP ya unido se extendiera, creando más espacio para que los ligandos sin reaccionar accedan a la superficie del oro y, por lo tanto, se produzca un aumento en el número de agregación.

El proceso de purificación de las nanopartículas de oro implicaba la eliminación del exceso de, poliP de flujo libre dejado en la solución. La centrifugación se usó para eliminar ~99 % de poliP de flujo libre y recuperar la mayoría de las partículas de oro (~ 90%) sin causar agregación. Dependiendo del tamaño de las nanopartículas de oro, Se encontraron las siguientes condiciones (Tabla 12).

**Tabla 12 - Condiciones de centrifugación dependientes del tamaño**

Tamaño de Au NPs	PM	Fuerza G	Tiempo hasta granulación	Repetir centrifugación
10 nm	10000	8176	60 min	3x
15 nm	10000	8176	30 min	2x
50 nm	8000	5223	10 min	3x

El tiempo de granulación, t, se calculó utilizando la ecuación 1 de flujo:

$$t = \frac{k}{s} \quad (1)$$

en donde k es la eficacia de granulación del rotor y S es el coeficiente de sedimentación. La eficiencia de granulación (k) se calculó utilizando la Ecuación 2 a continuación:

$$k = \frac{2,53 \times 10^{11} (En \frac{r_{\max}}{r_{\min}})}{(RPM)^2} \quad (2)$$

$r_{\max}$  y  $r_{\min}$  son los radios máximos y mínimos de la centrifugadora, respectivamente, y RPM es la velocidad en revoluciones por minuto. Los valores  $r_{\max}$  y  $r_{\min}$  se pueden medir como se muestra en la FIG. 76 según el tipo de centrifugadora utilizada.

El coeficiente de sedimentación, S, se puede calcular usando la Ecuación 3:

$$S = \frac{2(\rho_s - \rho_l)}{9\eta} \left(\frac{d}{2}\right)^2 \quad (3)$$

en donde  $\rho_s$  y  $\rho_l$  son las densidades de nanopartículas de oro y agua, respectivamente,  $\eta$  es la viscosidad del agua, y d es el diámetro de las nanopartículas de oro.

Después de cada centrifugación, se retiró el sobrenadante y se volvieron a suspender los gránulos en un tampón de pH 7,4 para garantizar la estabilidad del ligando de poliP-cistamina. Como mostró el estudio de hidrólisis, el pH de las muestras afectó la hidrólisis del enlace P-N. Por tanto, las partículas se resuspendieron con un tampón a un pH superior a 7.

La dispersión dinámica de la luz (DLS) y la espectroscopía UV-vis se utilizaron para caracterizar el tamaño y la distribución del tamaño de las partículas. Después de la purificación/separación mediante centrifugación, las concentraciones de poliP se midieron usando el ensayo de verde de malaquita y las concentraciones de nanopartículas de oro se obtuvieron por UV-vis. Luego se calcularon los números de agregación de poliP en la superficie de las nanopartículas de oro en base a las mediciones anteriores. Las siguientes nanopartículas de poliP-oro (Tablas 13-15) se sintetizaron y caracterizaron.

**Tabla 13 - Nanopartículas de poliP45-oro sintetizadas**

Muestra	Tamaño PoliP (N.º de unidades repetidas)	Conc. MonoP (mM)	Conc. Partícula de oro (nM)	Agregación N.º	Pico UV-vis para oro en volumen	Pico después de centrifugar
P45_10nm_1	45	80,00	104,7	16,98	519	523
P45_10nm_2	45	80,00	90,34	19,68	519	524
P45_15nm_1	45	80,00	29,29	60,70	521	523
P45_15nm_2	45	80,00	37,33	47,62	521	523
P45_50nm_1	45	80,00	3,74	475,34	533	533
P45_50nm_2	45	80,00	2,03	875,75	533	533

**Tabla 14 - Nanopartículas de poliP70-oro sintetizadas**

Muestra	Tamaño PoliP	Conc. MonoP (mM)	Conc. Partícula de oro (nM)	Agregación N.º	Pico UV-vis para oro en volumen	Pico después de centrifugar
P70_10nm_1	70	75,00	31,98	33,50	519	524
P70_10nm_2	70	75,00	153,50	6,98	519	528
P70_15nm_1	70	75,00	16,14	66,38	521	522
P70_15nm_2	70	75,00	32,05	33,43	521	522
P70_50nm_1	70	75,00	2,068	518,09	532	533
P70_50nm_2	70	75,00	2,010	533,05	532	533

**Tabla 15 - Nanopartículas de poliP-PEG (3:1)-oro sintetizadas**

Muestra	PoliP	Conc. MonoP (mM)	Conc. Partícula de oro (nM)	Agregación N.º	Pico UV-vis para oro en volumen	Pico después de centrifugar
P70_Peg_10nm_1	70	7500	76,00	14,1	519	525
P70_Peg_15nm_1	70	75,00	34,69	30,88	521	521
P70_Peg_50nm_1	70	75,00	3,83	279,7	532	533
P45_Peg_10nm_2	45	75,00	73,14	22,79	519	523
P46_Peg_15nm_2	45	75,0	35,50	46,95	521	526

### **Efectos de la nanopartícula de poliP-oro en la cinética de coagulación de la sangre - medida por coagulometría.**

Las muestras presentadas en la sección anterior se analizaron para determinar la coagulación mediante coagulometría. Los experimentos realizados se centraron en la activación de la ruta de contacto. La activación de la ruta de contacto por nanopartículas de poliP-oro se expresó en términos de concentraciones equivalentes de poliP de cadena larga (FIGS. 77 y 78). PoliP de cadena larga, que era una mezcla heterogénea de polímeros de más de 500 unidades repetidas, indujo la ruta de contacto intrínseca de la coagulación de la sangre. Los resultados indicaron que las muestras de nanopartículas de poliP45-oro tenían una actividad procoagulante aumentada en comparación con poliP45 de flujo libre de la misma concentración en solución (FIG. 77). Para cada diámetro de partícula de las muestras de nanopartículas de poliP45-oro que se sintetizaron, hubo una correlación directa entre el número de agregación y el aumento de la actividad procoagulante. Un aumento de la actividad de algunas muestras de 10 nm y 15 nm en comparación con 50 nm puede deberse a la aglomeración de nanopartículas de oro de menor tamaño, como lo indica el cambio de pico UV-vis después de la purificación. En algunos casos, la coagulación puede depender de la densidad superficial del ligando procoagulante poliP y del área superficial total del oro. Las nanopartículas de citrato de oro también actuaron como iniciadores de la ruta de contacto debido a sus cargas superficiales negativas, pero en menor medida que los conjugados de nanopartículas de poliP-oro.

Los experimentos de coagulometría de activación de la ruta de contacto inicial para nanopartículas de poliP70-oro mostraron una mayor actividad de muestras de poliP70-oro de 50 nm en comparación con poliP70 de flujo libre en solución. No hubo diferencias significativas entre las nanopartículas de poliP70-oro de 10 nm y 15 nm y el poliP70 acuoso correspondiente (FIG. 78). El aumento de la actividad de la nanopartícula de poliP70-oro de 50 nm se muestra en FIGS. 79-81. La nanopartícula de oro de 50 nm totalmente PEGilada como control negativo no mostró actividad procoagulante (FIG. 81). La nanopartícula poliP70-oro de 50 nm parcialmente PEGilada (con menos poliP conjugado con nanopartículas de oro) mostró una actividad procoagulante reducida como se esperaba, que todavía era más activo que el poliP70 de flujo libre en la misma concentración.

Los resultados indican que las partículas de oro funcionalizadas con poliP son más procoagulantes que las poliP acuosas de la misma longitud de polímero. Las partículas de 50 nm indujeron la coagulación sanguínea.

### **Cinética de coagulación de la sangre - medida mediante ensayos fluorescentes basados en microplacas**

La activación de la ruta intrínseca de la coagulación de la sangre se evaluó utilizando un sustrato de trombina fluorogénica. Un control negativo que no contiene  $\text{Ca}^{2+}$ , y también se ejecutó un control positivo que no contiene poliP para validar el experimento. Para encontrar el tiempo de coagulación, los datos se ajustaron a una función sigmoidea. La tasa de escisión del sustrato de trombina se encontró tomando el tiempo derivado de la intensidad de fluorescencia de la curva ajustada, y el tiempo de coagulación se definió en las muestras relevantes como la mitad de la tasa máxima de escisión del sustrato. La cinética de coagulación se midió primero usando poliP45 libre. La inducción de la coagulación se produjo solo en presencia de cationes de calcio (FIG. 82).

### **Agregación controlada de partículas mediante el uso de polímeros termosensibles**

La agregación controlada de nanopartículas más pequeñas (~15 nm) en las más grandes (>50 nm) puede desencadenar la coagulación de la sangre rápidamente a través del inicio de la ruta de contacto, así como FV en el sitio del daño de los vasos o los órganos, sin activar significativamente la coagulación en otros lugares. La disminución de la temperatura corporal en el sitio del trauma local debido a la falta de sangre y oxígeno puede usarse para iniciar una coagulación controlada en el sitio del traumatismo local. El poli(ácido acrílico) (PAAc) y la poli(acrilamida) (PAAm) se conjugaron con nanopartículas de oro a través de enlaces disulfuro. PAAc y PAAm son polímeros termosensibles con una temperatura de solución crítica superior (UCST) de alrededor de 33-35 °C. Cuando la temperatura estaba por debajo del UCST, PAAc y PAAm formaron enlaces de hidrógeno intermoleculares, lo que aumentó la hidrofobia de los polímeros y dio como resultado la agregación de las partículas y la separación de fases (FIG. 83A). El proceso era reversible. Cuando la temperatura era superior a la UCST, el enlace de hidrógeno se desmontó y la separación de fases desapareció.

#### **Enlace de hidrógeno reversible**

Se observó el ensamblaje y desensamblaje de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre PAAc y PAAm (FIGS. 83B-83D). Se preparó una mezcla de 10 % en peso de PAAc y 10 % en peso de PAAm a temperatura ambiente (~20 °C), que estaba debajo del UCST. El enlace de hidrógeno se formó inmediatamente y resultó en la turbidez de la solución, que indicaba separación de fases entre los polímeros y el agua (FIG. 83B). La muestra se calentó luego hasta 40 °C en un baño de agua. La solución se volvió transparente, indicando el desmontaje del enlace de hidrógeno (FIG. 83C). La muestra se volvió turbia nuevamente cuando se enfrió a temperatura ambiente, indicando el reformado del enlace de hidrógeno y la reversibilidad del proceso (FIG. 83D).

#### **Reacción de conjugación y caracterización de partículas**

Se involucraron tres etapas para sintetizar y caracterizar las nanopartículas conjugadas con los polímeros

termosensibles, como se muestra en la FIG. 84. (1) PAAc y PAAm se conjugaron con cistamina y ácido 3,3'-ditiopropiónico (DDA), respectivamente, que contienen enlaces disulfuro. (2) PAAc-cistamina o PAAm-DDA se unió a la superficie de partículas de oro mediante el enlace disulfuro. (3) Las partículas se separaron de las moléculas sin reaccionar mediante centrifugación y se caracterizaron mediante dispersión de luz dinámica (DLS) y espectroscopía UV-vis.

PAAc se conjugó con cistamina usando el reactivo de reticulación de longitud cero, EDAC (1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil]carbodiimida). Se usaron diferentes condiciones de pH para evaluar la eficiencia de conjugación entre PAAc y cistamina. Se usó una cantidad en exceso de PAAc para asegurar la reacción completa de la cistamina. El ensayo de fluorescamina se utilizó para evaluar la cantidad de aminas primarias sin reaccionar en la cistamina, indicando la eficacia de conjugación. Los resultados se muestran en la Tabla 16. Las reacciones fueron eficaces en condiciones neutras y ligeramente básicas. Se lograron eficacias de conjugación superiores al 95 % consistentemente para todas las muestras. Se usaron condiciones de reacción similares para la reacción de PAAm con DDA.

**Tabla 16 - Eficacia de conjugación de PAAc-cistamina en diversas condiciones de pH**

	pH	Eficacia (24 h)	Eficacia (48 h)
MES_pH4	7,2	96,1 %	96,6 %
MES_pH6	8,0	97,7 %	95,5 %
MES_pH8	9,1	96,5 %	97,8 %

#### Conjugación PAAc-oro y PAAm-oro

Se usaron enlaces disulfuro en PAAc-cistamina y PAAm-DDA para reemplazar el citrato en la superficie de las nanopartículas de oro a través del intercambio de ligandos. La PAAc-cistamina o PAAm-DDA se mezcló con nanopartículas de citrato de oro en agua DI durante 24 horas. A continuación, se añadieron 10 µl de NaCl 5 M durante cuatro días consecutivos para aumentar la fuerza iónica de la solución para que más ligandos pudieran acceder a la superficie de oro. La centrifugación se usó para eliminar los polímeros y reactivos sin reaccionar en las suspensiones. Se usaron espectroscopía UV-visible y DLS para confirmar los tamaños de las conjugaciones PAAc-oro y PAAm-oro. El cambio del pico de absorbancia indicó la agregación de las nanopartículas de oro.

Se probaron varias condiciones para generar una conjugación estable de PAAc-oro, como se muestra en la Tabla 17. El enlace C-N mostró buena estabilidad en un amplio intervalo de pH desde pH 4 a pH 9. El reemplazo inicial del ligando se probó con y sin tampones.

**Tabla 17 - Estabilidad de las nanopartículas de oro conjugadas con PAAc**

ID de muestra	Tamaño de partícula de oro (nm)	PAAc-cistamina (0,1 mM)	poliP-cistamina (0,1 mM)	Tampón	UV (AS)	UV (AP)	Estabilidad
PAAc_10nm_poliP(13)	10	7,5 µl	22,5 µl	MES (0,5 M) 120 µl	519,5	522	sí
PAAc_10nm_poliP(11)	10	15 µl	15 µl	MES (0,5 M) 120 µl	520	522	sí
PAAc_10nm_30_MES	10	30 µl	-	MES (0,5 M) 120 µl	527	-	no
PAAc_10nm_30_BA	10	30 µl	-	BA (0,25 M) 30 µl	608	-	no
PAAc_10nm_20_BA	10	20 µl	-	BA (0,25 M) 30 µl	617,5	-	no
PAAc_10nm_30	10	30 µl	-	-	535,5	-	no
PAAc_10nm_20	10	20 µl	-	-	533	-	no
PAAc_10nm_15	10	15 µl	-	-	534,5	-	no
PAAc_15nm_15	15	15 µl	-	-	522	523	sí

Abreviaturas usadas en la tabla: AS - después de adición de sal, y AP - después de purificación

La conjugación de PAAm-DDA con nanopartículas de oro para formar PAAm-oro se caracterizó y resumió en la Tabla 18.

Tabla 18 - Estabilidad de nanopartículas de oro conjugadas con PAAm

ID de muestra	Tamaño de partícula de oro (nm)	PAAm-DDA (0,1 mM)	poliP-cistamina (0,1 mM)	Tampón	UV (AS)	UV (AP)	Estabilidad
PAAm_10nm_poliP(13)	10	7,5 µl	22,5 µl	MES (0,5 M) 120 µl	520,5	521	sí
PAAm_10nm_poliP(11)	10	15 µl	15 µl	MES (0,5 M) 120 µl	518,5	521,5	sí
PAAm_10nm_30_MES	10	30 µl	-	MES (0,5 M) 120 µl	527	526,5	no
PAAm_10nm_30_BA	10	30 µl	-	BA (0,25 M) 30 µl	521	524	sí
PAAm_10nm_20_BA	10	20 µl	-	BA (0,25 M) 30 µl	519,5	521	sí
PAAm_15nm_15	15	15 µl	-	-	530	-	no
PAAm_15nm_15_BA	15	15 µl	-	BA (0,25 M) 30 µl	533	-	no
PAAc_15nm_7,5_BA	15	7,5 µl	-	BA (0,25 M) 30 µl	525,5	525,5	sí

Abreviaturas usadas en la tabla: AS - después de adición de sal, y AP - después de purificación

#### Agregación reversible de partículas al cambiar la temperatura

- 5 PAAc\_10nm\_poliP(13) y PAAm\_10nm\_poliP(13) se mezclaron en una relación de volumen 1:1. Se utilizaron DLS y absorbancia UV-visible para evaluar el tamaño de las nanopartículas de oro a diferentes temperaturas. Los picos de absorbancia de PAAc\_10nm\_poliP (13) y PAAm\_10nm\_poliP (13) fueron 523,5 y 522, respectivamente. Después de mezclar PAAc\_10nm\_poliP (13) y PAAm\_10nm\_poliP (13) en una relación 1:1 a 20 °C, el pico de absorbancia fue de 524 nm, que no mostró un aumento significativo. La agregación de PAAc\_10nm\_poliP (13) y PAAm\_10nm\_poliP (13), si la hubiera, fue causada por la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre PAAc y PAAm, lo cual puede no inducir ningún cambio significativo en el pico ya que el núcleo duro de las partículas aún puede estar suficientemente separado.
- 10
- 15 DLS también se usó para probar la distribución de tamaños de nanopartículas de oro a diferentes temperaturas. El tamaño de PAAc\_10nm\_poliP (13) y PAAm\_10nm\_poliP (13) alcanzó su punto máximo a 9 nm constantemente a 25 °C y 37 °C.

20 El tamaño y la distribución del tamaño de la mezcla de PAAc\_10nm\_poliP (13) y PAAm\_10nm\_poliP (13) a 25 °C, 33 °C y 37 °C se muestran en la FIG. 85. Se observó agregación a 25 °C y 33 °C. El tamaño de PAAc\_10nm\_poliP (13) a 25 °C y 33 °C fue de 15,2 nm y 14 nm respectivamente, mientras que el tamaño original de las nanopartículas de oro por DLS era de aproximadamente 9 nm. Cuando la temperatura se aumentó a 37 °C, que estaba por encima de la UCST de PAAc y PAAm, el enlace de hidrógeno se desmontó y el tamaño de las nanopartículas de oro se redujo de nuevo a aproximadamente 9 nm.

25 Una mezcla de PAAc\_10nm\_poliP (11) y PAAm\_10nm\_poliP (11) en una relación 1:1 también mostró resultados similares de agregación de partículas (FIG. 86). A 25 °C, el tamaño promedio medido por DLS fue de 17,5 nm. Cuando la temperatura se aumentó a 37 °C, apareció un pequeño pico a 8 nm que indicaba el desmontaje del enlace de hidrógeno intermolecular entre PAAc y PAAm.

30 PAAc\_10nm\_poliP (11) o PAAm\_10nm\_poliP (11) tenían más PAAc o PAAm y menos poliP en la superficie de las nanopartículas de oro en comparación con PAAc\_10nm\_poliP (13) o PAAm\_10nm\_poliP (13). Por lo tanto, fue relativamente más difícil desmontar todos los enlaces de hidrógeno y resuspender las nanopartículas a su tamaño original.

35 Para generar una agregación más grande, PAAc o PAAm se conjugó a la superficie de nanopartículas de oro solo sin poliP. Sin embargo, al mezclar PAAc\_15nm\_15 y PAAm\_10nm\_20\_BA en una proporción de 1:1, no se encontró agregación.

#### 40 Síntesis de nanopartículas de sílice (SNP)

Se realizaron experimentos con nanopartículas de sílice (SNP) y nanopartículas de sílice funcionalizadas con poliP (SNP-P70) para medir el efecto del tamaño y la concentración de las partículas de sílice en la coagulación. Las partículas superiores a 10 nm se sintetizaron siguiendo un método Stöber modificado y se recuperaron mediante centrifugación. Los diferentes tamaños de nanopartículas se obtuvieron variando las cantidades de tetraetoxisilano (TEOS) y amoníaco (NH<sub>4</sub>OH) (FIG. 87). También se analizaron nanopartículas de sílice Ludox por debajo de 10 nm

(Sigma Aldrich). Se aislaron nanopartículas de sílice por debajo de 50 nm por ultrafiltración y ultracentrifugación para experimentos de coagulación y funcionalización. Se logró un rendimiento superior al 40 % utilizando más del 4 % de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . La síntesis por debajo del 4 % de  $\text{NH}_4\text{OH}$  produjo un rendimiento por debajo del 40 % (FIG. 88). La falta de amoníaco puede haber reducido la catálisis de la reacción de hidrólisis de TEOS. Los ensayos de potencial Zeta mostraron que SNP tenían una carga negativa en el fluido corporal simulado, facilitando la activación de la vía intrínseca mediante la activación de FXII. El potencial Zeta no mostró un cambio sistemático significativo en la coagulación con respecto al tamaño o al pH.

Los experimentos de coagulación descritos anteriormente compararon las partículas de sílice a una concentración fija de 0,68 mg/ml (solución madre de 25 mg/ml) o a un tamaño fijo de 55 nm para determinar los límites del intervalo de alta actividad. Cada partícula formó un coágulo inicial (R) entre 3 y 5 min. El umbral para el valor R mínimo se produjo a un tamaño de partícula de ~30 nm. Los experimentos en donde se sintetizaron partículas por debajo de 20 nm exhibieron una distribución de tamaño bimodal cuando se midieron usando DLS. La distribución del tamaño bimodal puede ser el resultado de la falta de amoníaco.

Utilizando fosfolípidos que aumentan la coagulación a través de FXa, R se minimizó a menos de dos minutos. En la FIG. 89, se examinó la dependencia de la concentración de R para dos SNP y SNP-P70. P70 era una cadena de poliP que tenía aproximadamente 70meros de longitud, que era aproximadamente del mismo tamaño que el poliP producido por las plaquetas activadas como parte de la cascada de coagulación. A bajas concentraciones de partículas, R fue alto (el tiempo de coagulación fue largo). A medida que aumentaba la concentración de partículas, R disminuyó hasta que se cumplió la condición umbral. Para sílice desnuda, la concentración umbral se produjo a 0,54 mg/ml. SNP-P70 alcanzó un umbral a una concentración de 0,27 mg/ml, la mitad que el SNP desnudo. Por encima del umbral de concentración, el valor R se mantuvo bajo, hasta que a una concentración mucho más alta las partículas pueden inhibir la coagulación debido a la agregación de partículas o la dilución de los factores plasmáticos sobre el área de superficie de la partícula.

Otros parámetros también pueden ser evaluados, como tasa de formación de coágulos y tamaño del coágulo. Dado que los agentes unidos a la partícula pueden afectar el tiempo de formación inicial del coágulo, pero podría acelerar la coagulación cuando se inicia o dar como resultado la formación de un coágulo más grande. Los ensayos confirmaron que las partículas mantuvieron estabilidad y tamaño, en todas las concentraciones, indicando tamaños de partícula variados debido a las condiciones de síntesis.

Además de las nanopartículas sólidas no porosas, las nanoesferas mesoporosas de poro grande (MSN) se pueden usar para administrar proteínas procoagulantes como la trombina, protombina o factor tisular para las heridas. El gran tamaño de poro y la mayor superficie accesible pueden aumentar la coagulación al permitir que las proteínas se adsorban a la superficie y se activen. Por ejemplo, se pueden usar nanopartículas mesoporosas ordenadas en el rango de tamaño de 50-200 nm con un tamaño de poro entre 10-30 nm.

Funcionalizar las nanopartículas con poliP o protrombina puede mejorar la naturaleza procoagulante de las partículas. El poliP utilizado tenía una longitud de ~70-meros (P70) que fue similar en tamaño al poliP secretado por las plaquetas humanas durante la coagulación. Se encontró que P70 directamente adsorbido en sílice aumenta el tamaño de partícula en varios nm. Los SNP se probaron con y sin poliP adsorbido y se descubrió que los SNP unidos a P70 disminuían significativamente el tiempo de coagulación en comparación con el SNP desnudo (FIG. 89). SNP-P70 también mejoró el tiempo de coagulación en comparación con P70 añadido directamente al plasma. El armazón SNP sirvió así como un mecanismo para administrar el agente desencadenante P70 a la herida para iniciar la coagulación.

Los experimentos se realizaron usando cadenas de poliP más largas, como poliP de ~700-meros (P700). Se demostró que PoliP con un intervalo de tamaño superior a 500meros acelera el contacto o la ruta intrínseca activando FXII. El P700 se unió a los armazones utilizando los mismos métodos descritos anteriormente. Se probaron cuatro proporciones diferentes de P700:SNP:0,2, 0,4, 0,6 y 1. Similar a P70, Los ensayos de coagulación sugirieron que el tiempo de coagulación disminuyó con una proporción de P700:SNP superior a 0,5. Una relación 1:1 minimizó el tiempo de coagulación (FIG. 90).

Muestras de nanopartículas de SNP, SNP-P70 y SNP-P700 se usaron para la cuantificación de poliP y otros ensayos de coagulación. Estos ensayos revelaron que las partículas SNP-P70 con una concentración de aproximadamente 25 nmol  $\text{PO}_4/\text{mg}$  de SNP (cuantificado por hidrólisis) exhibió una mayor actividad procoagulante que las partículas SNP-P70 con una concentración de SNP de  $\text{PO}_4/\text{mg}$  molar mayor.

Además de TEG, la respuesta del umbral de coagulación también se probó utilizando un colorante de cumarina azul específico para trombina. Se añadió una pequeña concentración de colorante al plasma recalcificado. A medida que progresaba la coagulación y se producía trombina, la trombina escindió el colorante de cumarina haciendo que la solución fuera fluorescente. La fluorescencia rápida significaba la explosión de trombina, conduciendo a la formación de coágulos. Un microscopio de fluorescencia capturó el cambio cualitativo como se muestra en la FIG. 70.

La generación de trombina también se controló usando un lector de placas. Al leer la fluorescencia cada 10

segundos, se identificó el estallido de trombina. Cuando se produjo la coagulación cerca de la sección de rápido aumento de la explosión de trombina, el tiempo de coagulación se determinó a partir del gráfico de datos de fluorescencia.

5 Después de determinar la actividad procoagulante de SNP-P70 en condiciones normales como se discutió anteriormente, los TSP SNP-P70 se aplicaron en condiciones traumáticas. Una lesión traumática puede convertirse rápidamente en coagulopatía, el colapso fundamental de la cascada de coagulación humana. Aunque la coagulopatía puede existir como una forma hipercoagulante o hipocoagulante, como se usa aquí, la coagulopatía es el colapso fundamental de la cascada de coagulación que impide la formación de coágulos. En presencia de  
10 traumatismo, el cuerpo coagulopático se debilita de manera que las rutas anticoagulantes se apoderan y no se puede formar un coágulo.

La coagulopatía existe en tres estados conocidos como "tríada letal" - dilución, hipotermia, y acidosis. Cada uno daña la cascada de una manera específica. En un estado coagulopático, los tres estados se combinan para inhibir la  
15 formación de coágulos. En estos experimentos, la dilución se imitó usando una solución tamponada con fosfato (PBS). La incubación de plasma por debajo de los 37 °C habituales se utilizó para crear condiciones hipotérmicas. Se usó una solución diluida de ácido fosfórico para acidificar el plasma por debajo de un pH de 7,1 para crear una condición de acidosis. Los experimentos usaron una concentración establecida de factor de tejido lipidado (LTF) -  
20 0,5 ng/ml para ensayos de TEG, 0,185 ng/ml para ensayos de colorante de fluorescencia - para producir el inicio oportuno de la cascada de coagulación mediante la ruta extrínseca y la respuesta principal del cuerpo a la lesión vascular. El TSP SNP-P70 se probó a 0,25 mg/ml sin LTF para comparar su capacidad de formar coágulos.

Debido a la pérdida de factores procoagulantes y anticoagulantes por la pérdida de sangre, la dilución comienza a inhibir significativamente la coagulación al nivel de ~50 %. Usando TEG y fluorescencia de colorante, se estableció  
25 una línea base de dilución. Se usó SNP-P70 (en el umbral de concentración de ~ 0,25 mg/ml identificado en nuestros experimentos de TEG) para revertir las condiciones coagulopáticas. SNP-P70 aceleró con éxito la explosión de trombina y la formación de coágulos. (FIGS. 91 y 92). FIG. 93 muestra un gráfico de tiempos de generación de trombina desde 100 % de plasma hasta 25 % de plasma; es decir: 100 % es 100% de plasma y 0 % de diluyente. FIG. 94 muestra un gráfico de fluorescencia en el tiempo, lo que indicaba que añadir SNP-P70  
30 generaba trombina rápidamente incluso bajo dilución plasmática severa.

La hipotermia, el segundo miembro de la tríada letal, ocurre cuando la temperatura corporal disminuye por debajo de 37 °C. La disminución de la temperatura conduce a una tasa disminuida en la cinética de muchos de los factores de  
35 coagulación, especialmente la formación del complejo del factor tisular - FVIIa (TF-FVIIa) durante la fase de inicio de la coagulación. A diferencia de la dilución en donde el déficit de fibrinógeno desencadena la disminución de la coagulación, la hipotermia ralentiza la coagulación pero no la previene. La adición de SNP-P70 al plasma hipotérmico dio como resultado una mejor coagulación en todos los parámetros de TEG. Se usó una fórmula de índice de coagulación para mostrar la naturaleza procoagulante del SNP-P70 TSP a una temperatura corporal inferior a la normal. El índice de coagulación (IC) combina las cuatro facetas del TEG - R, K, alfa y MA - en un solo  
40 valor; cuanto más positivo sea el CI, más fuerte es el procoagulante. FIG. 95 muestra un gráfico del tiempo de coagulación frente a temperatura, que indicó que los TSP de SNP-P70 iniciaron coágulos más rápido bajo hipotermia. FIG. 96 muestra un gráfico del índice de coagulación (IC) frente a la temperatura, que indicó que SNP-P70 mejoró la formación de coágulos en comparación con el factor de tejido lipidado (LTF).

45 Los experimentos anteriores mostraron que SNP-P70 redujo los tiempos de coagulación mientras se formaban coágulos fuertes en comparación con SNP y LTF desnudos. Los estudios en plasma deficiente en FXII mostraron que SNP-P70 inició la coagulación a través de la ruta de coagulación FXa. Finalmente, se demostró que SNP-P70 disminuye el tiempo de coagulación y acelera la generación de trombina en condiciones coagulopáticas que a menudo se encuentran en pacientes que han sufrido una herida traumática (por ejemplo, dilución e hipotermia).  
50

### Ejemplo 7

#### PoliP "Corona"

55 Las nanopartículas con una corona de poliP unida usando un enlace APTES se produjeron de acuerdo con los ejemplos discutidos anteriormente. Las partículas se probaron usando DLS para medir el tamaño y la carga superficial y en el TEG para determinar la actividad de coagulación.

FIG. 103 muestra un gráfico del potencial zeta frente a las cuentas totales para SNP funcionalizado solo con APTES (arriba) y SNP funcionalizado con poliP "corona" (abajo). El SNP funcionalizado con poliP "corona" mostró un cambio negativo en el potencial zeta en comparación con el SNP funcionalizado con APTES solamente. FIG. 104 muestra un gráfico del tiempo de coagulación frente al agente utilizado. LTF significa factor de tejido lipidado. NP significa SNP-poliP "corona". FIG. 105 muestra un gráfico de distribución de tamaño frente a intensidad para la nanopartícula de SNP-poliP "corona".  
60  
65

**Ejemplo 8****Protección de PoliP**

Los experimentos se realizaron usando EDAC para formar un enlace éster entre las superficies de nanopartículas de óxido inorgánico y poliP. Se dispersaron 0,2 g de una nanopartícula (por ejemplo, sílice u óxido de hierro) en agua desionizada a 70 °C. Se añadió una solución de 0,1 g de poliP y 150 mM (0,2888 g) EDAC en agua desionizada a la solución de nanopartículas. El volumen total de la solución fue de 10 ml. La solución resultante se agitó a 70 °C durante 75 minutos. Una vez completada la reacción, las partículas se enfriaron a temperatura ambiente. Las nanopartículas sólidas se recuperaron por centrifugación y se secaron durante la noche. Las partículas se probaron usando DLS para medir el tamaño y la carga superficial y en el TEG para determinar la actividad de coagulación.

FIG. 106 muestra un gráfico del tiempo de coagulación frente al mecanismo de administración la SNP-poliP "corona" sintetizada mediante la formación de éster como se describió anteriormente. De izquierda a derecha, las partículas fueron suspendidas en agua (H<sub>2</sub>O), solución de fosfolípidos (PL), solución de fosfolípidos y factor de tejido lipídado (PL+LTF) y con factor de tejido lipídado solo en agua (solo LTF).

**Ejemplo 9****Nanopartículas de óxido de hierro**

Las nanopartículas de óxido de hierro también pueden usarse como vehículos, que también puede facilitar una restricción de la actividad de coagulación a una región umbral localizada, así como mejorar la identificación de la distribución de partículas en todo el sistema cardiovascular. Los procedimientos de protección se pueden usar para unir las proteínas poliP y factor de coagulación a la superficie de nanopartículas. Las nanopartículas de sílice sólidas con cargas de poliP y trombina con tiempos de permanencia del sistema definidos pueden facilitar una restricción de su actividad a una región local de actividad de coagulación por encima del umbral.

Se sintetizaron nanopartículas sólidas de óxido de hierro con diámetros de partículas entre 5-500 nm haciendo reaccionar tris(acetilacetato) de hierro(III) (Fe(acac)<sub>3</sub>) en disolventes orgánicos como oleilamina y ácido oleico, ácido benzoico u otro disolvente para producir óxido de hierro hidrófobo. Fe(acac)<sub>3</sub>, ácido oleico y oleilamina fueron suministrados por Sigma Aldrich. 0,2 g de Fe(acac)<sub>3</sub> se añadieron a 2 ml de ácido oleico y 3 ml de oleilamina. La solución se calentó a 60 °C hasta que Fe(acac)<sub>3</sub> se disolvió. La mezcla se hizo reaccionar en un microondas durante 10 minutos a 100 °C y 60 minutos a 180 °C. El producto resultante se lavó en una mezcla de etanol y ciclohexano en una proporción de 9 ml de etanol por 1 ml de ciclohexano. Las partículas de óxido de hierro hidrófobas resultantes funcionalizadas con ácido oleico se suspendieron en ciclohexano.

Las partículas hidrófobas se convirtieron en partículas hidrófilas funcionalizando la superficie con poli(ácido acrílico) (PAAc) en dietilenglicol (DEG) a temperaturas superiores a 100 °C. Se añadieron 0,5 g de PAAc a 8 ml de DEG. La mezcla se calentó a 110 °C hasta que se disolvió el PAAc. La temperatura se elevó a 150 °C y se añadieron 2 ml de partículas de óxido de hierro hidrófobas en ciclohexano. Después de 1 hora, la solución se volvió de un color marrón claro. Después de enfriar la solución a temperatura ambiente, las partículas se centrifugaron y se lavaron con etanol una vez. Las partículas se lavaron con agua desionizada tres veces y se resuspendieron en agua. Las partículas de óxido de hierro funcionalizadas con PAAc eran hidrófilas. Las partículas se probaron usando DLS para medir el tamaño y la carga superficial y en el TEG para determinar la actividad de coagulación.

PoliP también se puede limitar a nanopartículas usando PAAc como intermedio. La unión de PAAc a una partícula como óxido de hierro puede hacer que la partícula sea más estable en agua y, por lo tanto, más susceptible a la protección de poliP. Las partículas de óxido de hierro pueden sintetizarse en soluciones acuosas usando cloruro de hierro (III) y cloruro de hierro (II) como precursor.

FIG. 107 muestra una imagen TEM de nanopartículas de óxido de hierro sintetizadas con oleilamina como se describió anteriormente. FIG. 108 muestra un gráfico del potencial zeta frente a las cuentas totales de nanopartículas de óxido de hierro desnudo y nanopartículas de óxido de hierro cubiertas con poliP usando un enlace de éster. Las nanopartículas de óxido de hierro cubiertas con poliP usando un enlace de éster tenían un potencial zeta más negativo en comparación con las nanopartículas de óxido de hierro desnudas. FIG. 109 muestra un gráfico de tiempos de coagulación que compara nanopartículas de óxido de hierro desnudo con nanopartículas de óxido de hierro con recubrimiento de poliP a diferentes concentraciones. Las nanopartículas de óxido de hierro con recubrimiento de poliP tuvieron tiempos de coagulación significativamente más bajos en comparación con las nanopartículas de óxido de hierro desnudas. FIG. 110 muestra un gráfico del potencial zeta frente a las cuentas totales de nanopartículas de óxido de hierro funcionalizadas con PAAc. FIG. 111 muestra un gráfico de tiempos de coagulación que compara las nanopartículas de óxido de hierro tapadas con PAA y plasma recalcificado (sin agente).

**Ejemplo 10**

**Estudios de degradación**

- El desarrollo de un agente estable durante largos periodos de tiempo a temperatura ambiente es un atributo para los agentes de coagulación que pueden facilitar el almacenamiento del agente de coagulación durante un periodo prolongado de tiempo. Proteínas, plasma y otros tratamientos pueden requerir refrigeración para evitar la degradación. PoliP por sí solo se almacena generalmente a -20 °C para minimizar la degradación. Las nanopartículas de poliP se probaron usando TEG para determinar la posible degradación de la actividad de coagulación en condiciones ambientales. Después del almacenamiento en el banco durante 1 semana, la partícula seguía siendo un procoagulante fuerte. Después de 9 meses, la misma partícula retuvo su naturaleza procoagulante. Como tal, el agente hemostático era susceptible de almacenamiento a temperatura ambiente. La partícula puede liofilizarse para preservar aún más la actividad de la partícula. El producto se puede entregar a través de mecanismos como una esponja estéril, gasa, vendaje, hisopo, pulverización, aerosol, gel, cemento, vendaje de compresión, almohada (por ejemplo, para facilitar la aplicación a una herida en la cabeza), manga (por ejemplo, para cubrir una herida en una extremidad) y similares, como se describe en el presente documento.
- 5
- 10

REIVINDICACIONES

1. Una composición hemostática para usar en un método para promover la coagulación sanguínea en un sujeto, en donde dicha composición hemostática se administra al sujeto durante un período de tiempo suficiente para al menos iniciar la coagulación sanguínea, en donde la composición hemostática comprende:
- una cantidad hemostáticamente eficaz de agente hemostático que comprende:
- una nanopartícula; y  
un polímero de polifosfato unido a la nanopartícula.
2. La composición hemostática para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde
- (i) la administración comprende la administración intravenosa de la composición hemostática al sujeto;  
(ii) la composición hemostática inicia la coagulación sanguínea a través de la ruta de coagulación del FXa en el sujeto; o  
(iii) el sujeto tiene una afección coagulopática y el método es eficaz para tratar la afección coagulopática en el sujeto, opcionalmente en donde una concentración de un factor procoagulante en el sujeto es insuficiente para tener un efecto hemostático.
3. La composición hemostática para el uso de acuerdo con la reivindicación 2(iii), en donde la afección coagulopática comprende la dilución de un factor procoagulante, hipotermia o acidosis.
4. La composición hemostática para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método comprende además la administración de un agente biológicamente activo al sujeto junto con la composición hemostática.
5. La composición hemostática para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el agente biológicamente activo comprende un segundo agente hemostático, un agente antiinflamatorio o un agente antibiótico.
6. La composición hemostática para el uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el segundo agente hemostático comprende Factor VIIa o tromboxano A2.
7. La composición hemostática para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:
- (i) el polímero de polifosfato está unido a la nanopartícula mediante un grupo de enlace;  
(ii) la composición hemostática comprende un grupo protector, opcionalmente en donde el grupo protector está unido al agente hemostático mediante un grupo de enlace escindible, opcionalmente además en donde el método comprende además escindir el grupo de enlace escindible para liberar el agente hemostático del grupo protector en un lugar de acción diana en el sujeto;  
(iii) la composición hemostática comprende un agente de unión específico que se une específicamente a un lugar de acción diana en el sujeto; o  
(iv) el método comprende además el seguimiento de la composición hemostática en el sujeto, opcionalmente en donde el método comprende además la obtención de imágenes de la composición hemostática en el sujeto.
8. Un método para fabricar una composición hemostática, comprendiendo el método unir covalentemente un polímero de polifosfato a la superficie de una nanopartícula.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde:
- (i) el polímero de polifosfato está unido covalentemente a la nanopartícula;  
(ii) la nanopartícula comprende una nanopartícula de sílice, opcionalmente en donde la nanopartícula de sílice comprende esferas de sílice o una espuma mesocelular;  
(iii) la nanopartícula comprende un material seleccionado del grupo consistente en óxido de hierro, tierra de diatomeas, un aluminosilicato, un óxido de un metal de transición y dióxido de titanio;  
(iv) el polímero de polifosfato comprende 20 o más monómeros de fosfato;  
(v) el polímero de polifosfato comprende de 100 a 1500 monómeros de fosfato;  
(vi) el agente hemostático tiene una proporción de masa del polímero de polifosfato con respecto a las nanopartícula de 1:1 o mayor;  
(vii) el método comprende además la unión de un polipéptido a la nanopartícula, opcionalmente en donde el polipéptido comprende una enzima, opcionalmente además en donde la enzima comprende trombina; o  
(viii) el método comprende además unir un polímero a la nanopartícula, opcionalmente en donde el polímero se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP) poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), polipropilenglicol, poli(carboxibetaína), poli(sulfobetaína), poli(metacrilato de carboxibetaína) (PCBMA), poloxámeros, ácido polilactónico, ácido hialurónico, celulosa, poliuretano, poli(acetato de etilenvinilo), silicona, ácido poliacrílico, polietileno, polipropileno, poliámida, poli(éster uretano), poli(éster uretano), poli(éster urea), poliéter, polivinilo, parileno, poli(hidroxibutilato), poli(carbonato de alquilo), poli(ortoéster), poliéster,

poli(ácido hidroxivalérico), polidioxanona, poli(tereftalato de etileno), poli(ácido málico), poli(ácido tartrónico), polianhídrido y polifosfoazeno, y copolímeros de los mismos.

5 10. El método de acuerdo con la reivindicación 9(viii), en donde el polímero comprende PEG, en donde opcionalmente el PEG tiene una masa molecular promedio de 1000 Da o mayor.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el método comprende además tratar térmicamente la nanopartícula.

10 12. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el método comprende además centrifugar la composición hemostática.

15 13. Una composición hemostática que comprende una cantidad hemostáticamente eficaz de un agente hemostático que comprende:

(i) una nanopartícula que consiste en un núcleo de plata y una cubierta de sílice; y un polímero de polifosfato unido a la nanopartícula; o

(ii) una nanopartícula que comprende poliestireno; y un polímero de polifosfato unido a la nanopartícula.

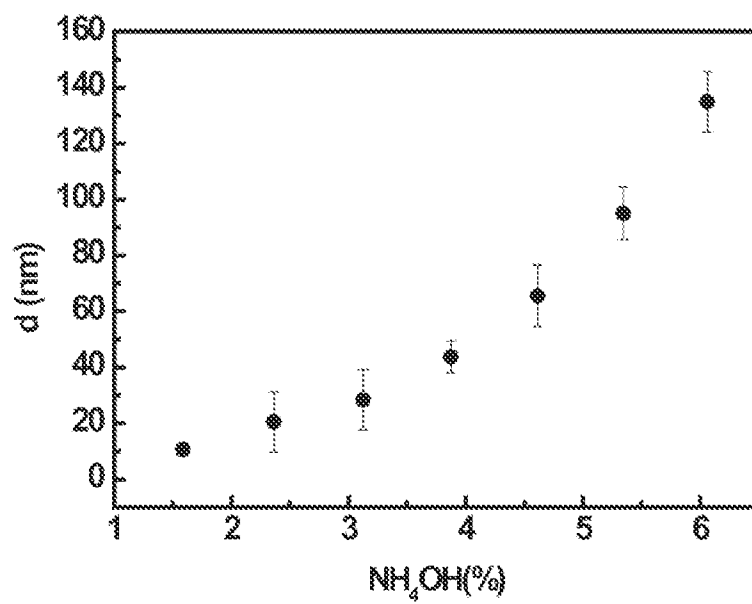


FIG. 1

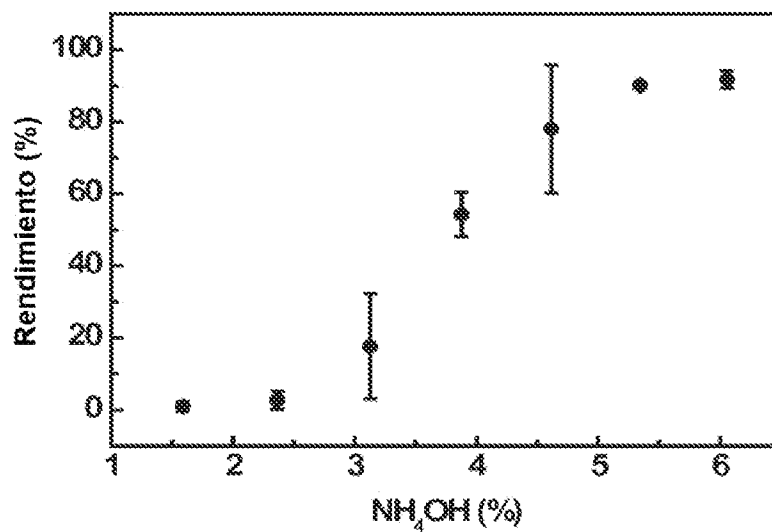


FIG. 2

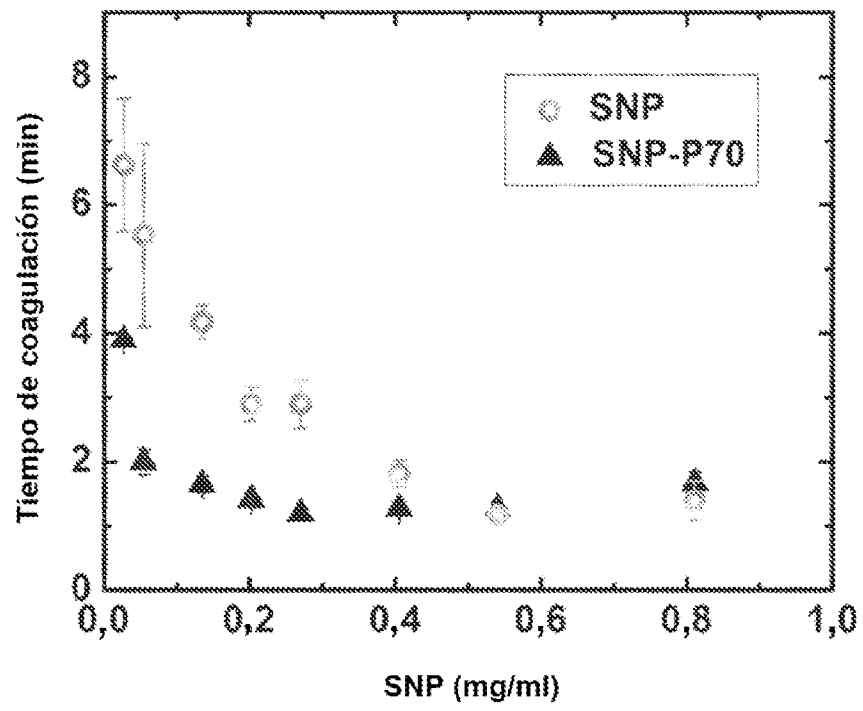


FIG. 3

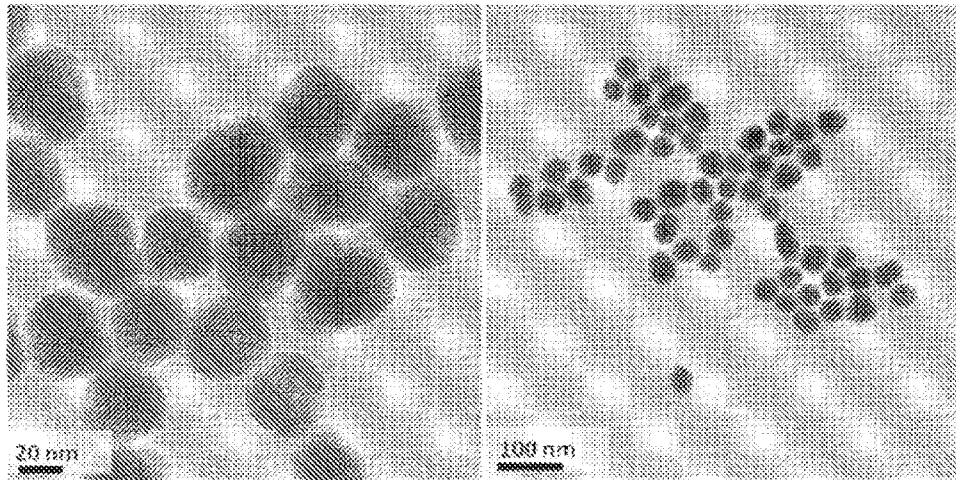


FIG. 4

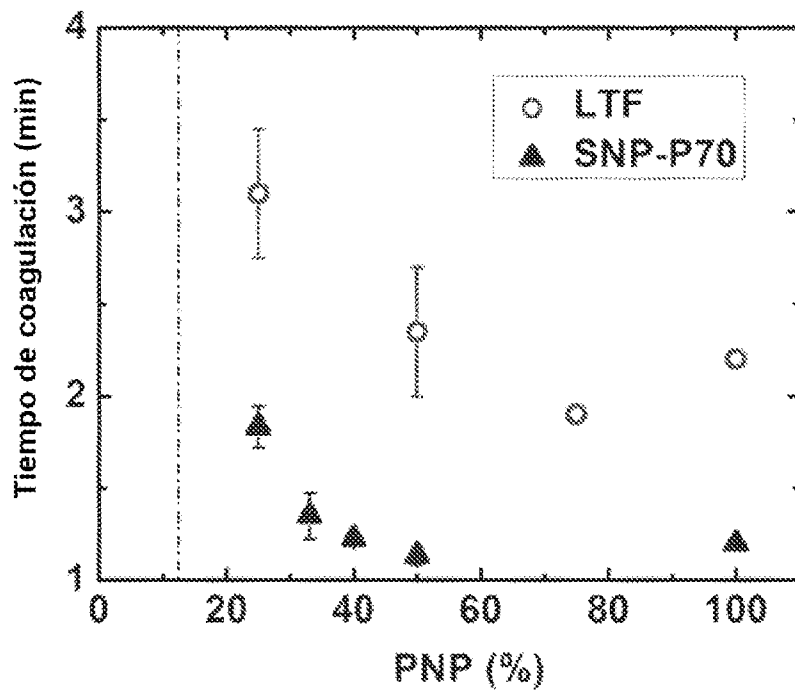


FIG. 5

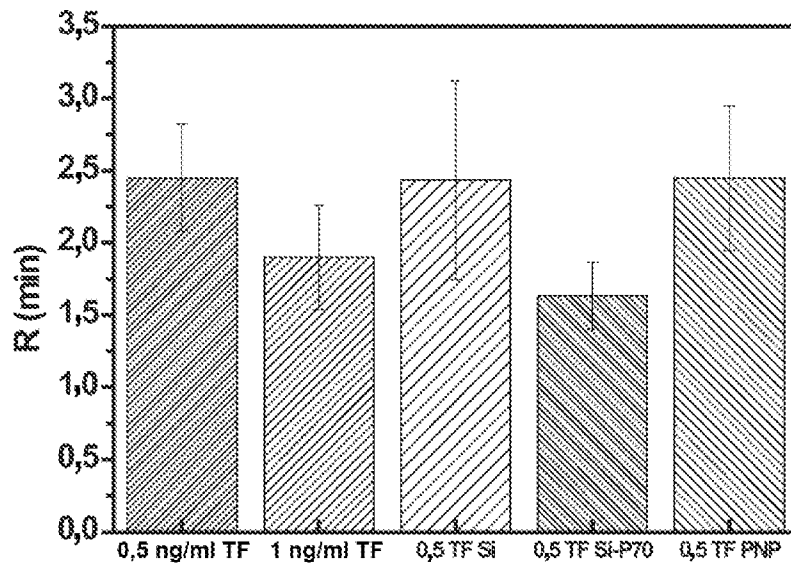


FIG. 6

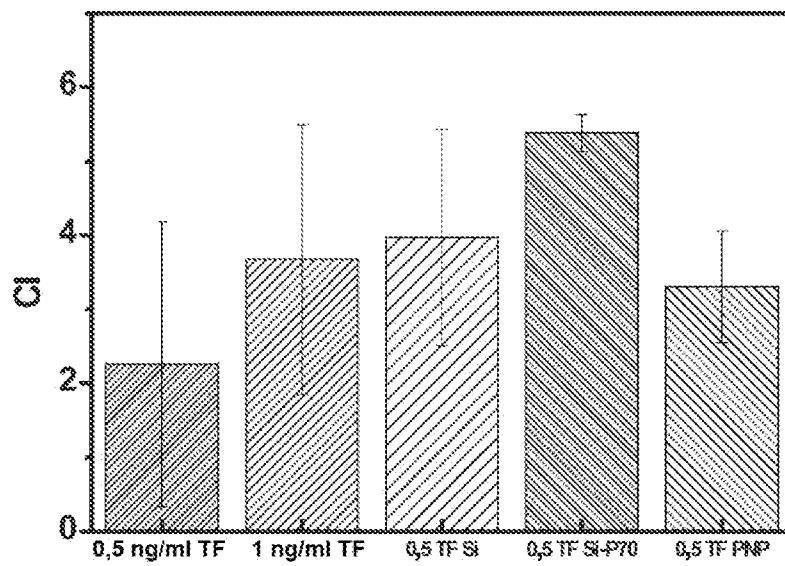


FIG. 7

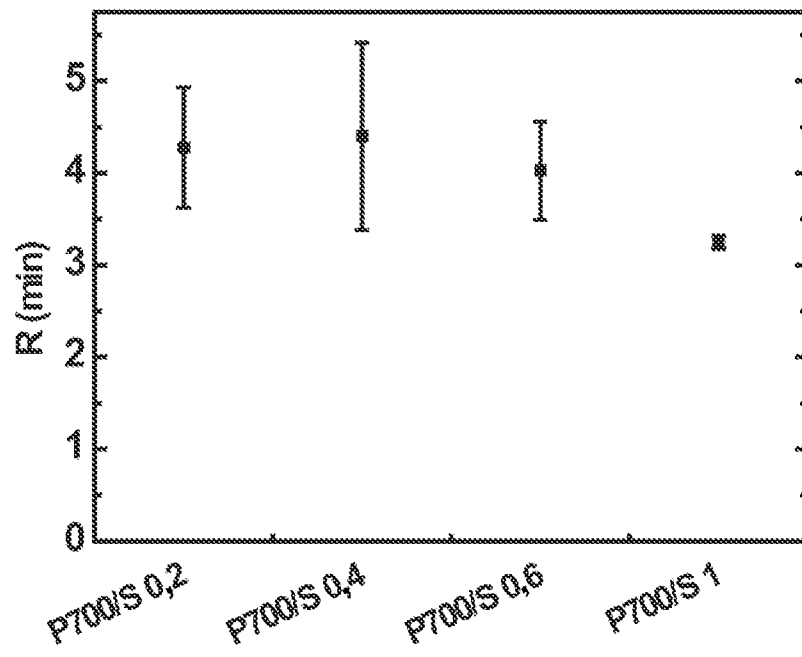


FIG. 8

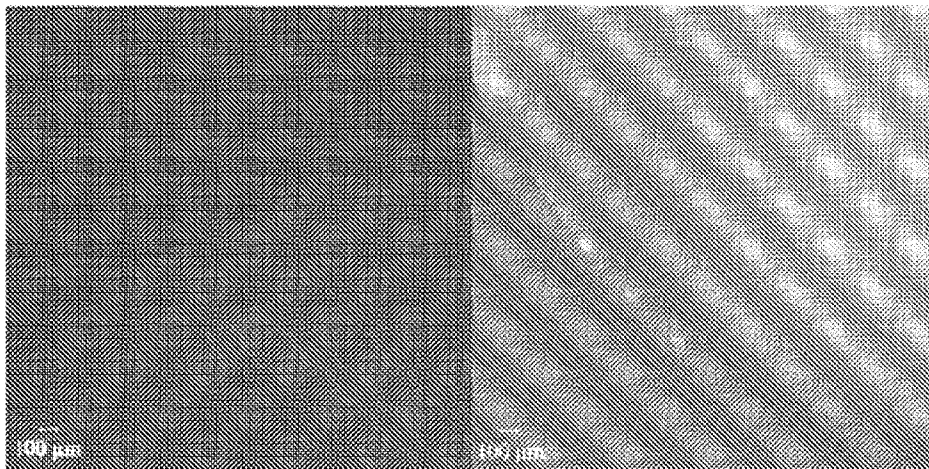


FIG. 9

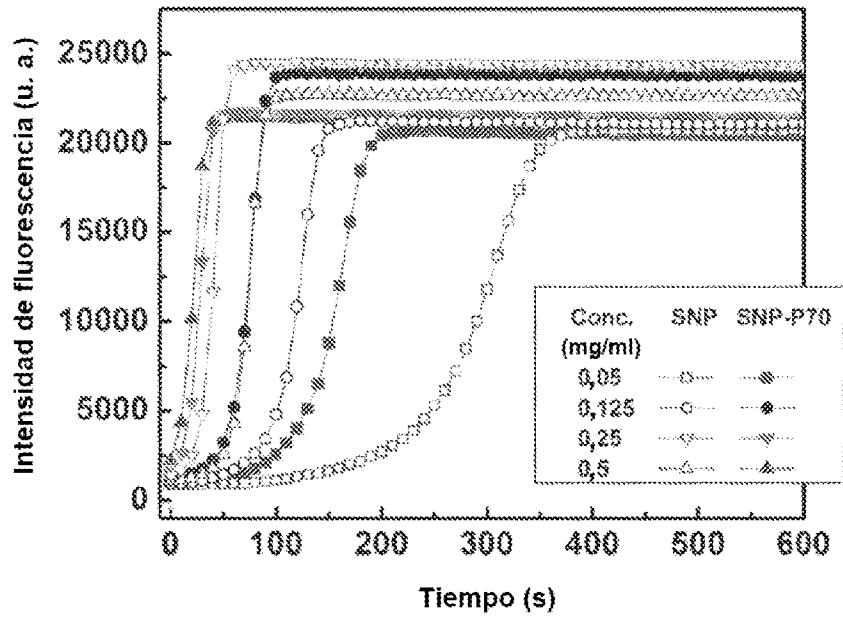


FIG. 10(a)

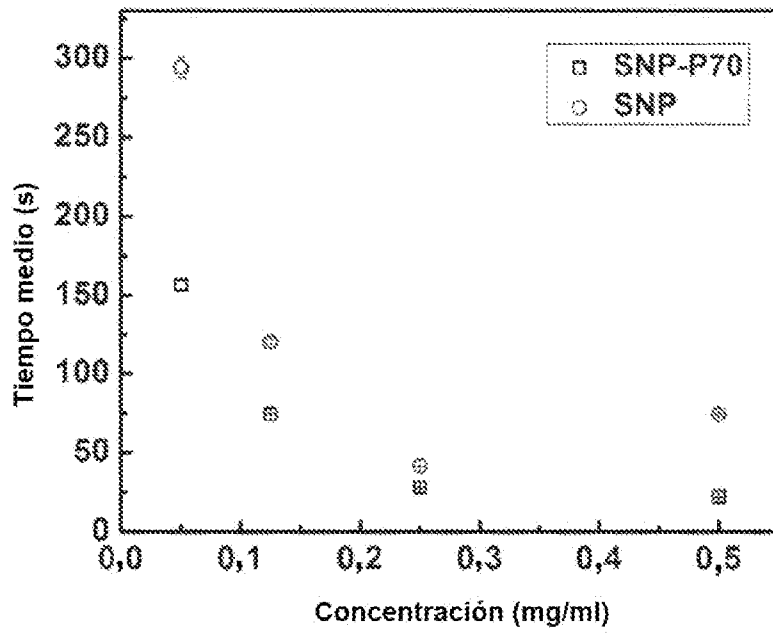


FIG. 10(b)

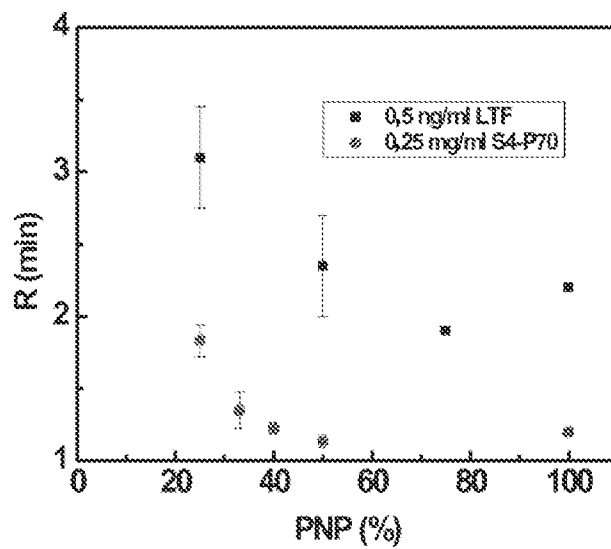


FIG. 11(a)

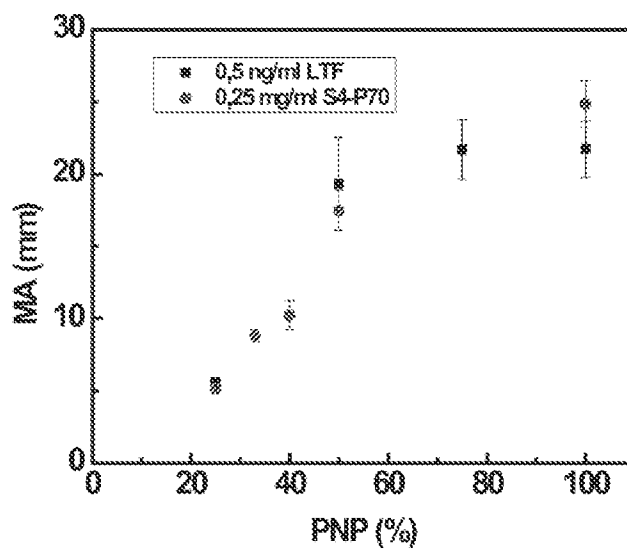


FIG. 11(b)

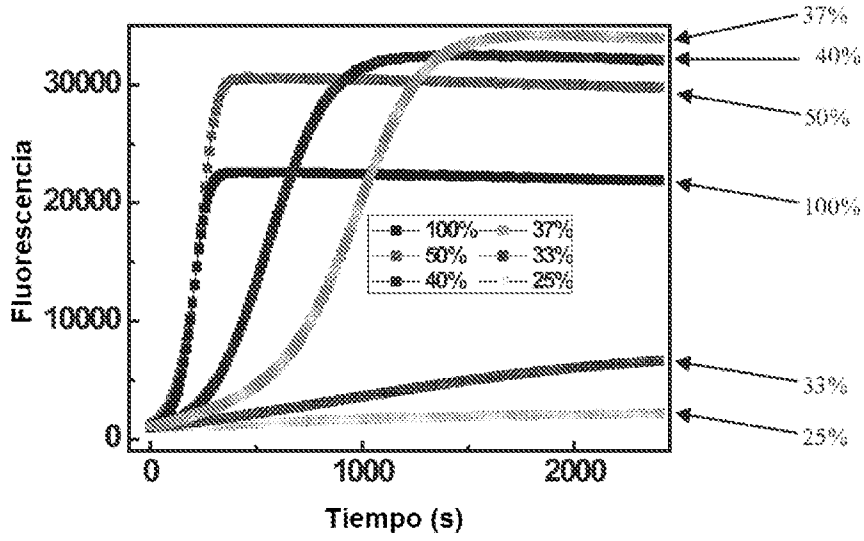


FIG. 12(a)

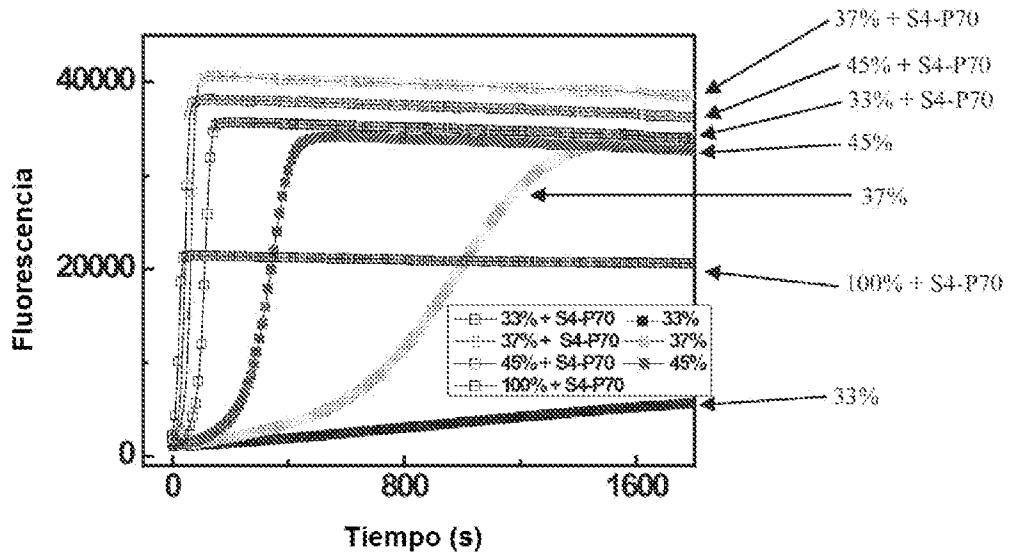


FIG. 12(b)

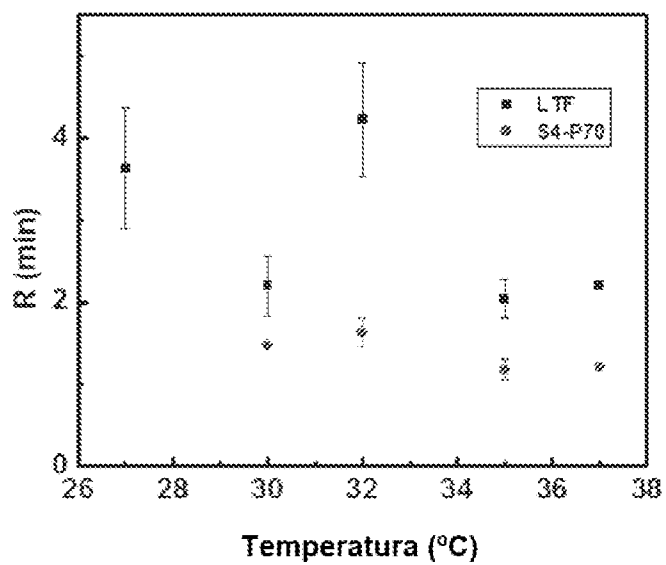


FIG. 13(a)

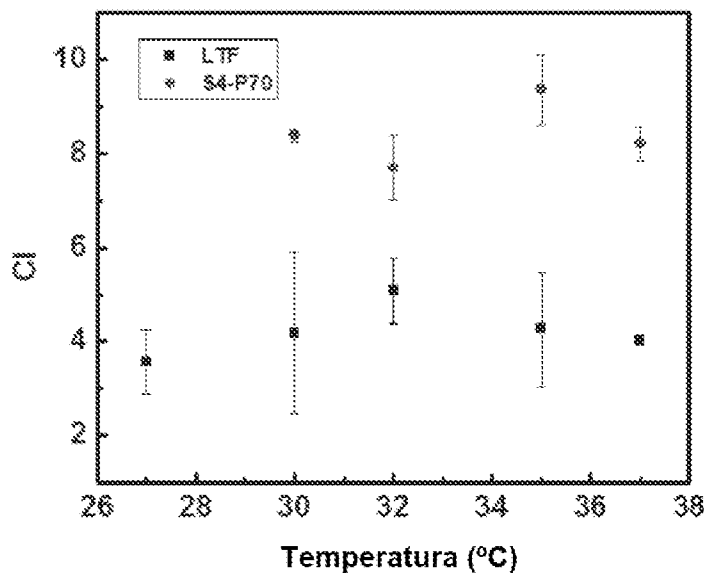


FIG. 13(b)

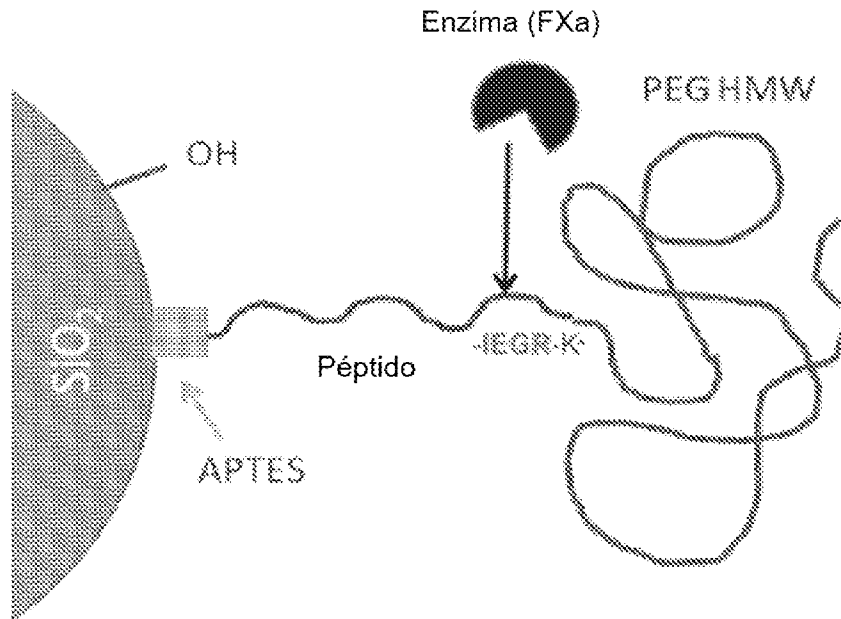


FIG. 14

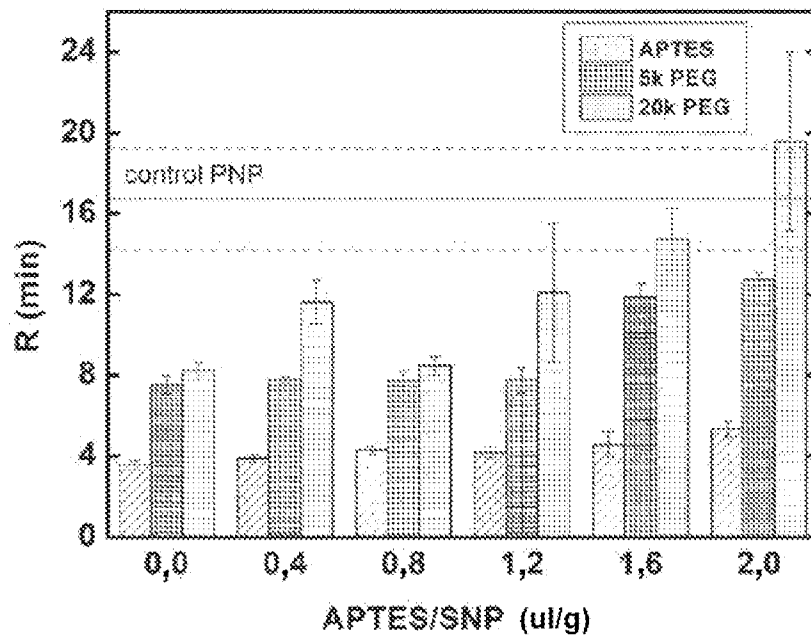


FIG. 15

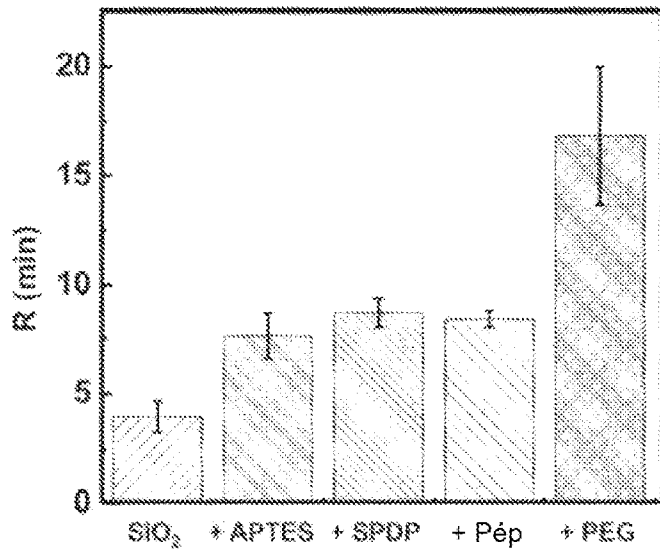


FIG. 16

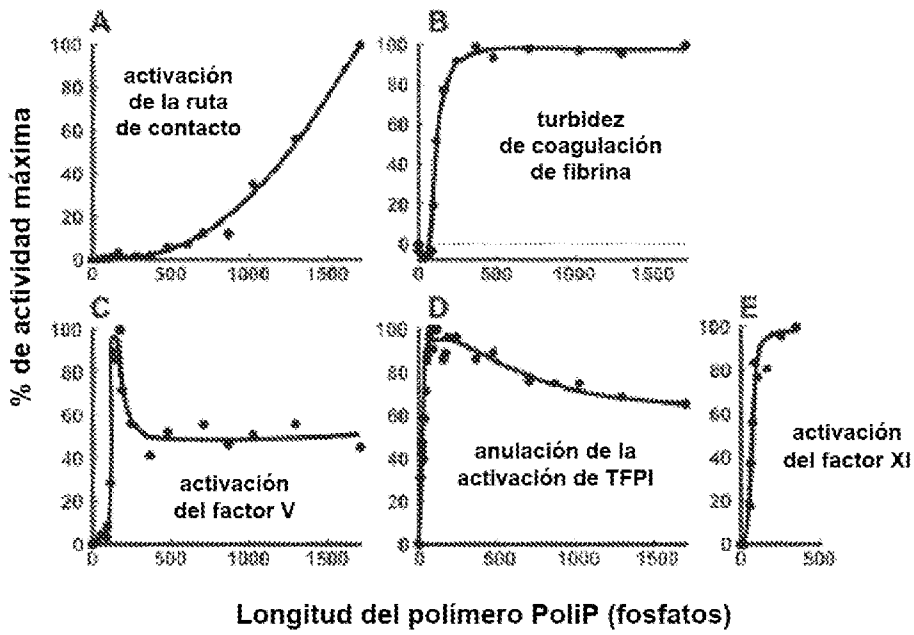


FIG. 17

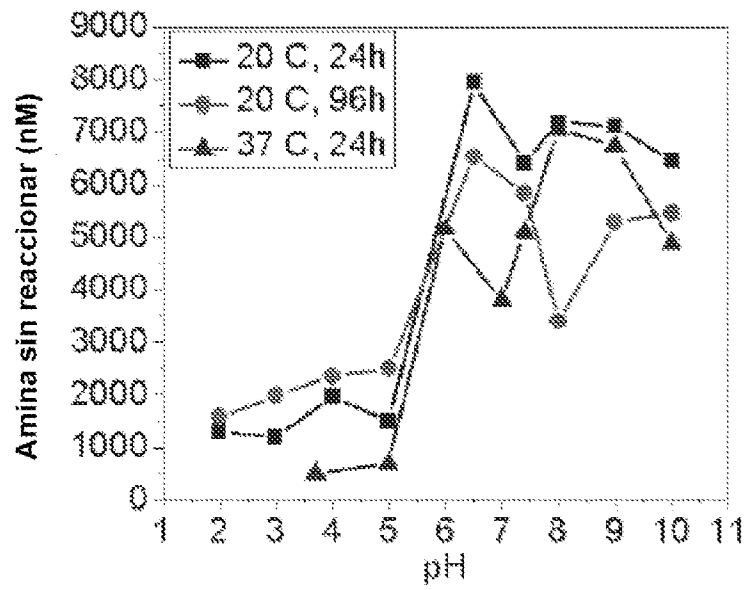


FIG. 18

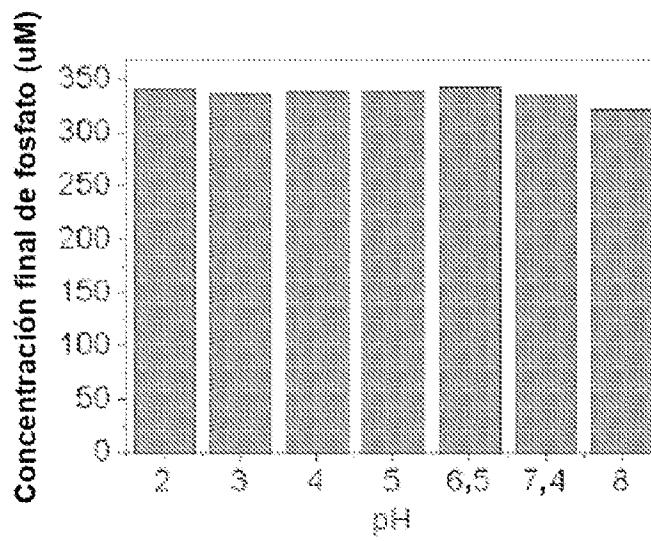


FIG. 19

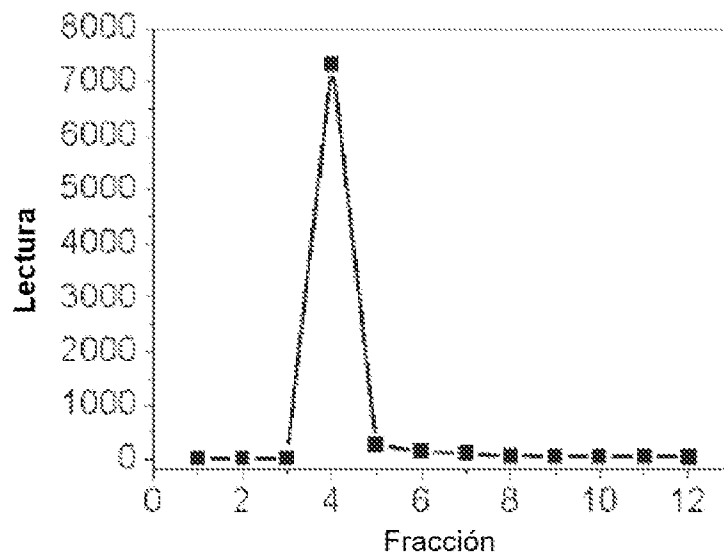


FIG. 20

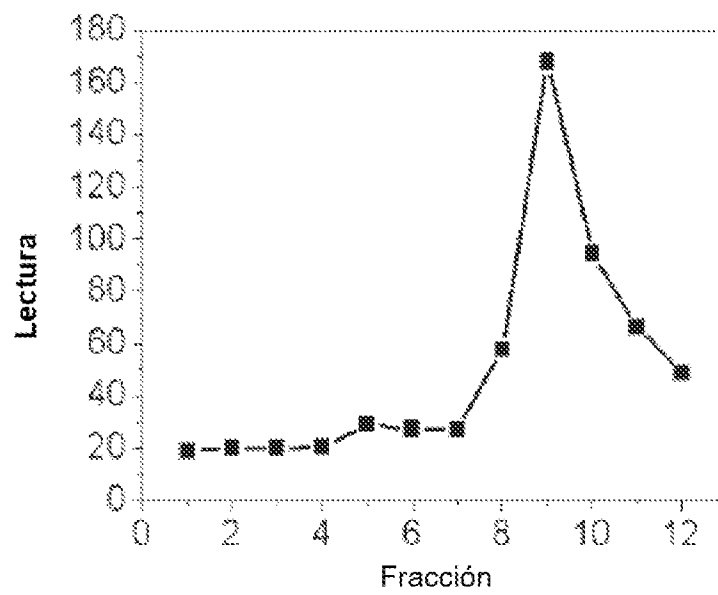


FIG. 21

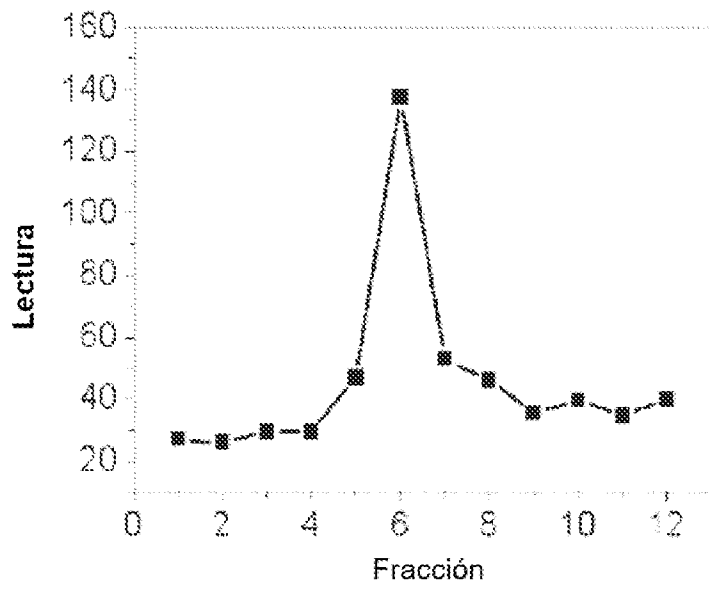


FIG. 22

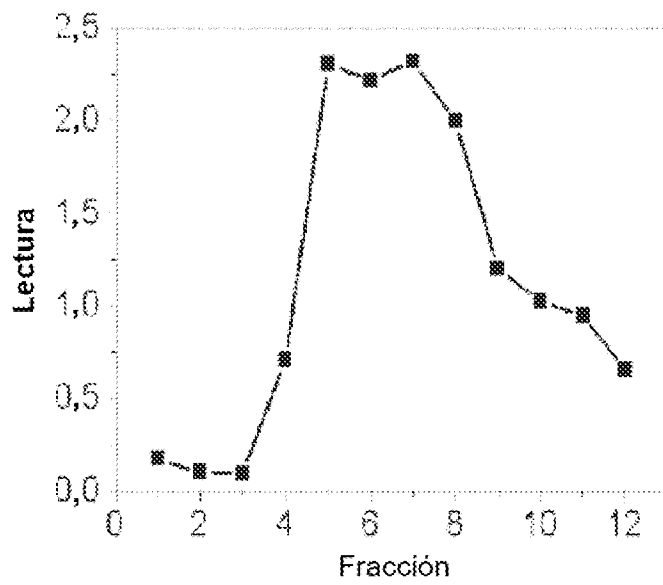


FIG. 23

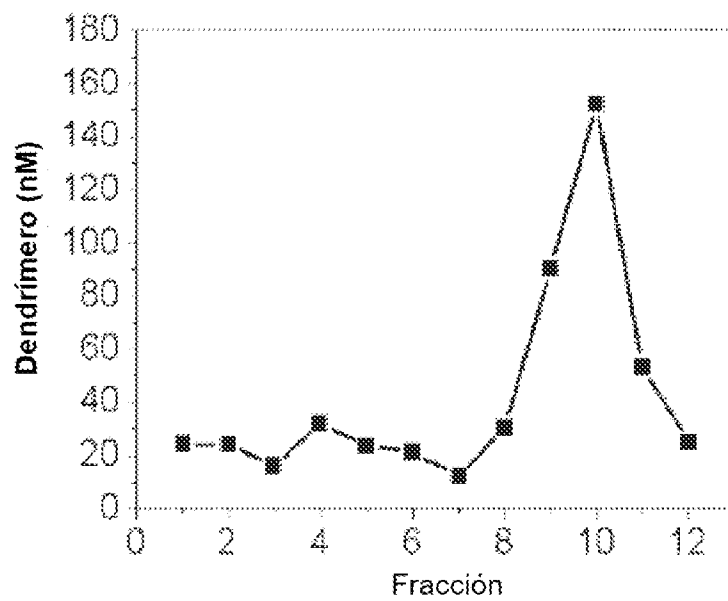


FIG. 24

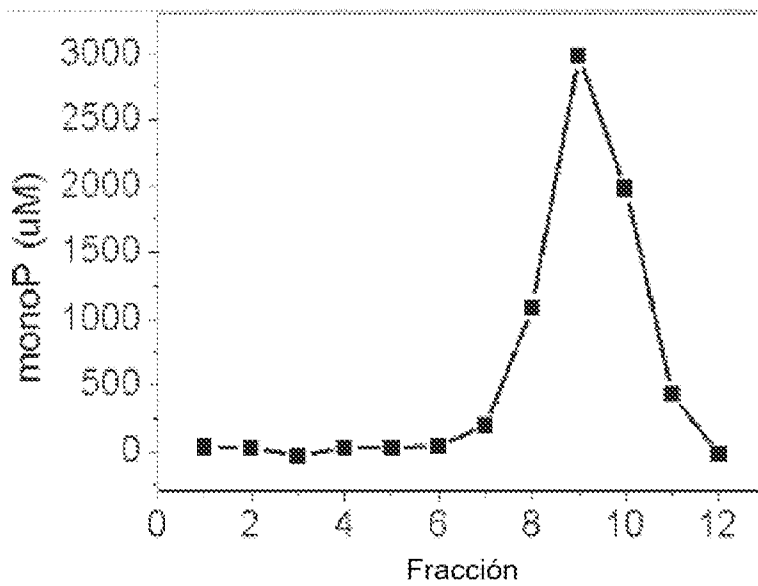


FIG. 25

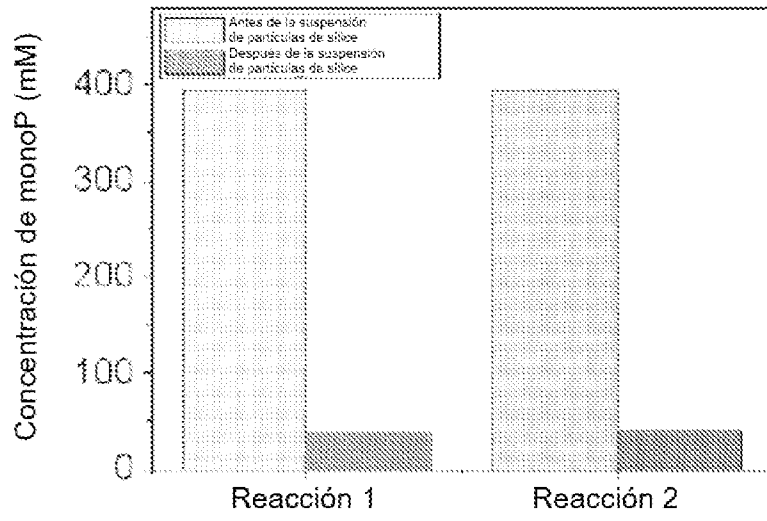


FIG. 26

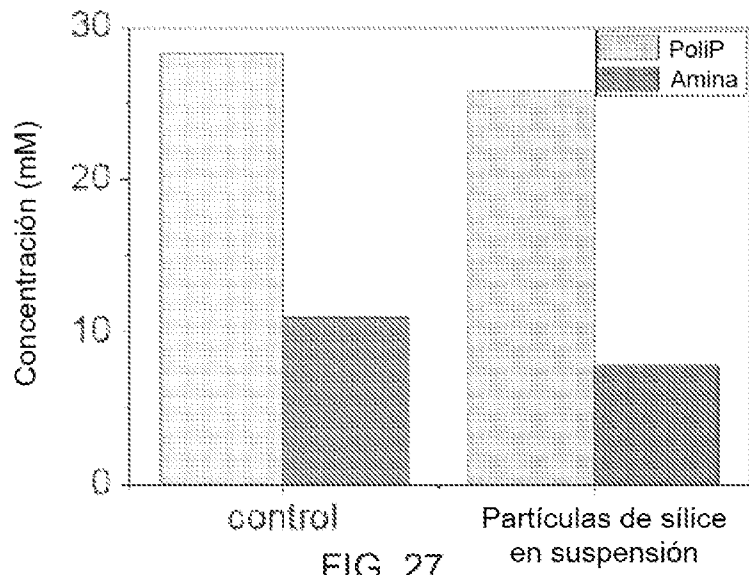


FIG. 27

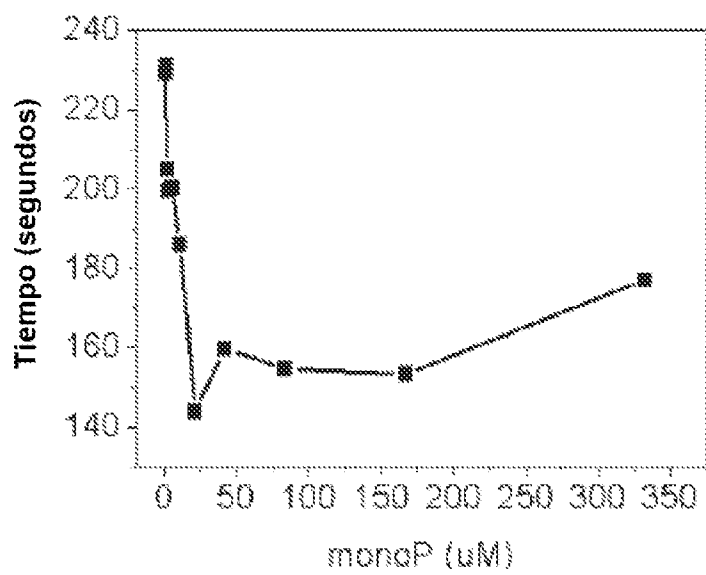


FIG. 28

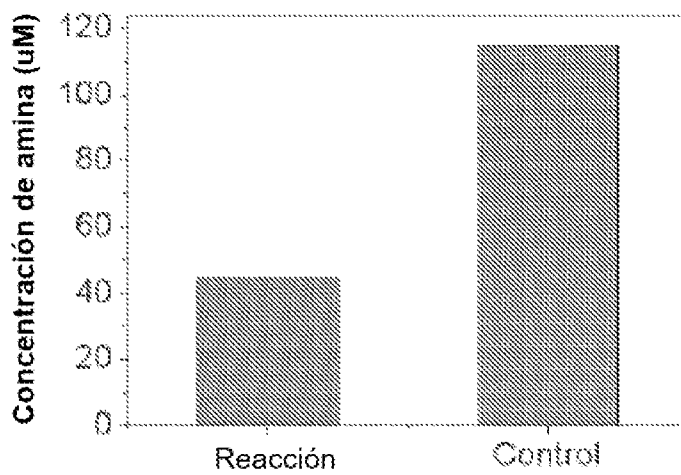


FIG. 29

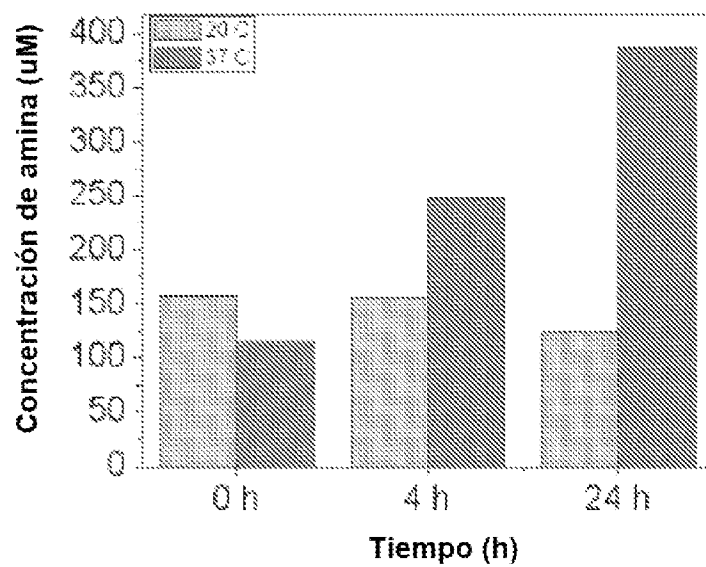


FIG. 30

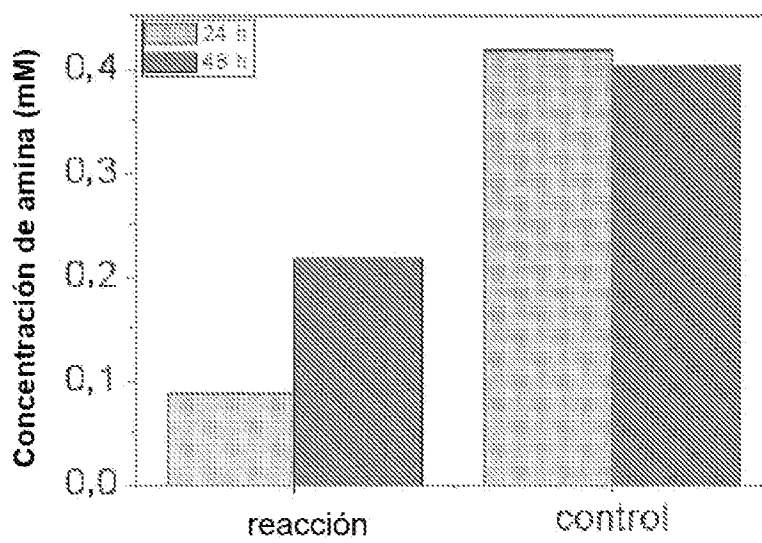


FIG. 31

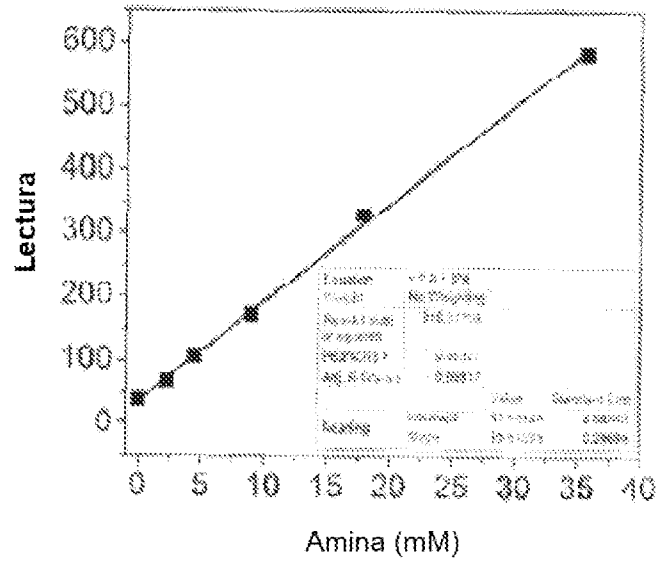


FIG. 32

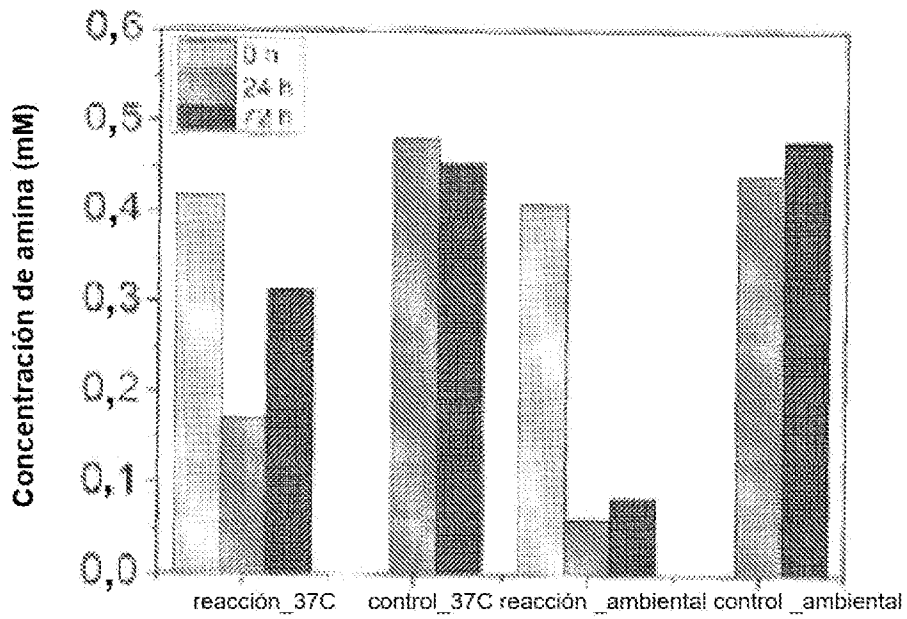


FIG. 33

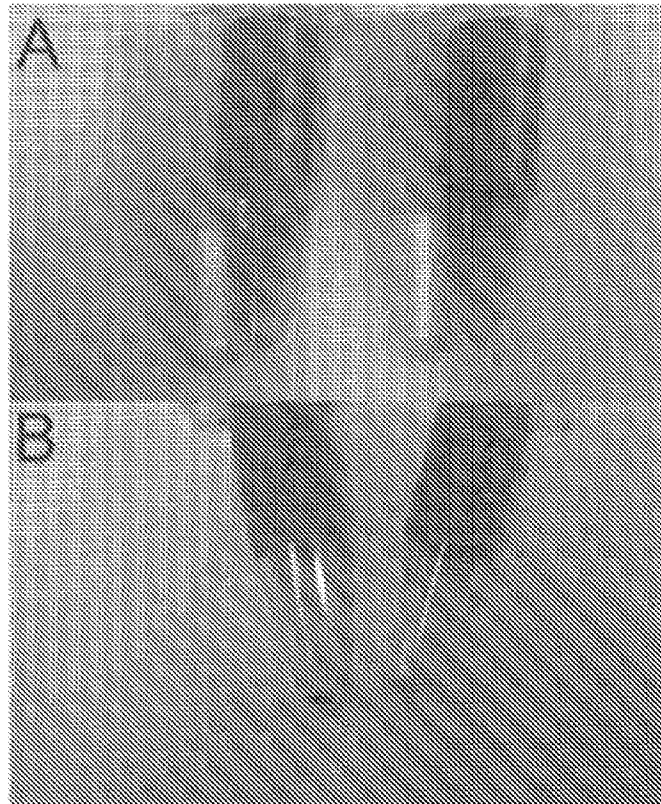


FIG. 34

**Metodología de PLGA**

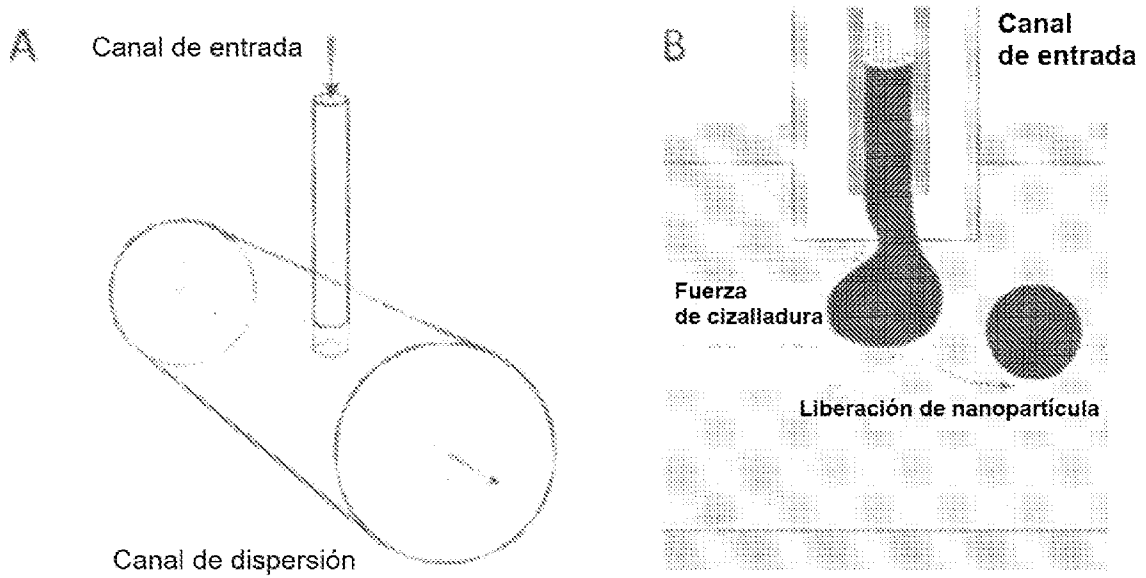


FIG. 35

**FMS NPs**

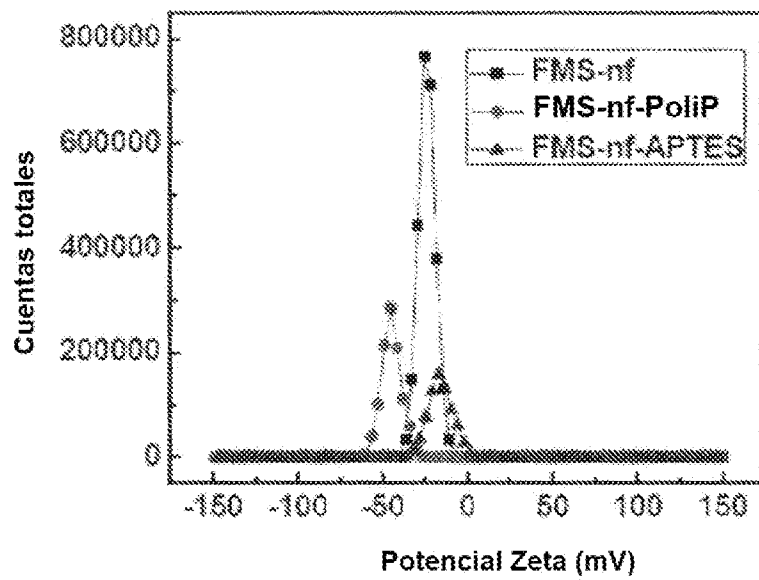


FIG. 36

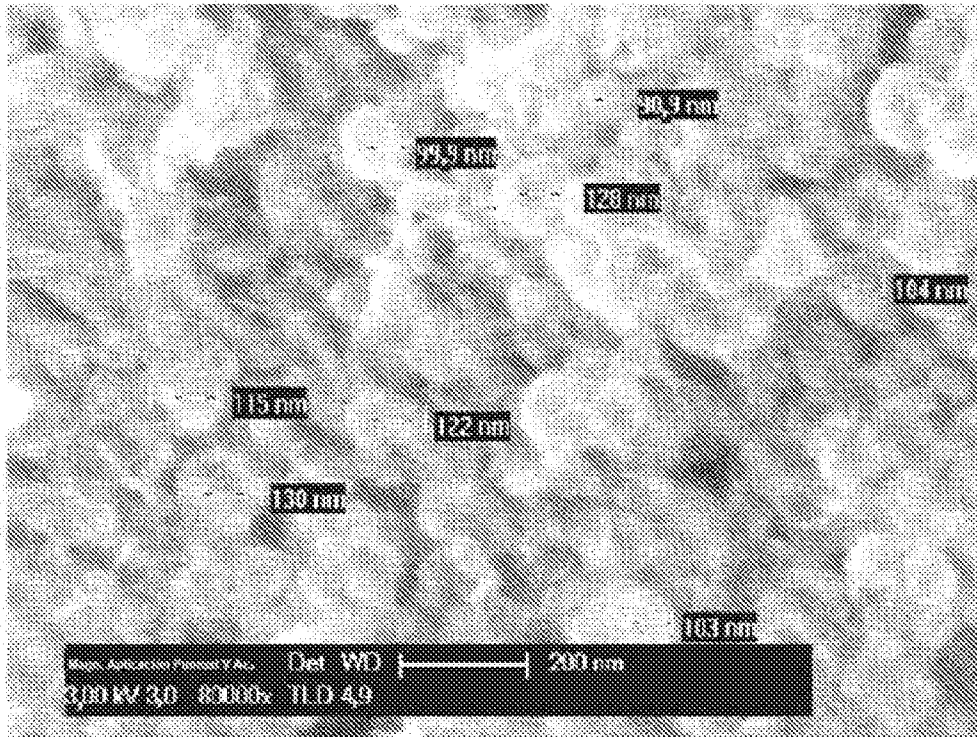


FIG. 37

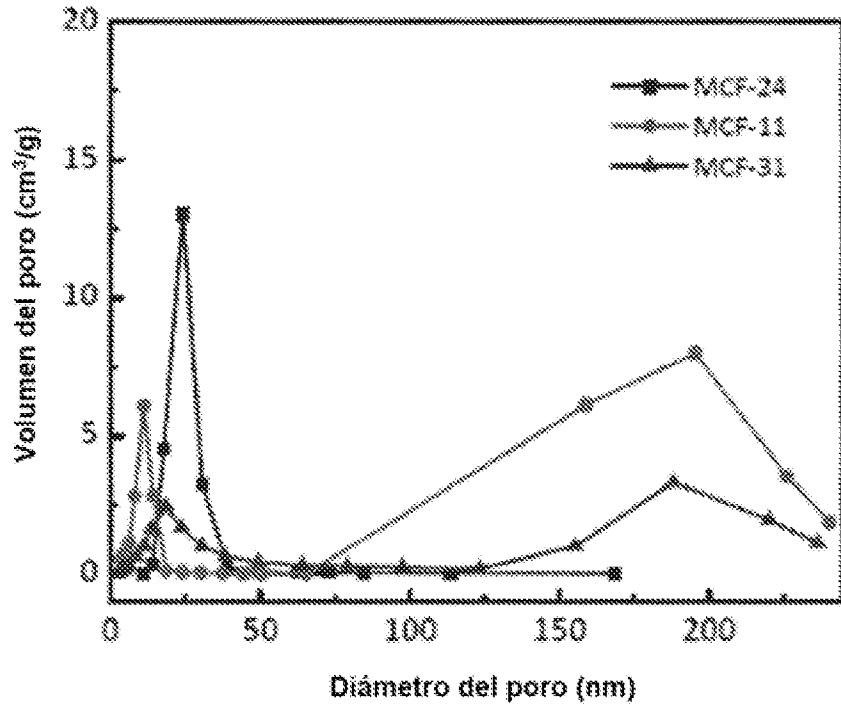


FIG. 38

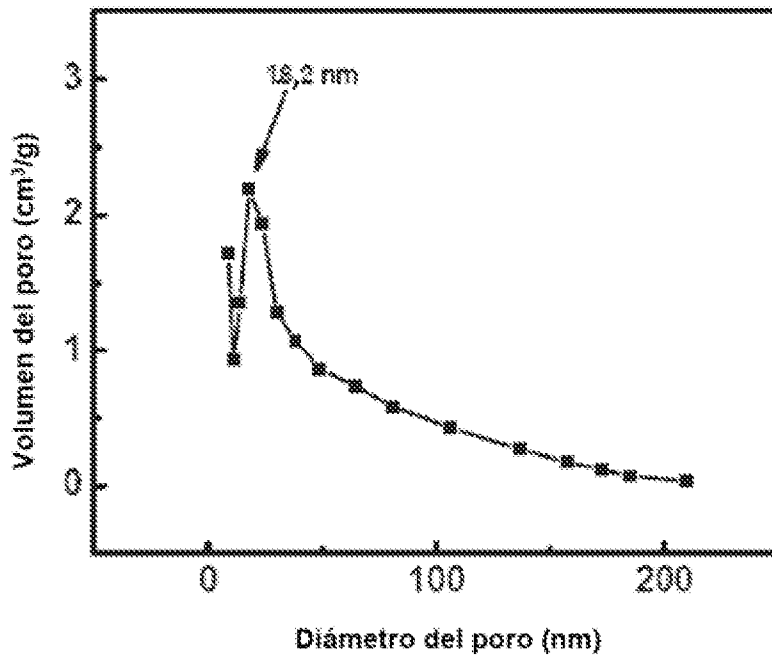


FIG. 39

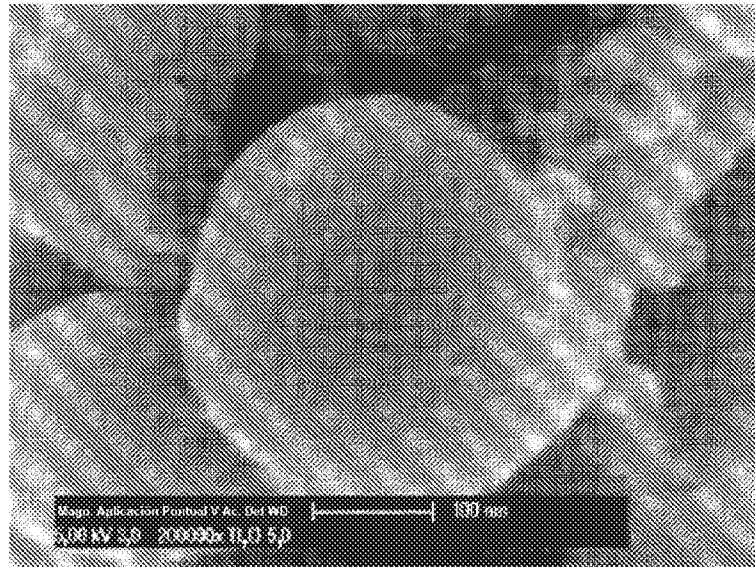


FIG. 40

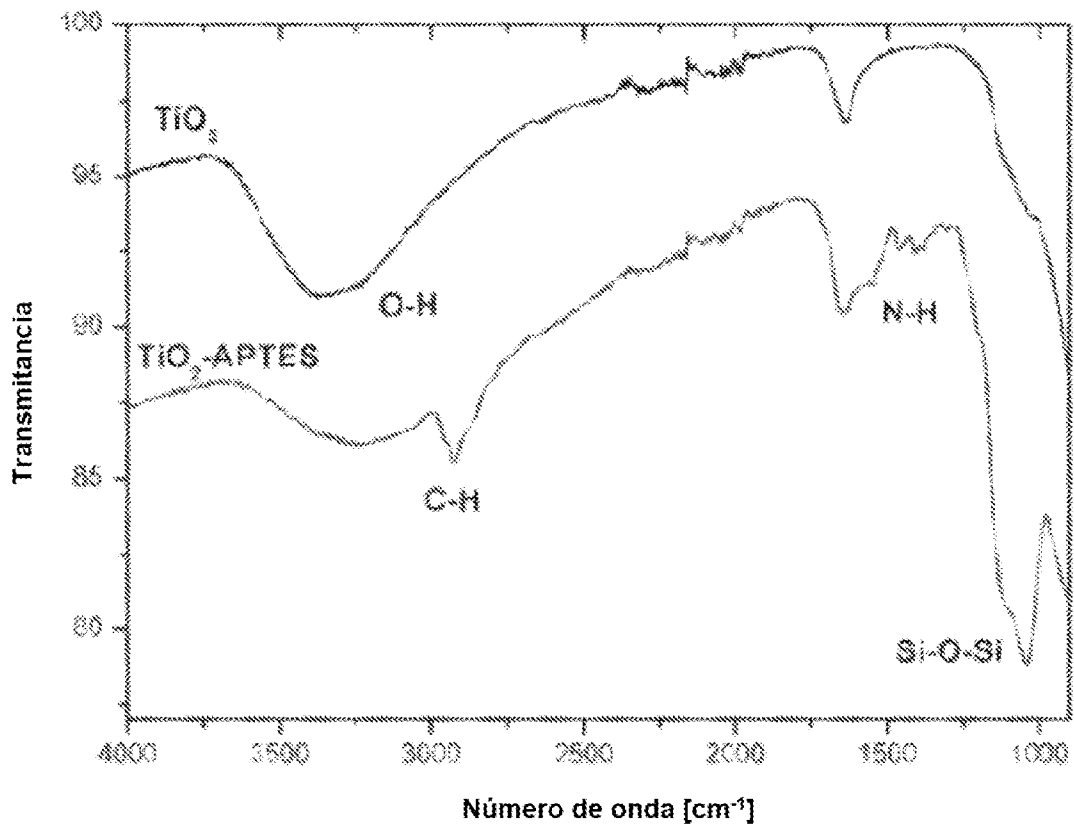


FIG. 41

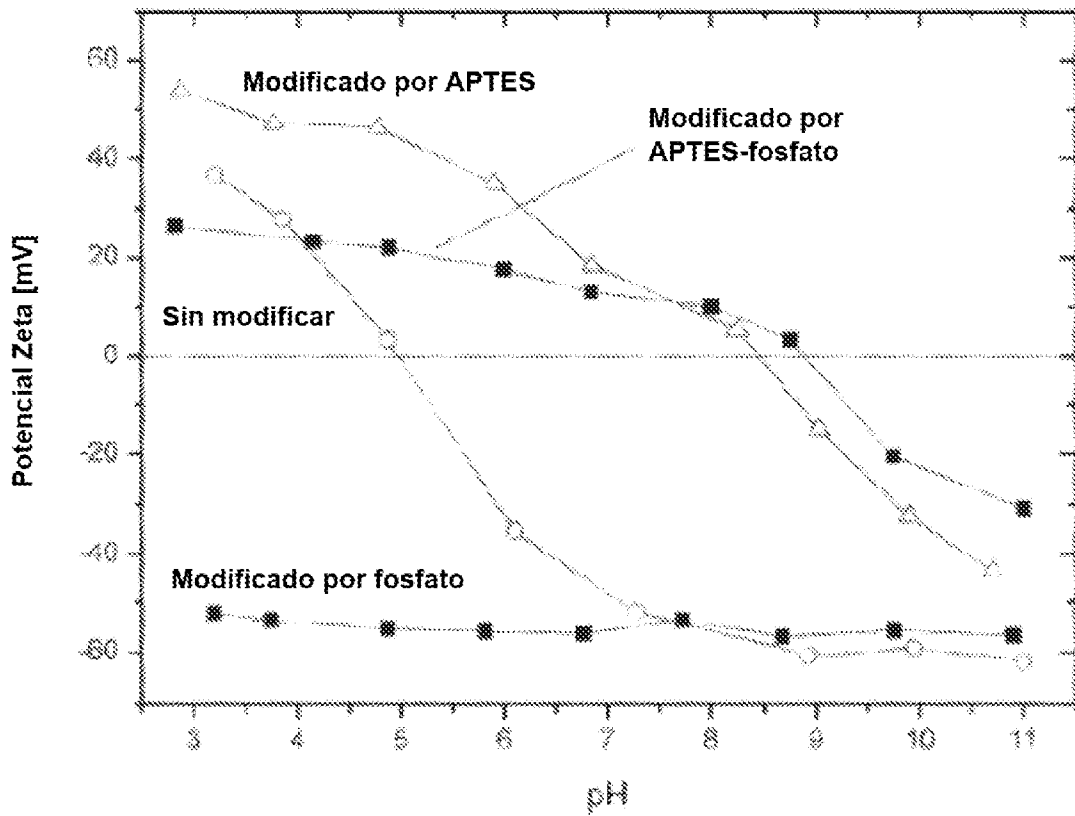


FIG. 42

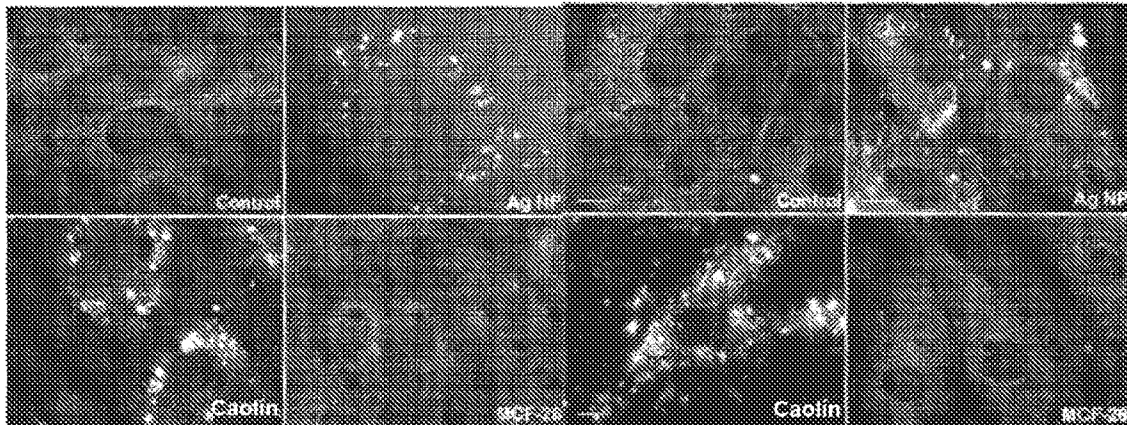


FIG. 43

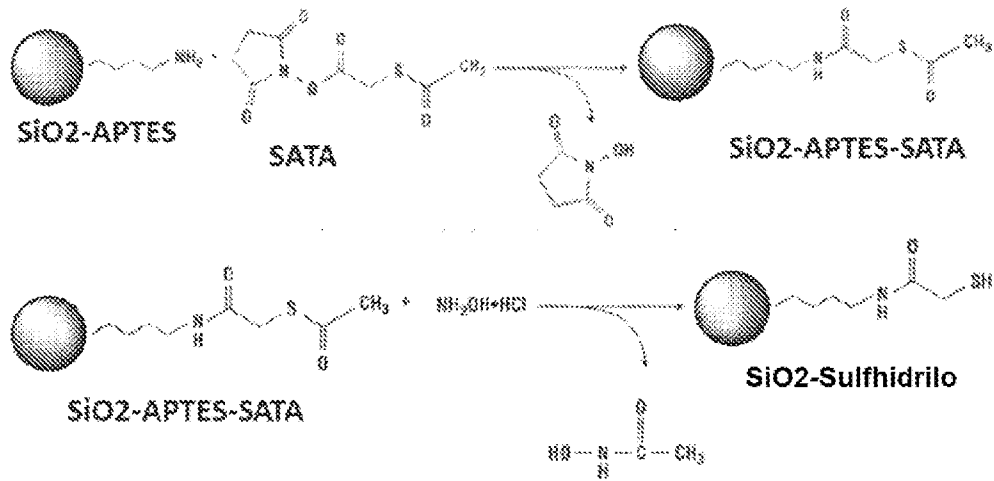


FIG. 44

A) SiO<sub>2</sub> → SiO<sub>2</sub>-amina; usando aminopropil silano  
 SiO<sub>2</sub>-amina → SiO<sub>2</sub>-tioacetilo; usando SATP

B) Desprotección:  
 SiO<sub>2</sub>-tioacetilo → SiO<sub>2</sub>-SH; usando NH<sub>2</sub>OH

C) Ensayo:  
 SiO<sub>2</sub>-SH + DTNB → producto de color amarillo

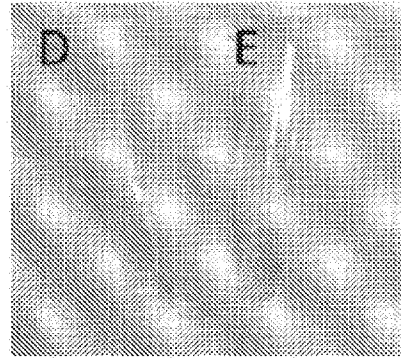


FIG. 45

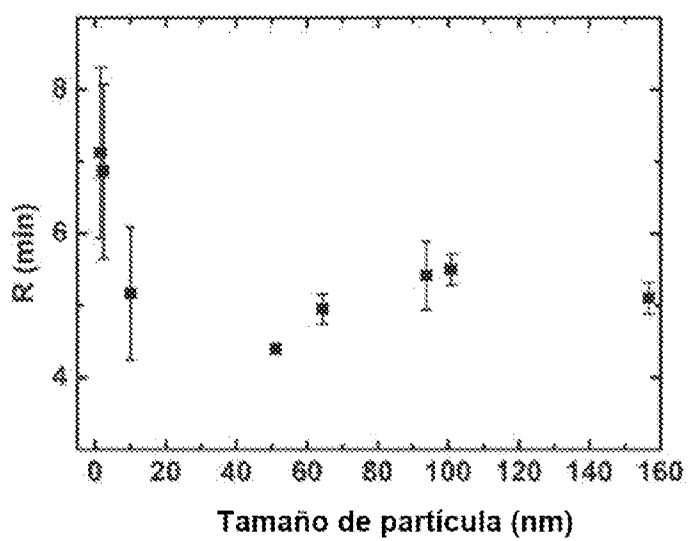


FIG. 46

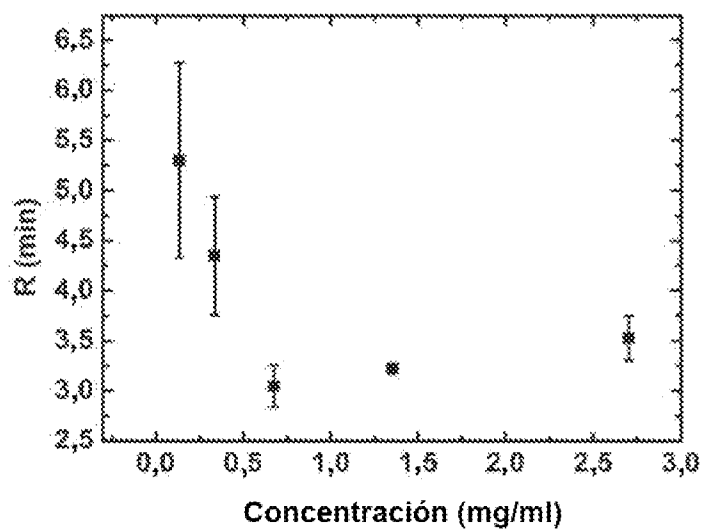


FIG. 47

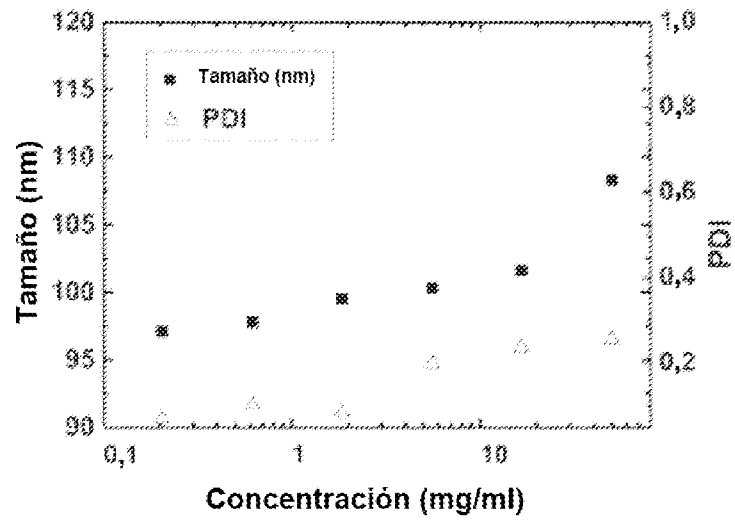


FIG. 48

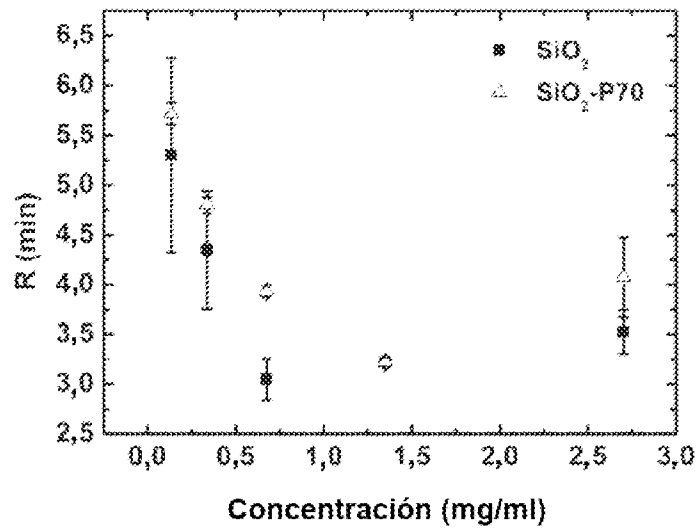


FIG. 49

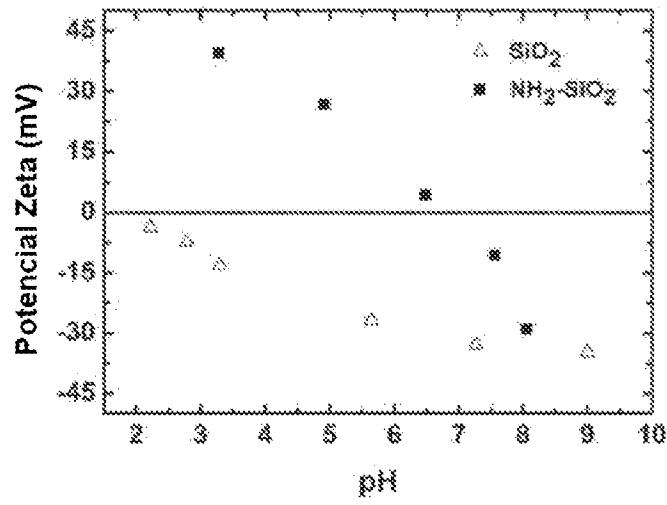


FIG. 50

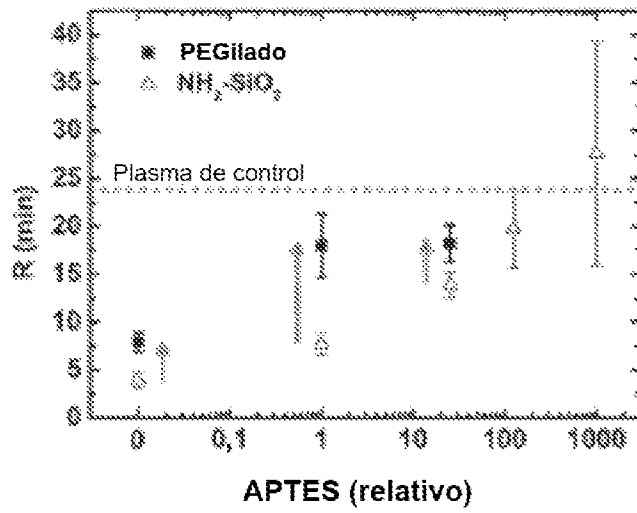


FIG. 51

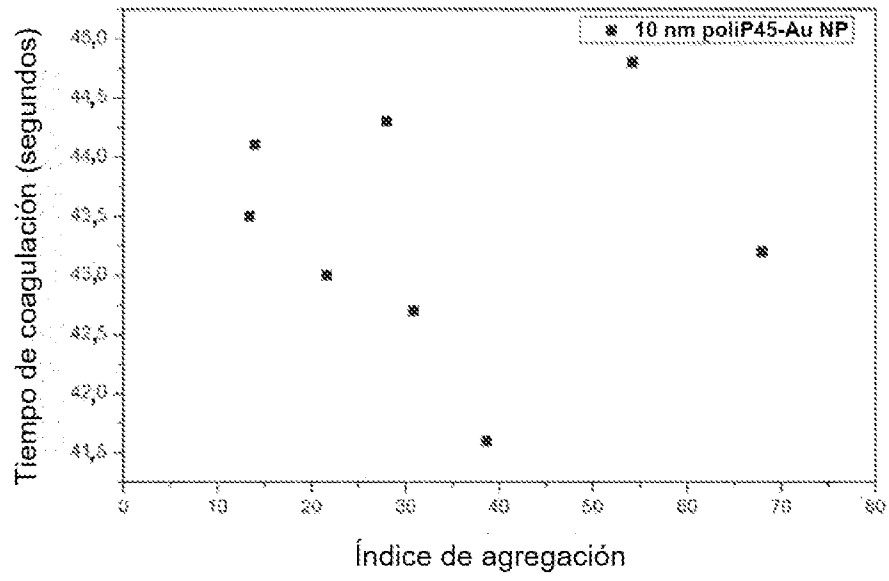


FIG. 52

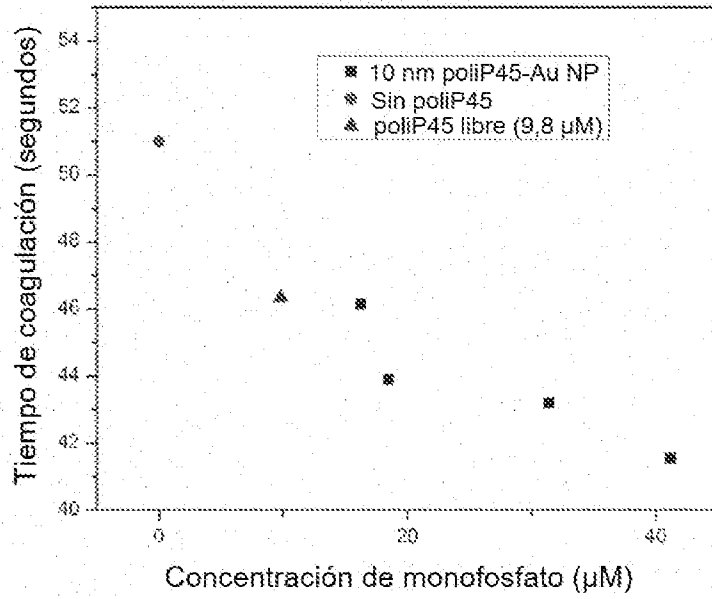


FIG. 53

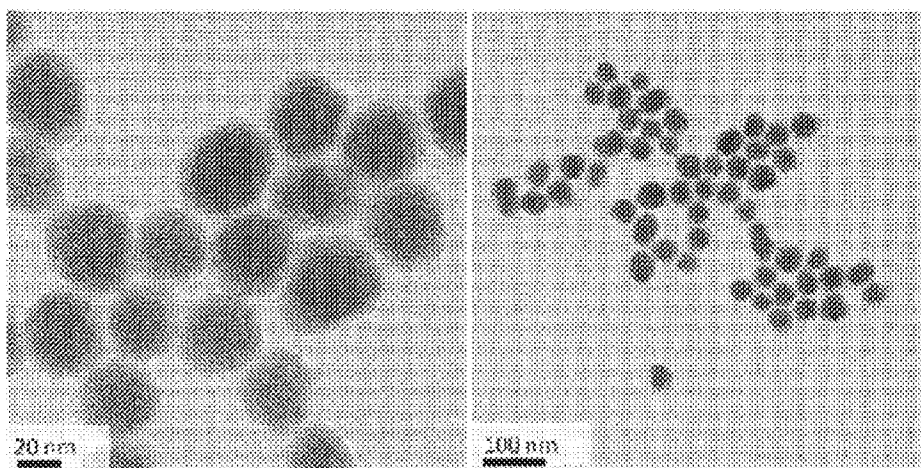


FIG. 54

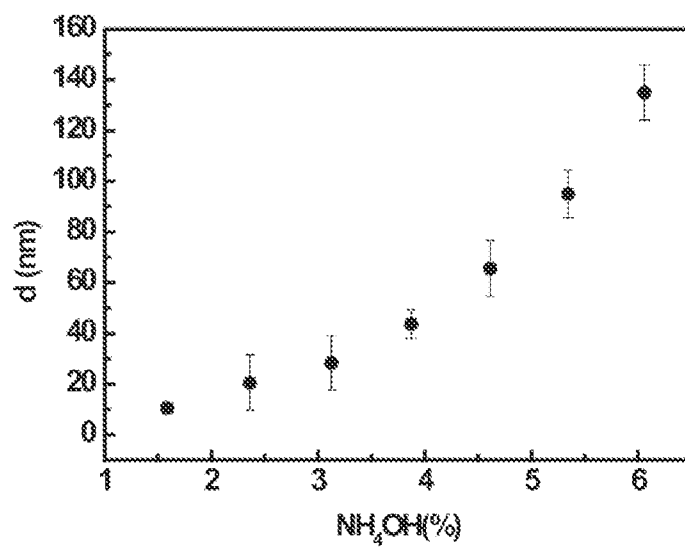


FIG. 55

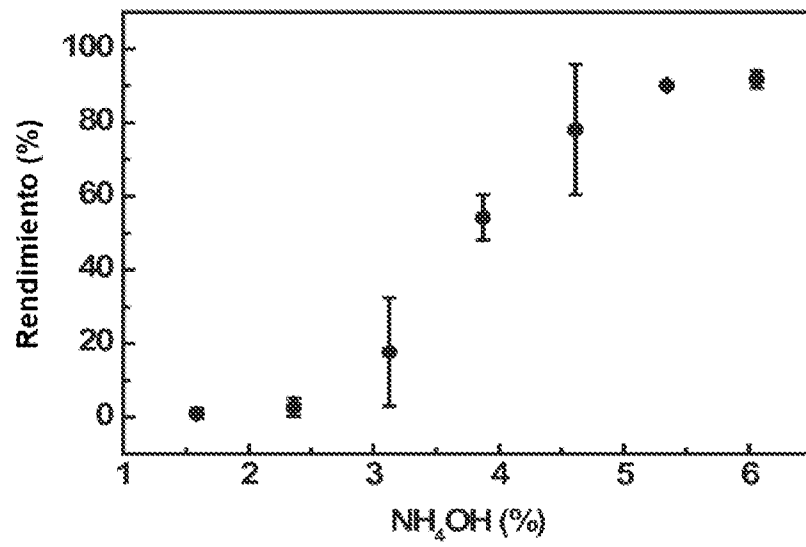


FIG. 56

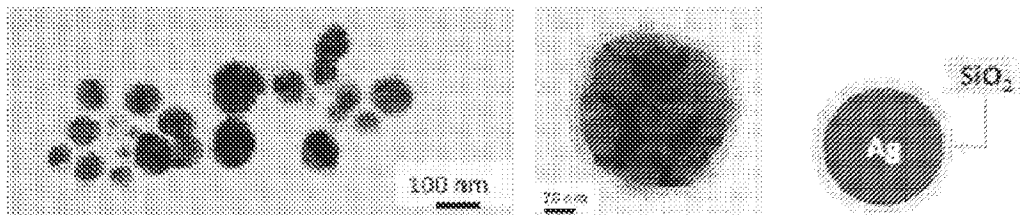


FIG. 57

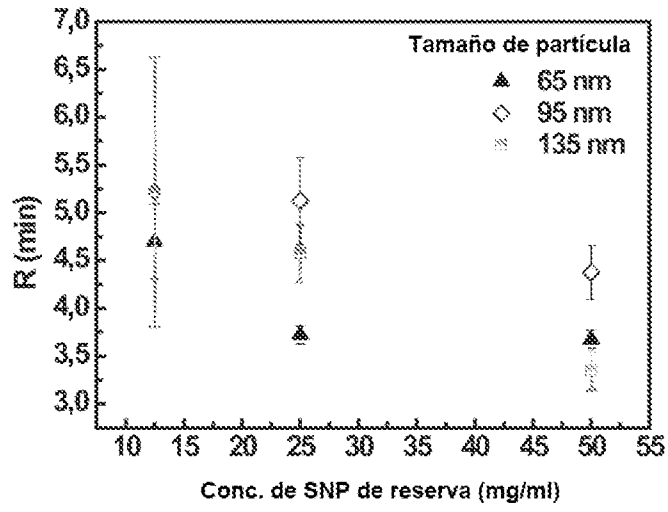
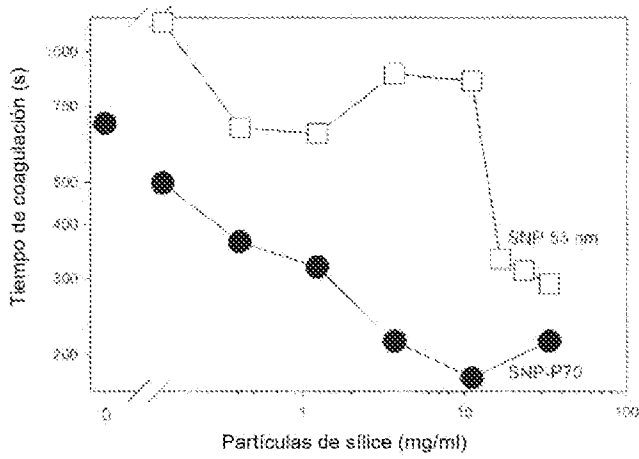
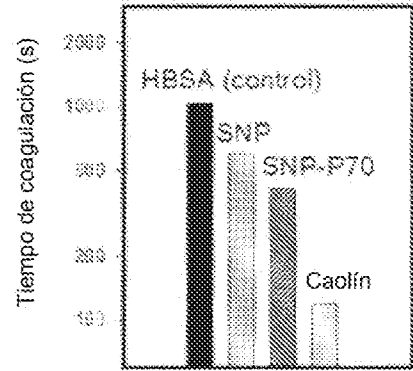


FIG. 58



(a)



(b)

FIG. 59

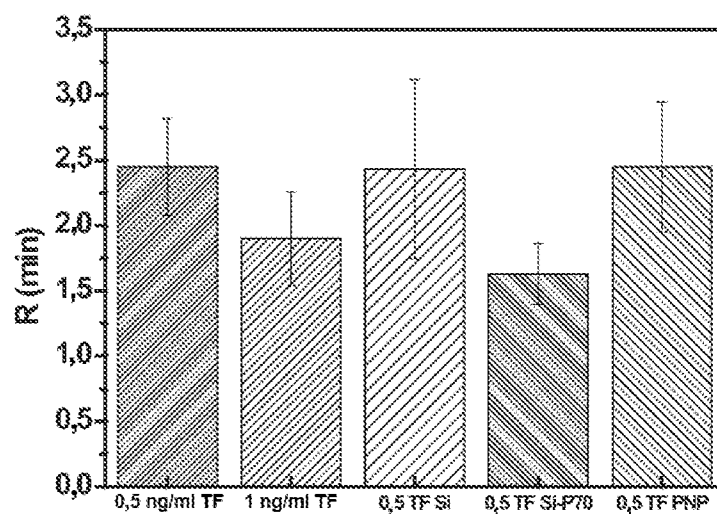


FIG. 60

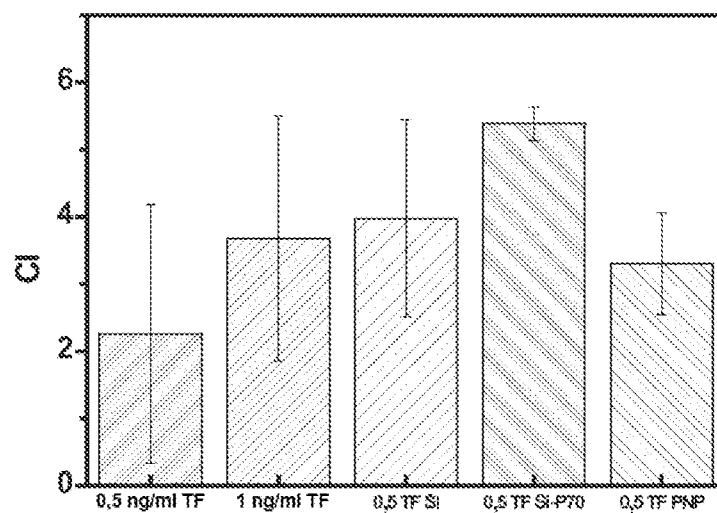


FIG. 61

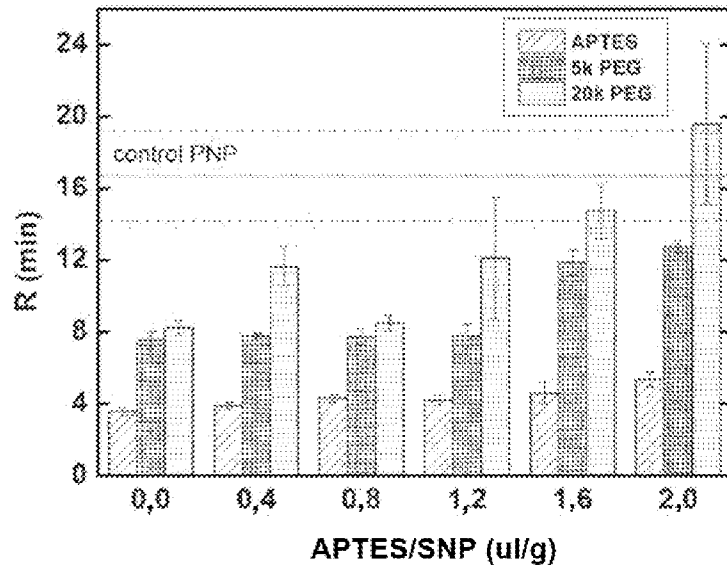


FIG. 62

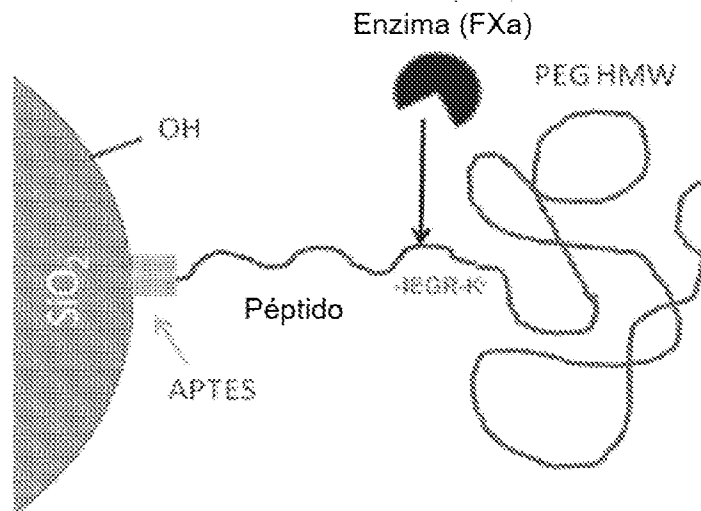


FIG. 63

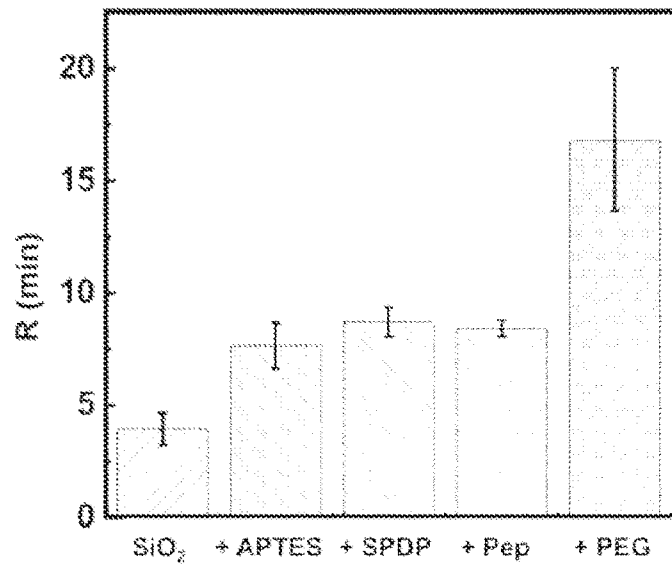


FIG. 64

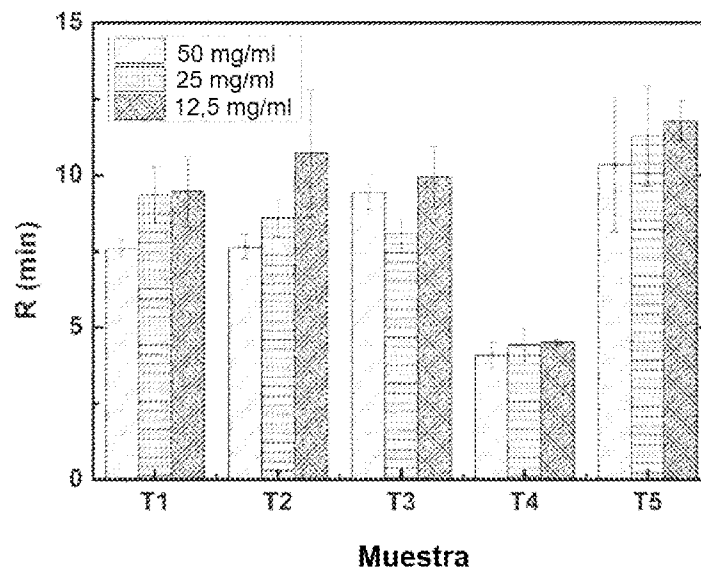


FIG. 65

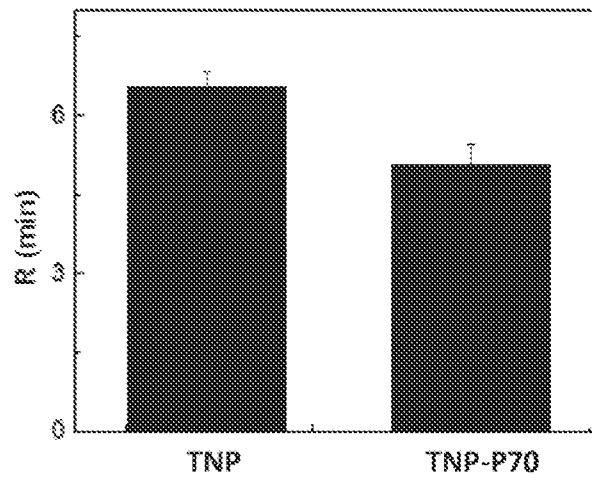


FIG. 66

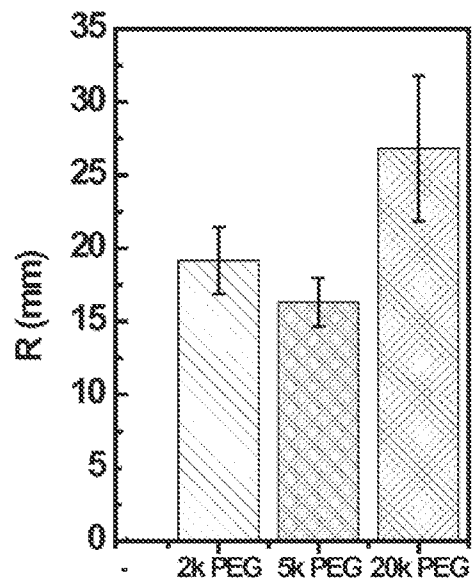


FIG. 67

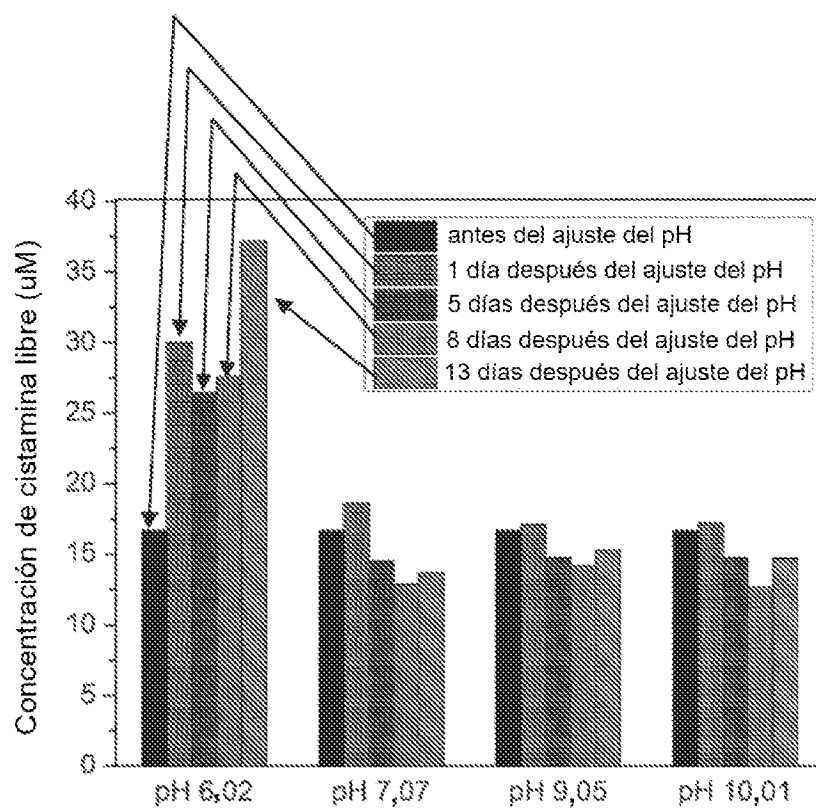


FIG. 68

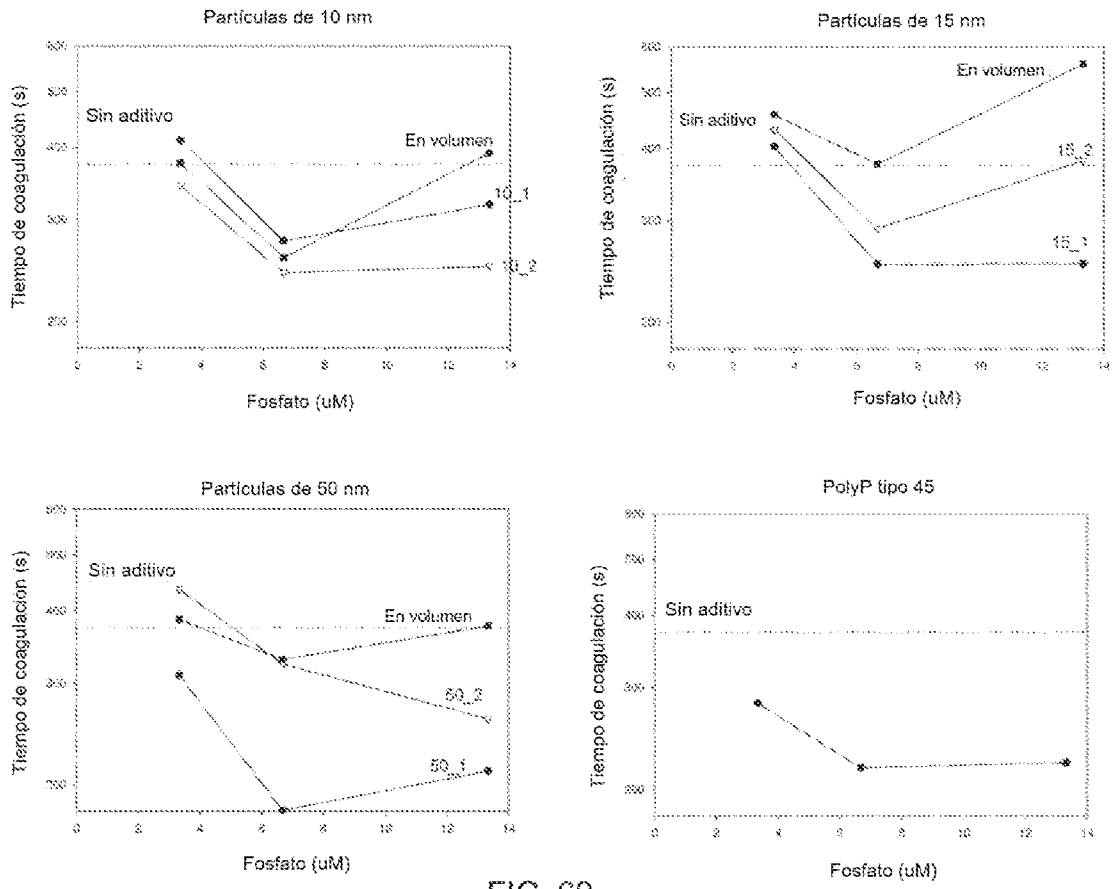


FIG. 69

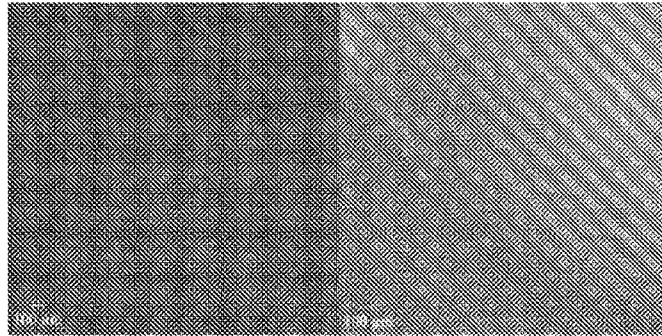


FIG. 70

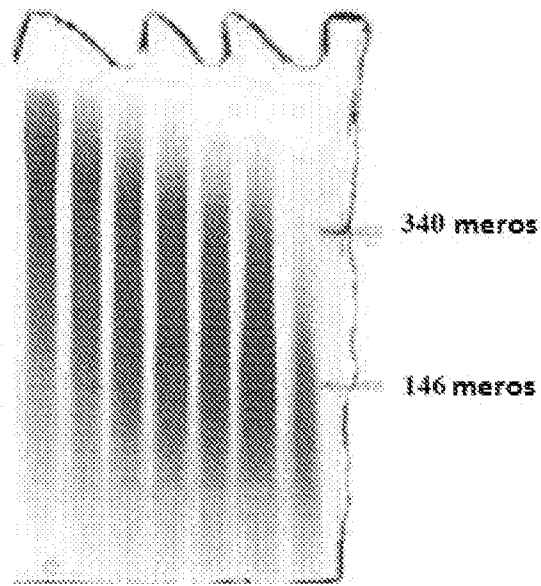


FIG. 71

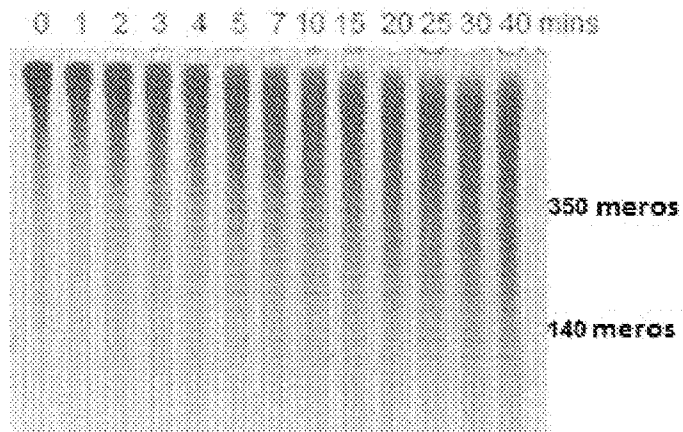


FIG. 72

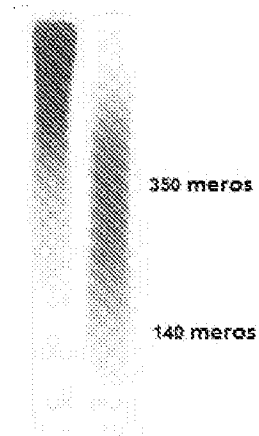


FIG. 73

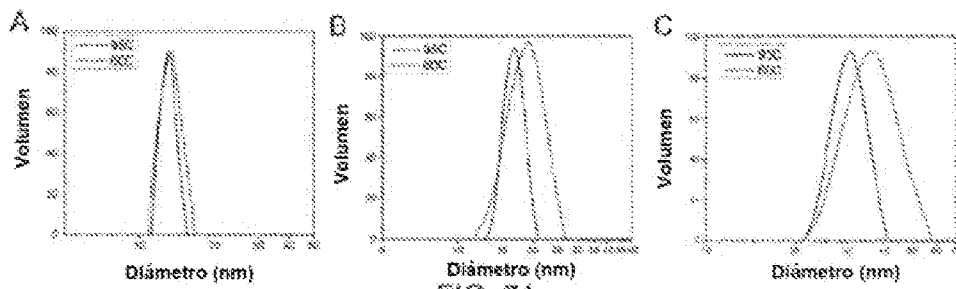
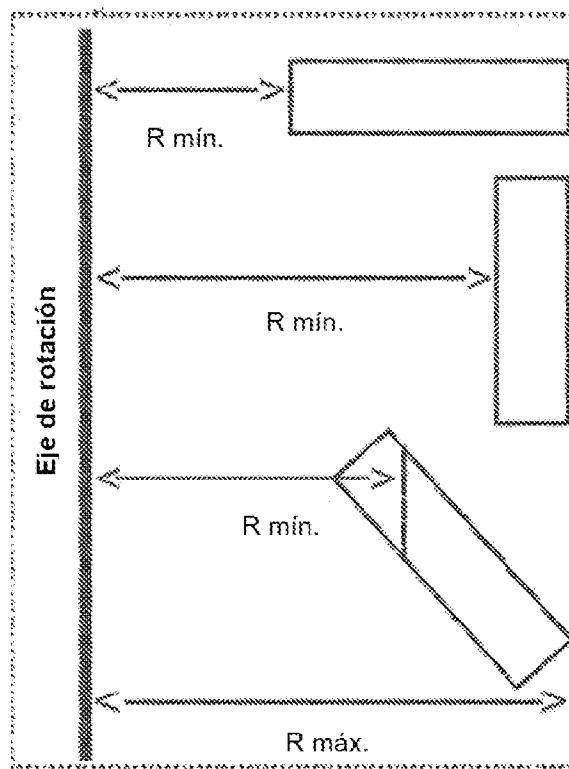
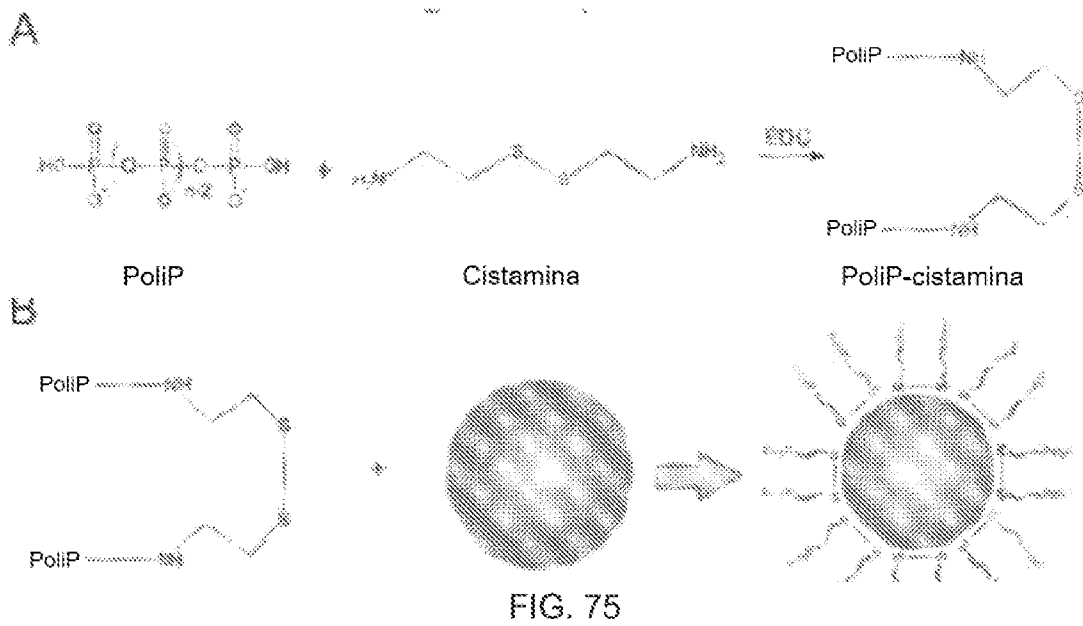


FIG. 74



**FIG. 76**

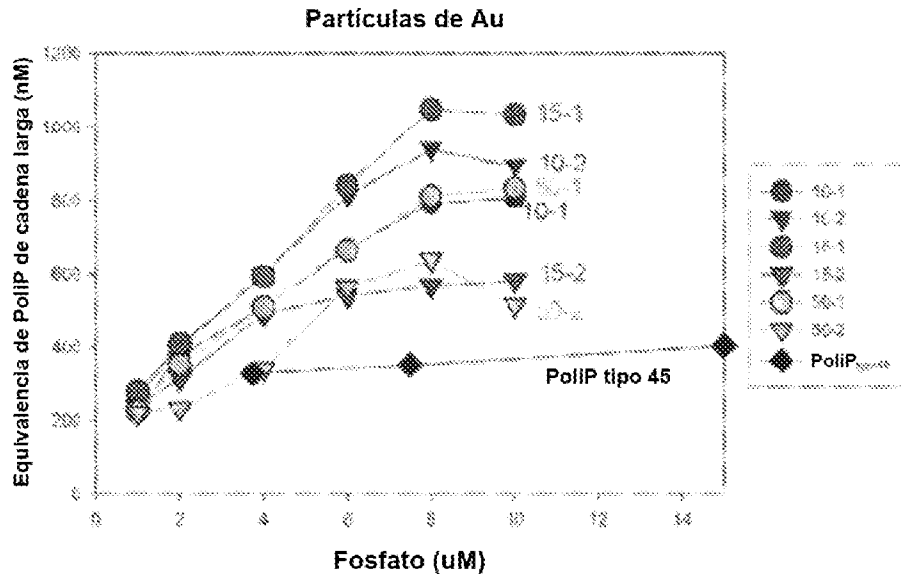


FIG. 77

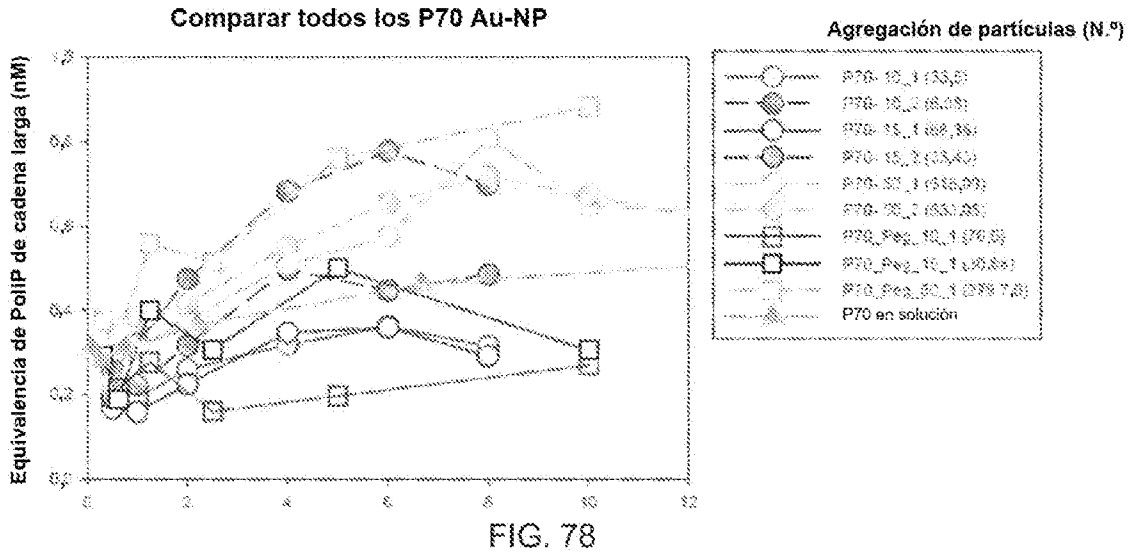


FIG. 78

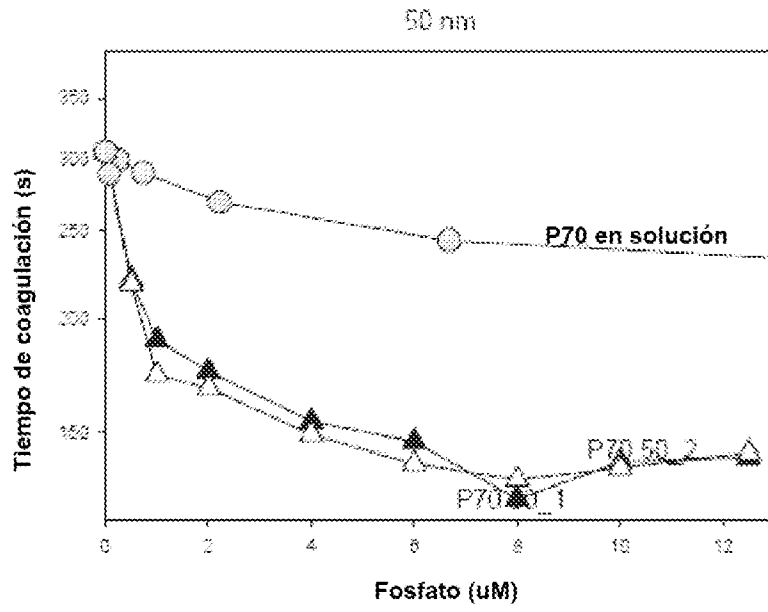


FIG. 79

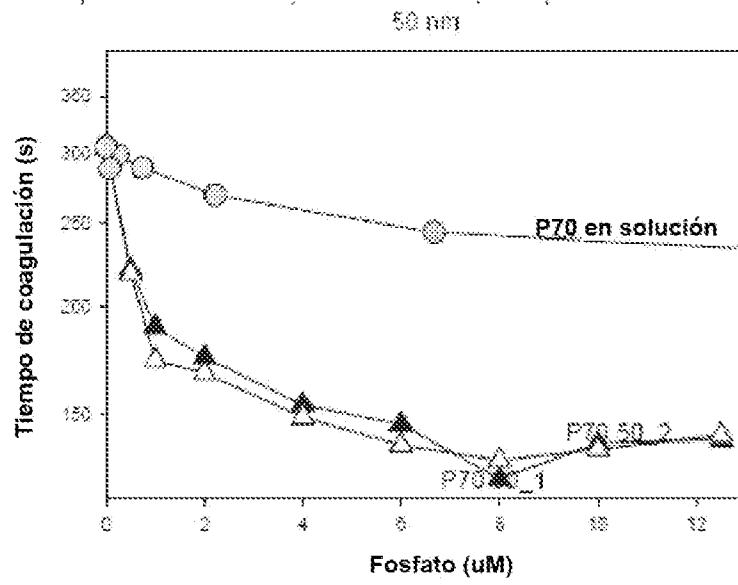


FIG. 80

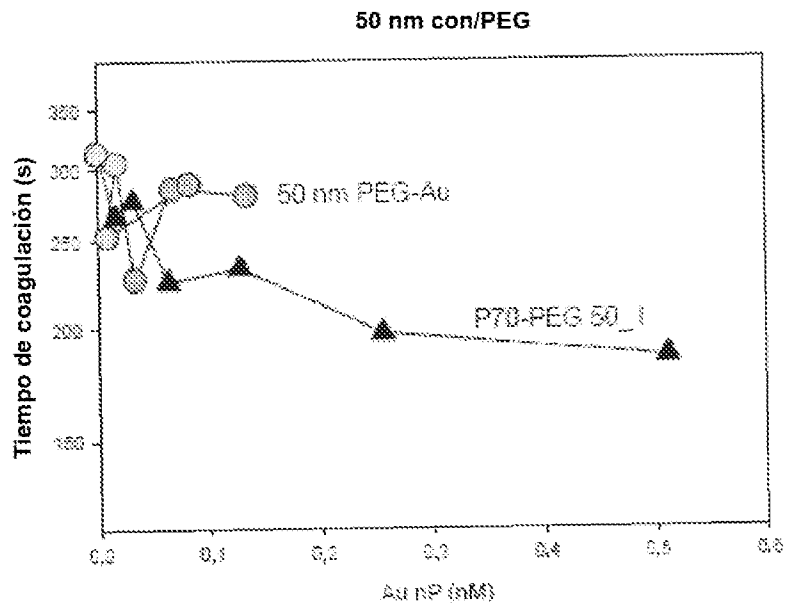


FIG. 81

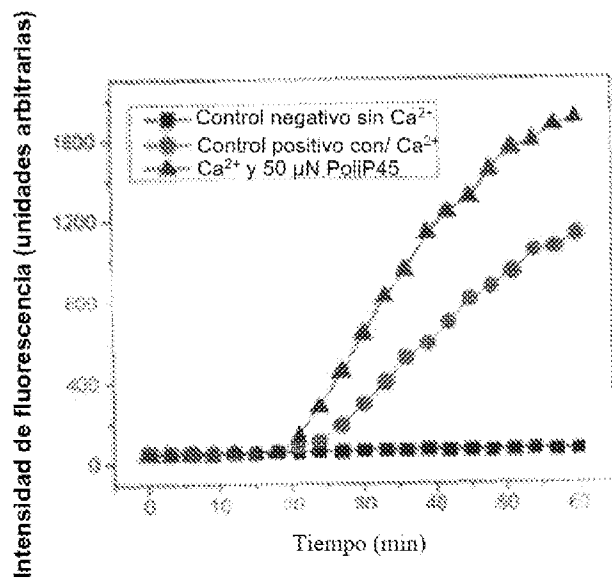


FIG. 82

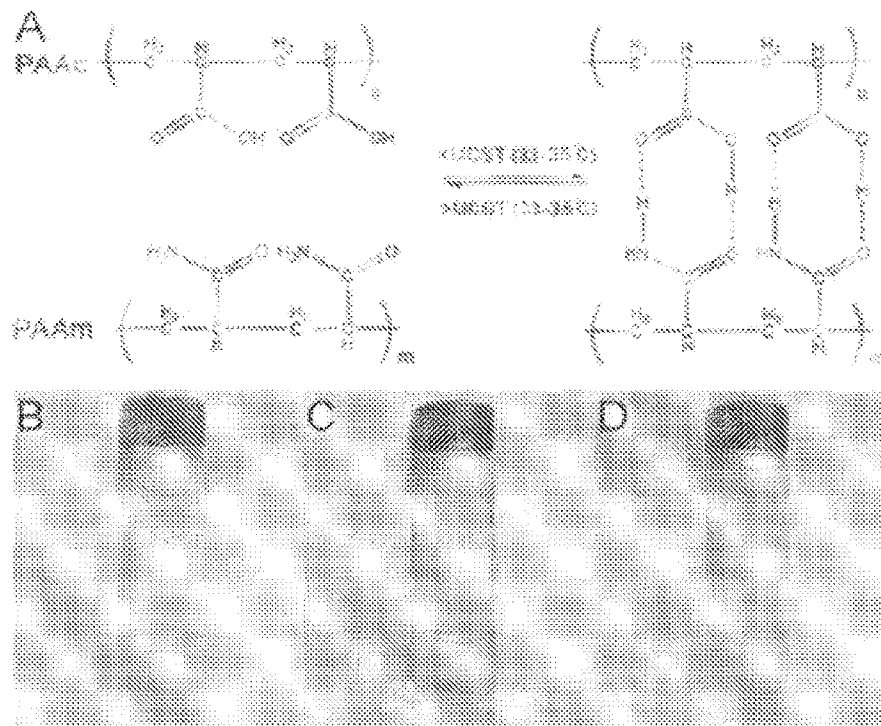


FIG. 83

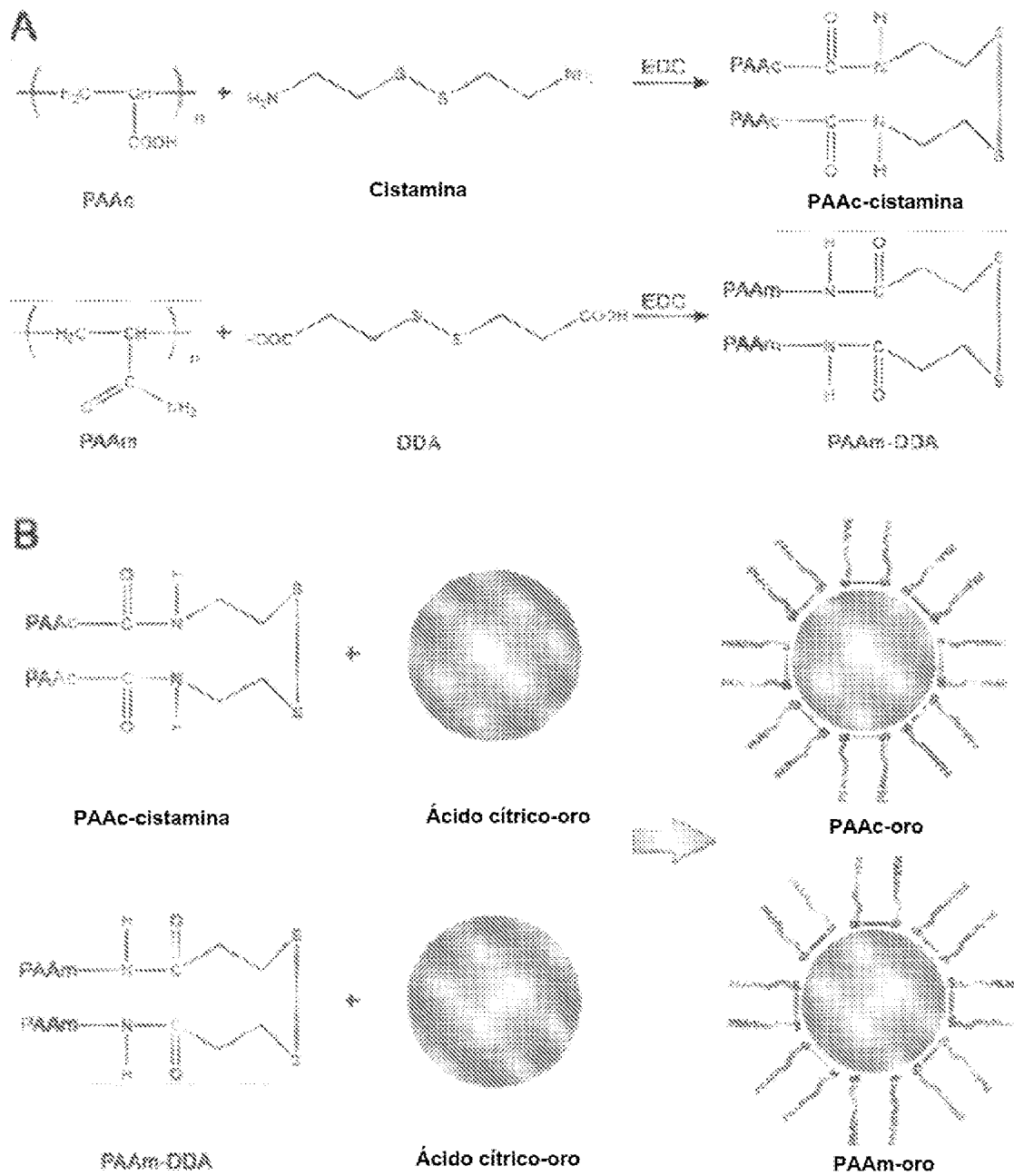


FIG. 84

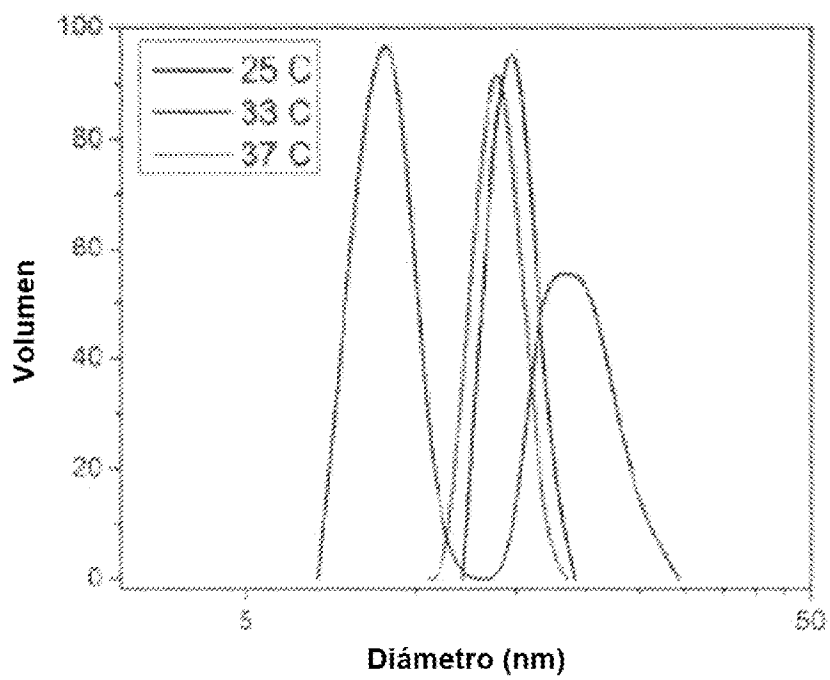


FIG. 85

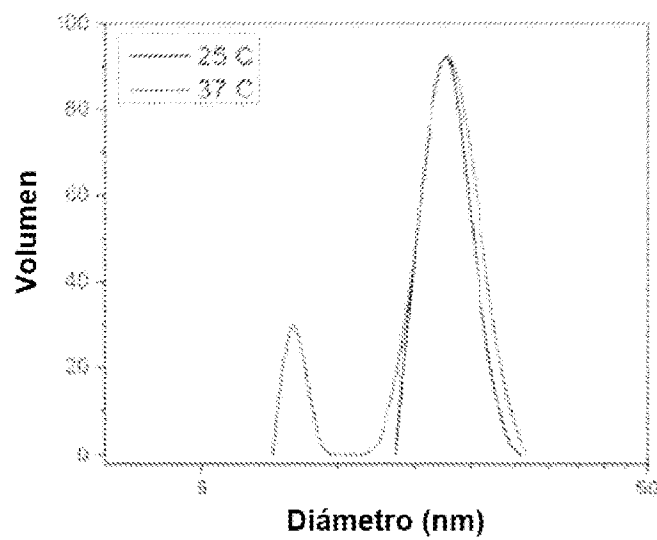


FIG. 86

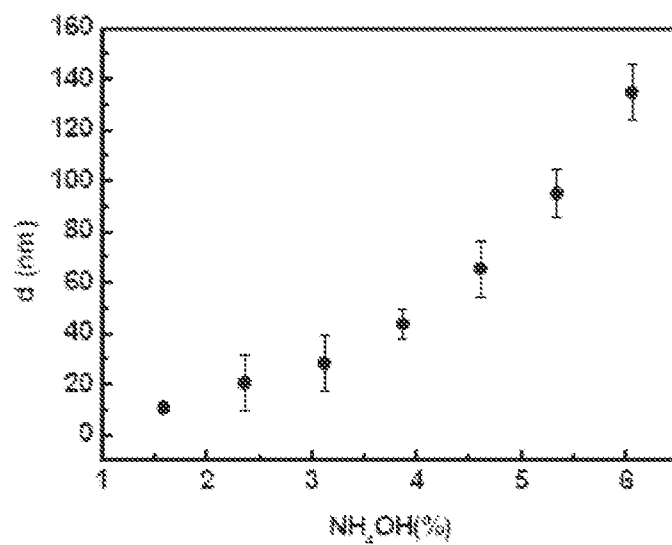


FIG. 87

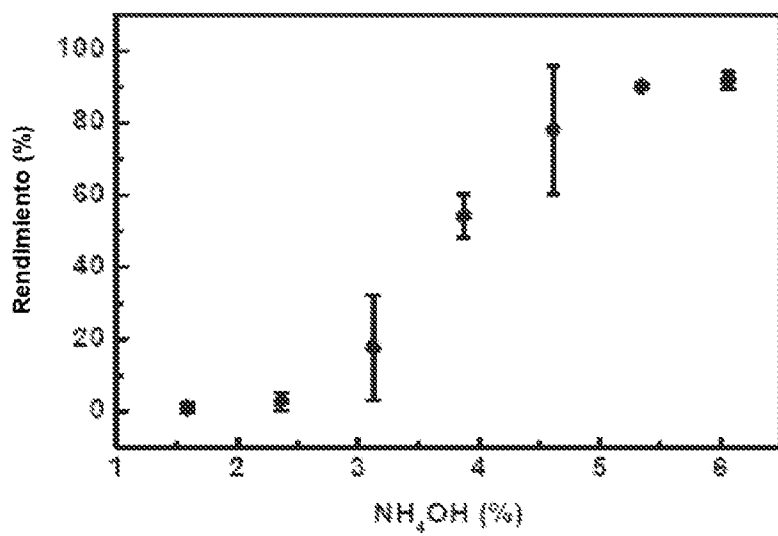


FIG. 88

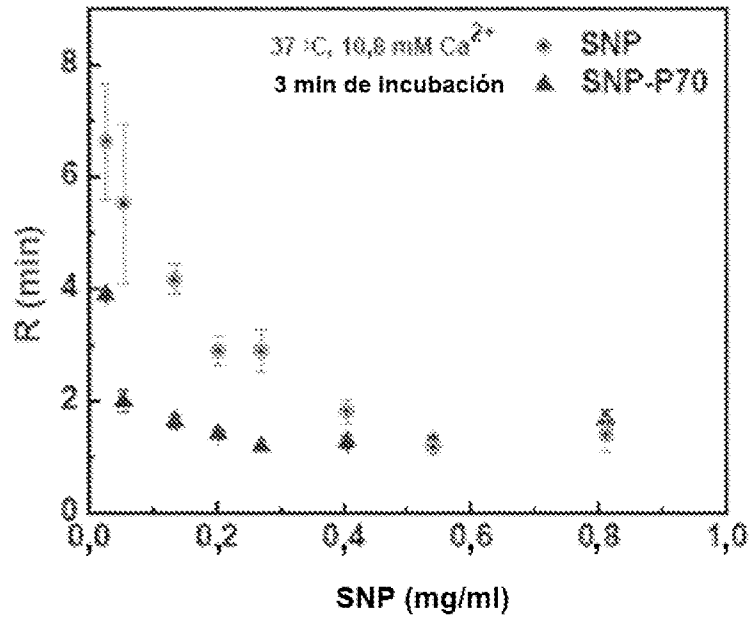


FIG. 89

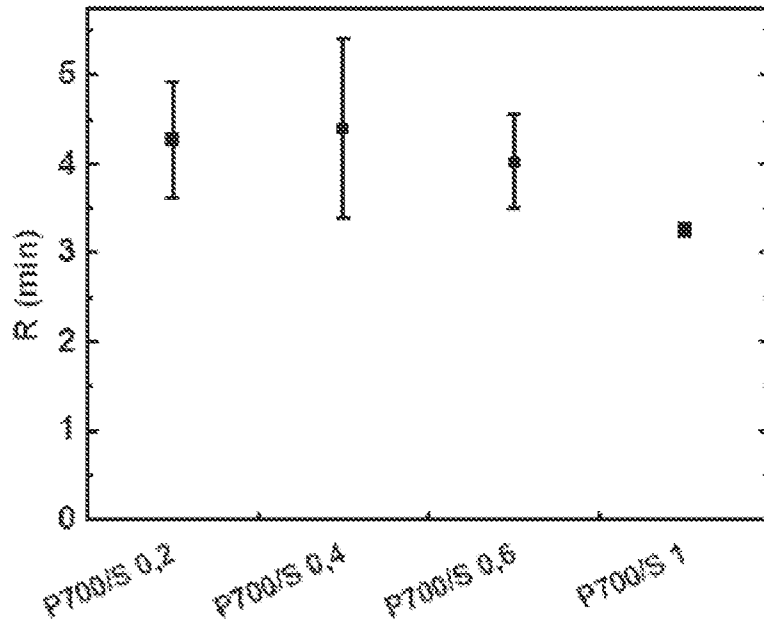


FIG. 90

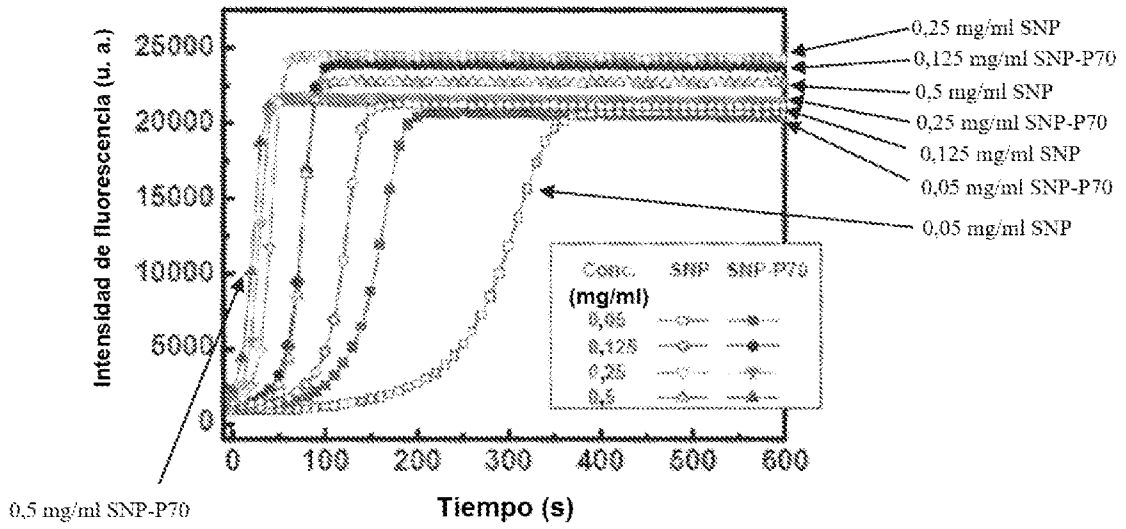


FIG. 91

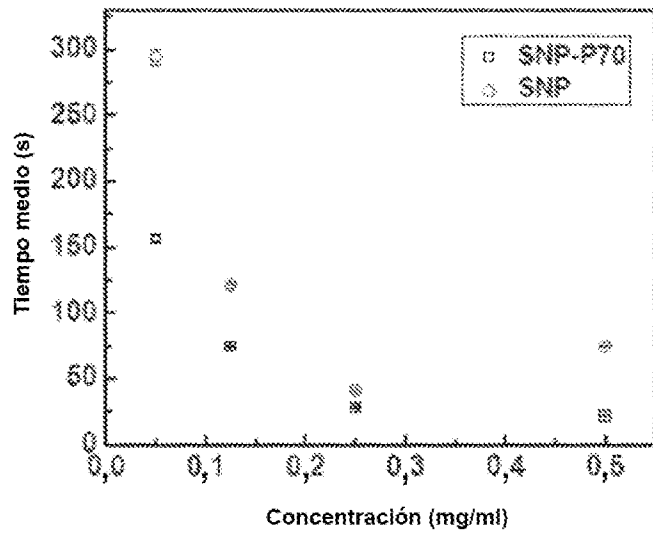


FIG. 92

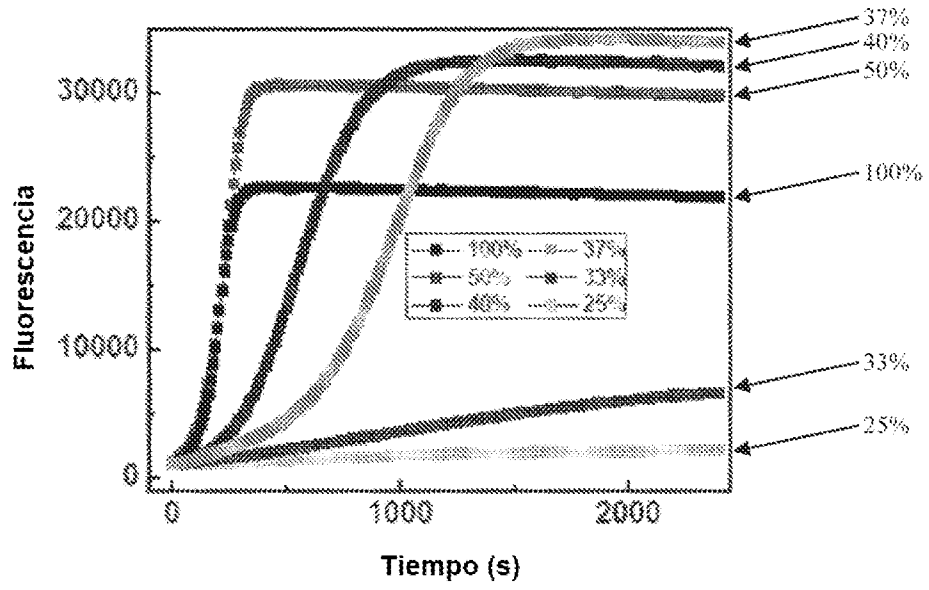


FIG. 93

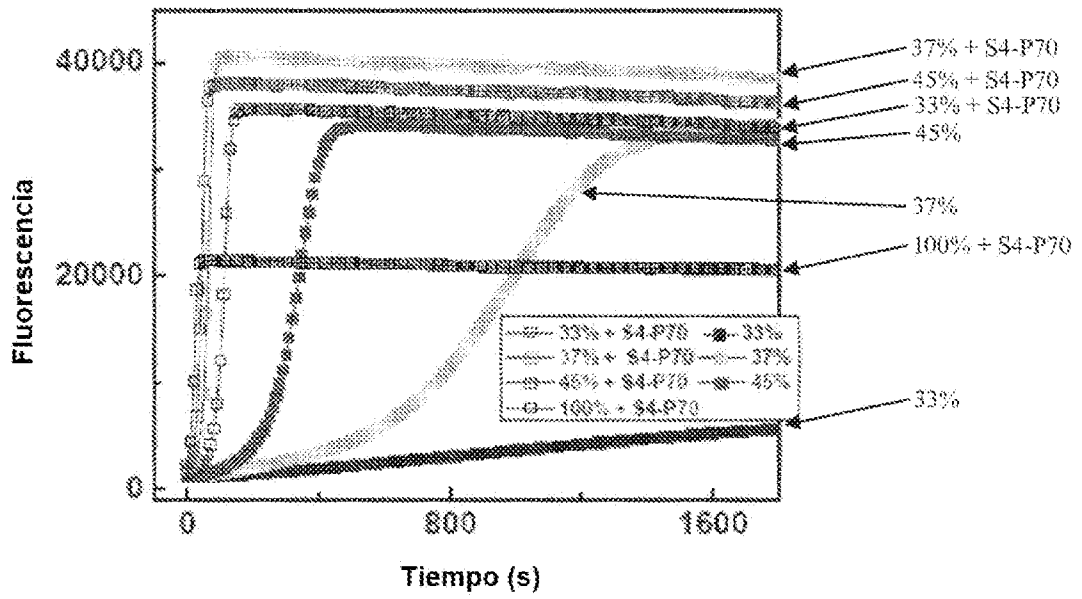


FIG. 94

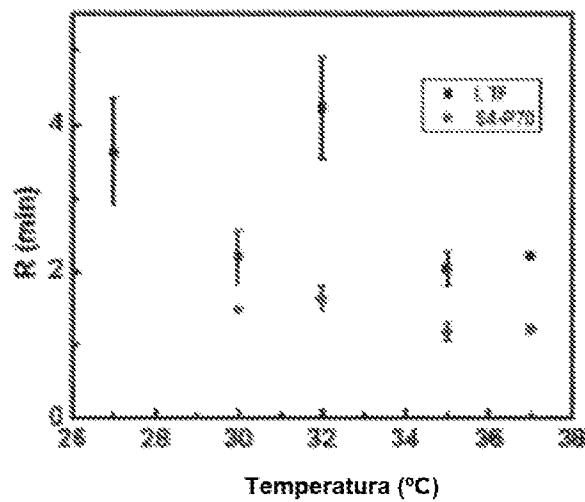


FIG. 95

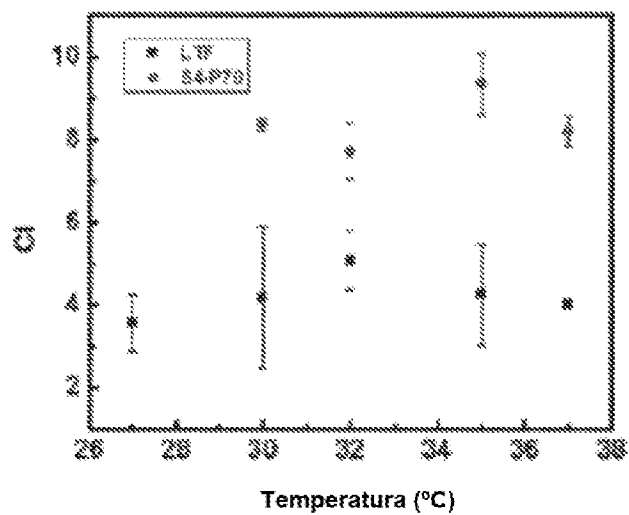


FIG. 96

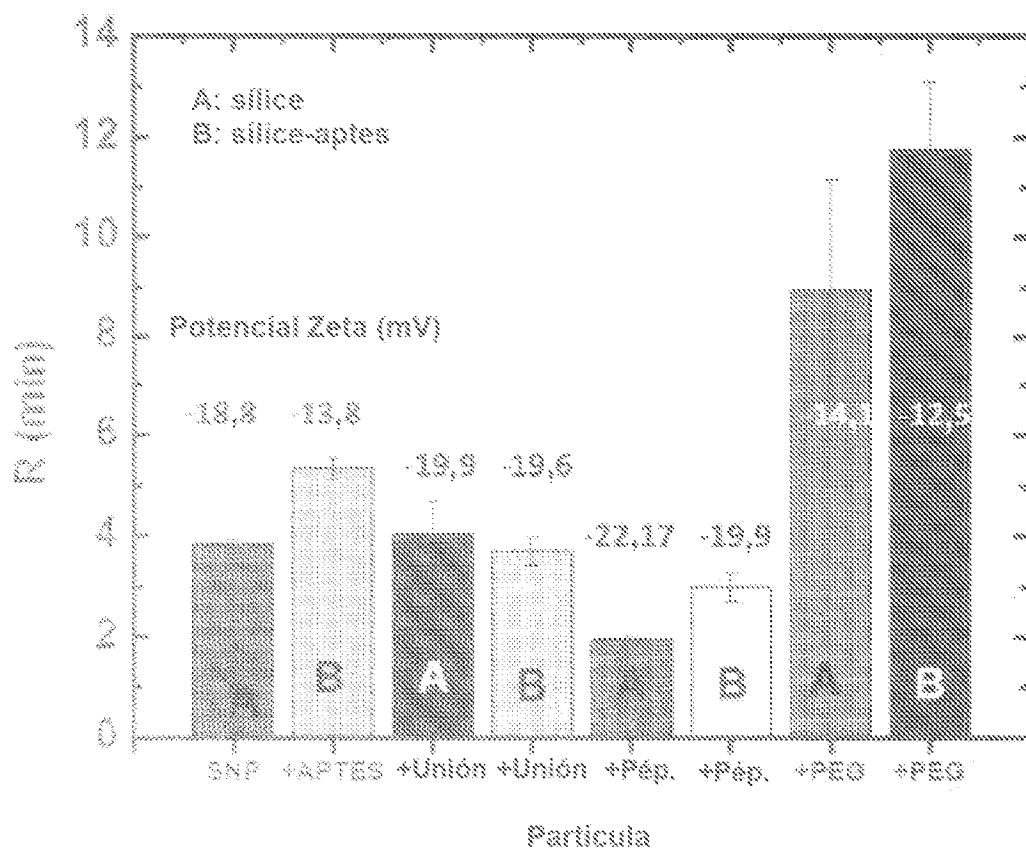


FIG. 97

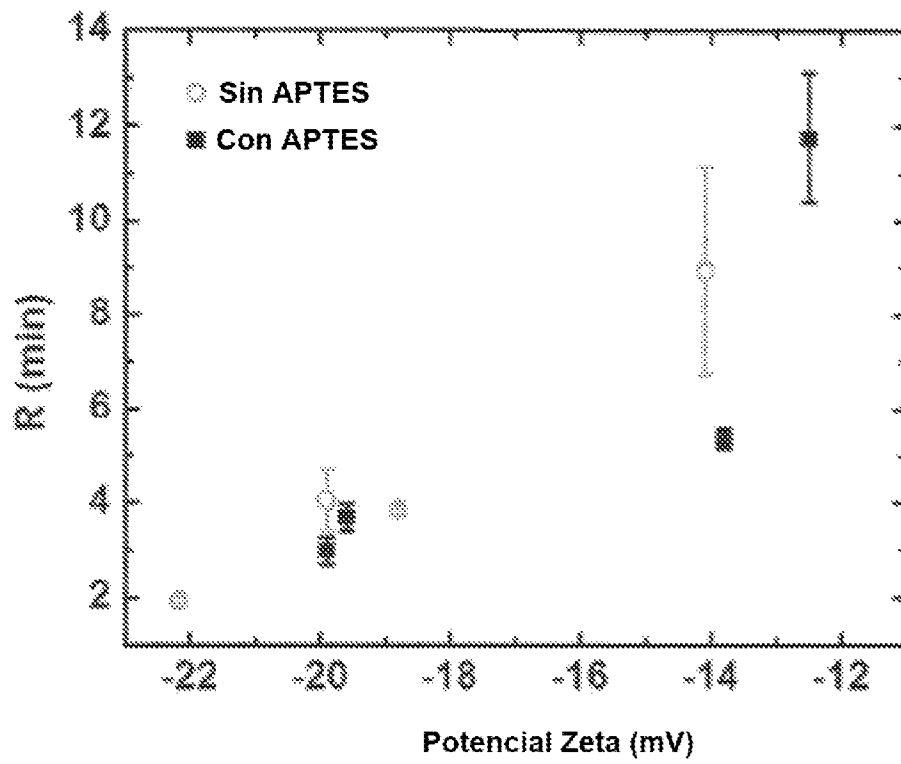


FIG. 98

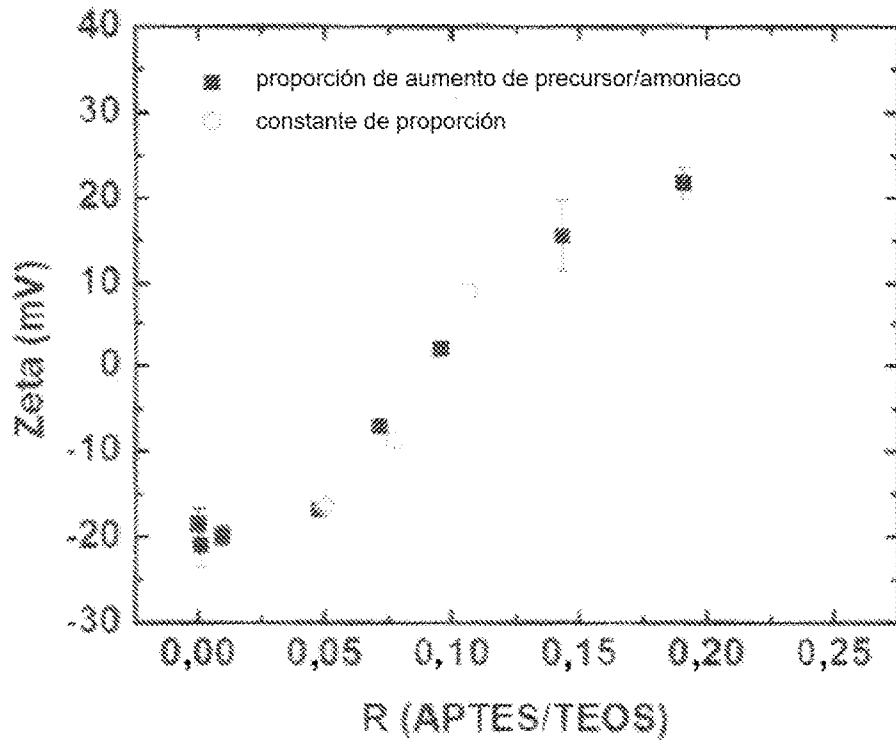


FIG. 99

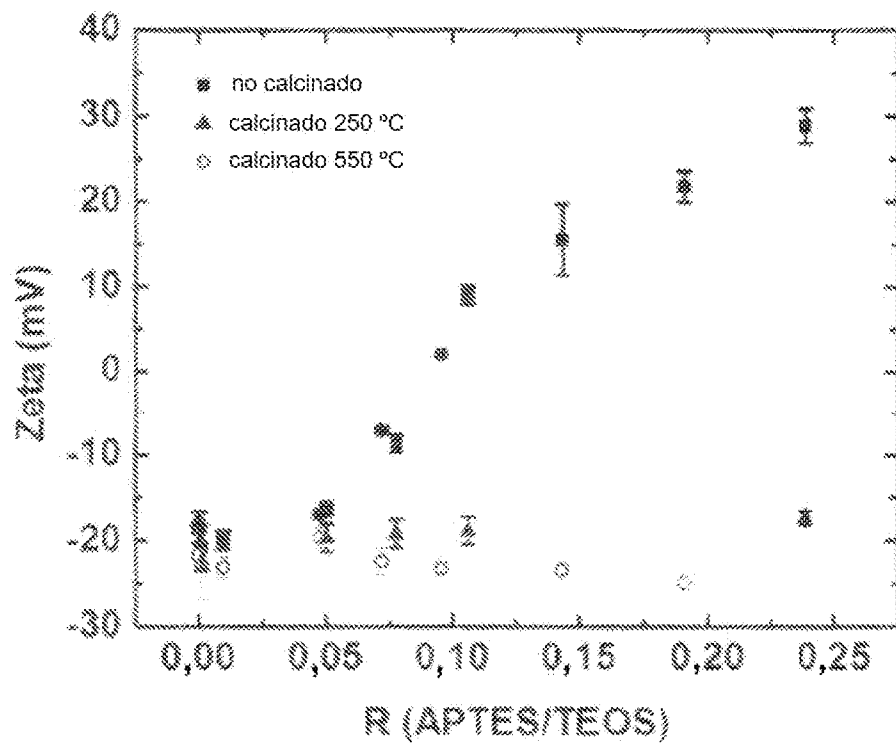


FIG. 100

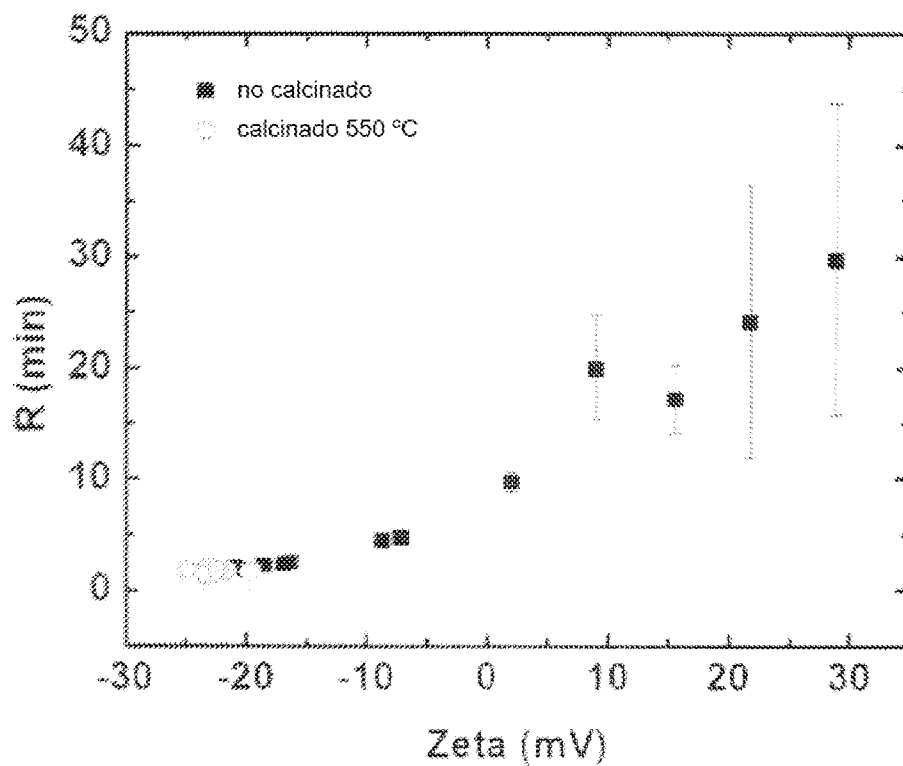


FIG. 101

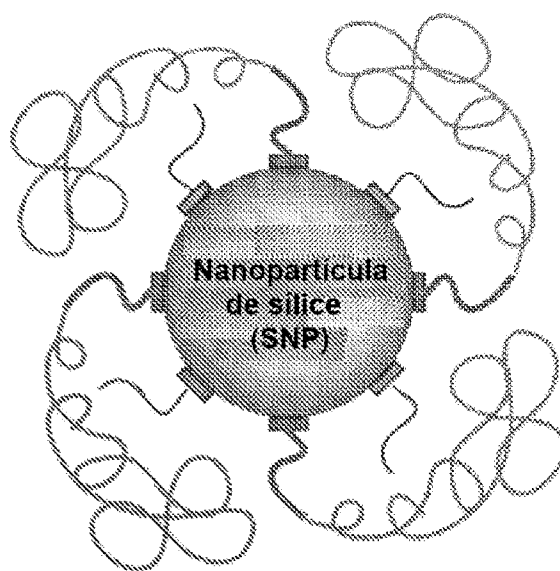
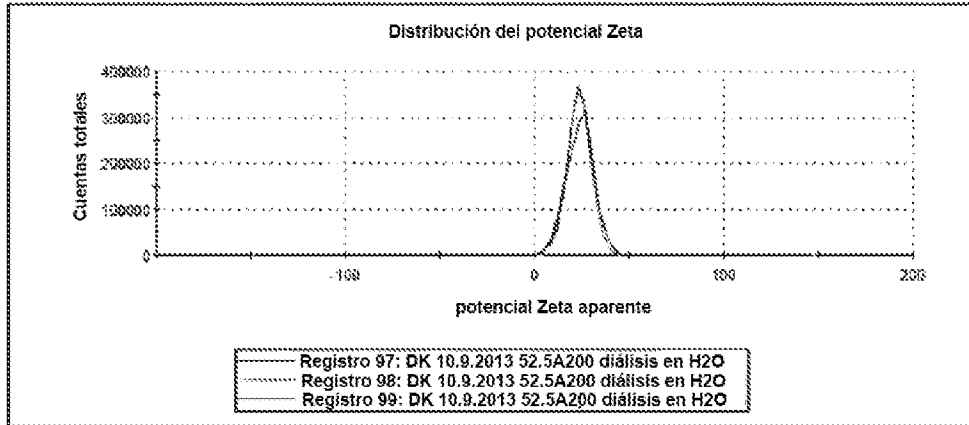


FIG. 102

	Media (mV)	Área (%)	Desv. Estándar (mV)
Potencial Zeta (mV): 23,9	Pico 1: 23,9	100,0	6,44
Desviación Zeta (mV): 6,44	Pico 2: 0,00	0,0	0,00
Conductividad (mS/cm): 0,0134	Pico 3: 0,00	0,0	0,00

Calidad del resultado: buena



	Media (mV)	Área (%)	Desv. Estándar (mV)
Potencial Zeta (mV): 13,9	Pico 1: 13,9	100,0	7,59
Desviación Zeta (mV): 7,59	Pico 2: 0,00	0,0	0,00
Conductividad (mS/cm): 0,103	Pico 3: 0,00	0,0	0,00

Calidad del resultado: buena

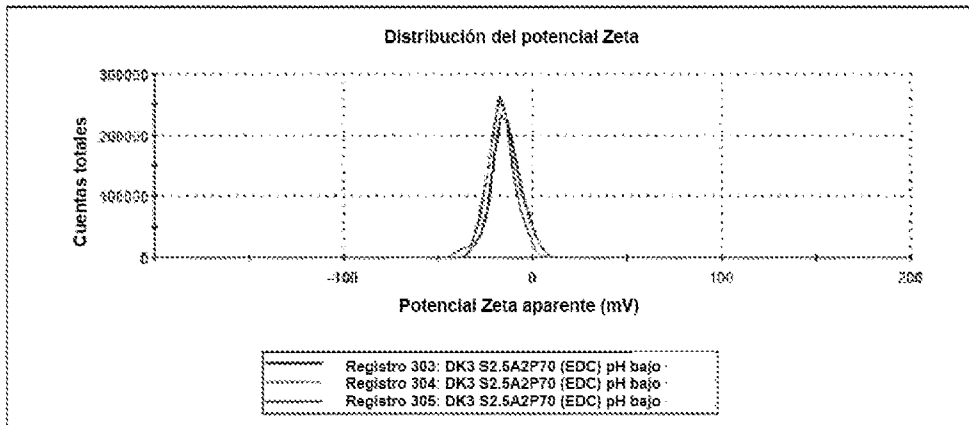


FIG. 103

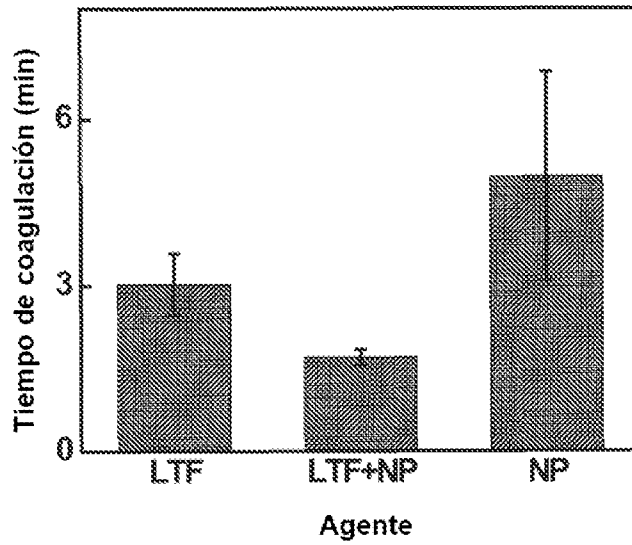


FIG. 104

	Tamaño (d.nm):	% de intensidad:	Desv. Estándar (d.nm):
Z promedio (d.nm) 201,7	Pico 1: 132,5	100,0	24,94
PdI: 0,540	Pico 2: 0,00	0,0	0,000
Intersección: 0,934	Pico 3: 0,00	0,0	0,000
Calidad del resultado: buena			

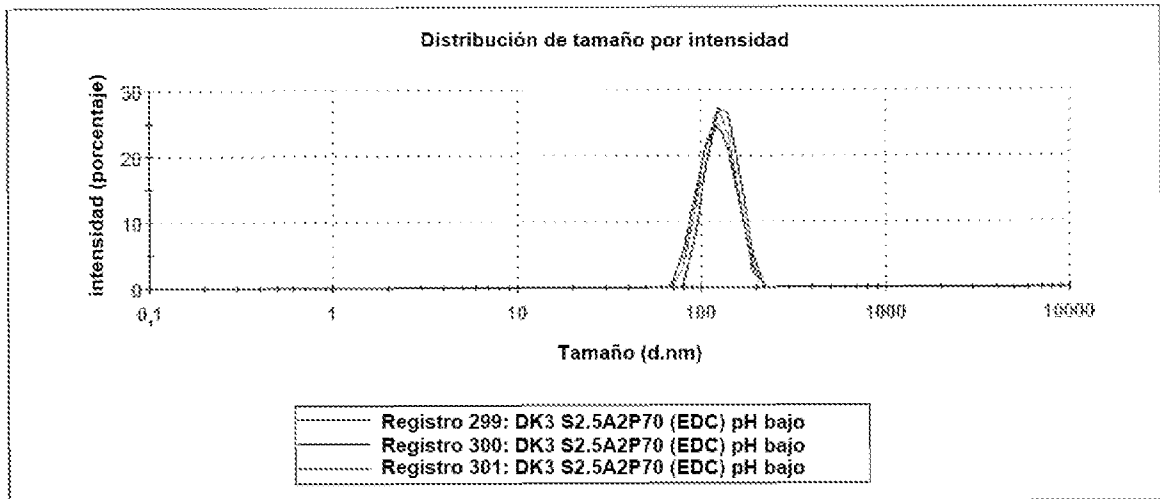
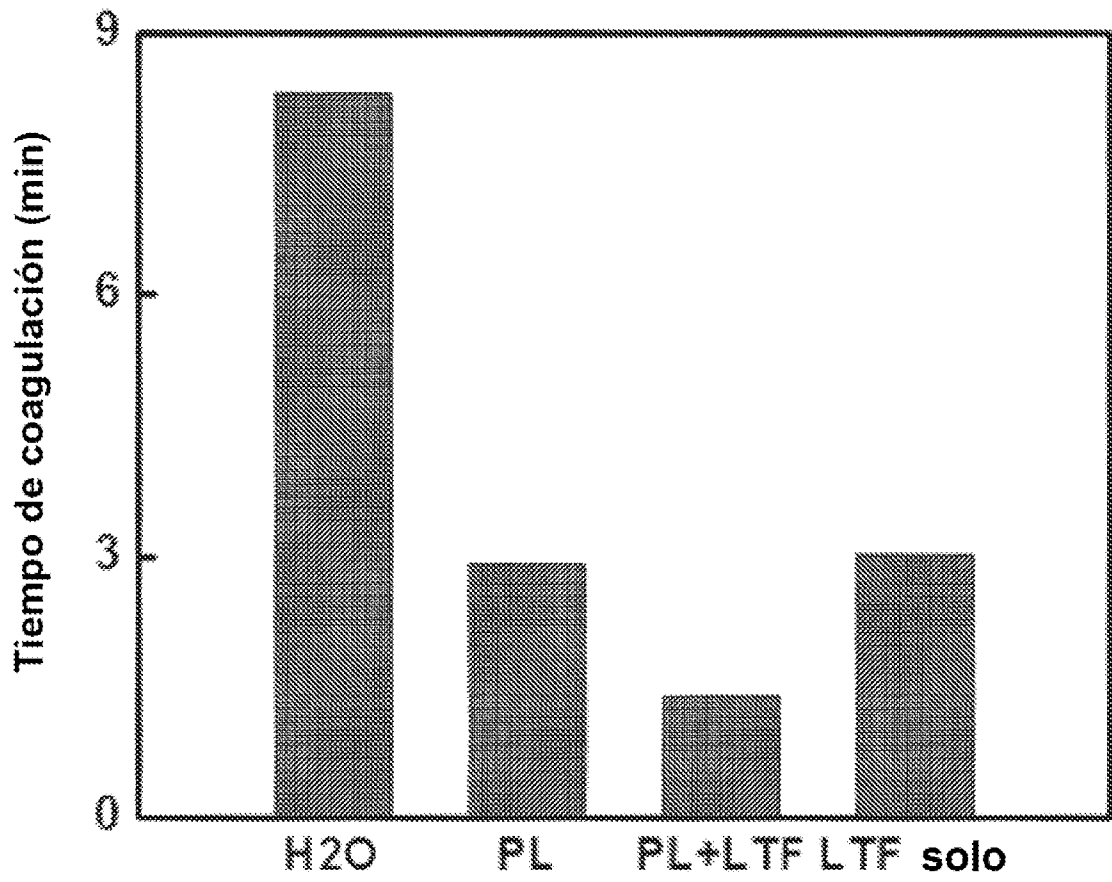


FIG. 105



**SNP-P70 éster**

FIG. 106

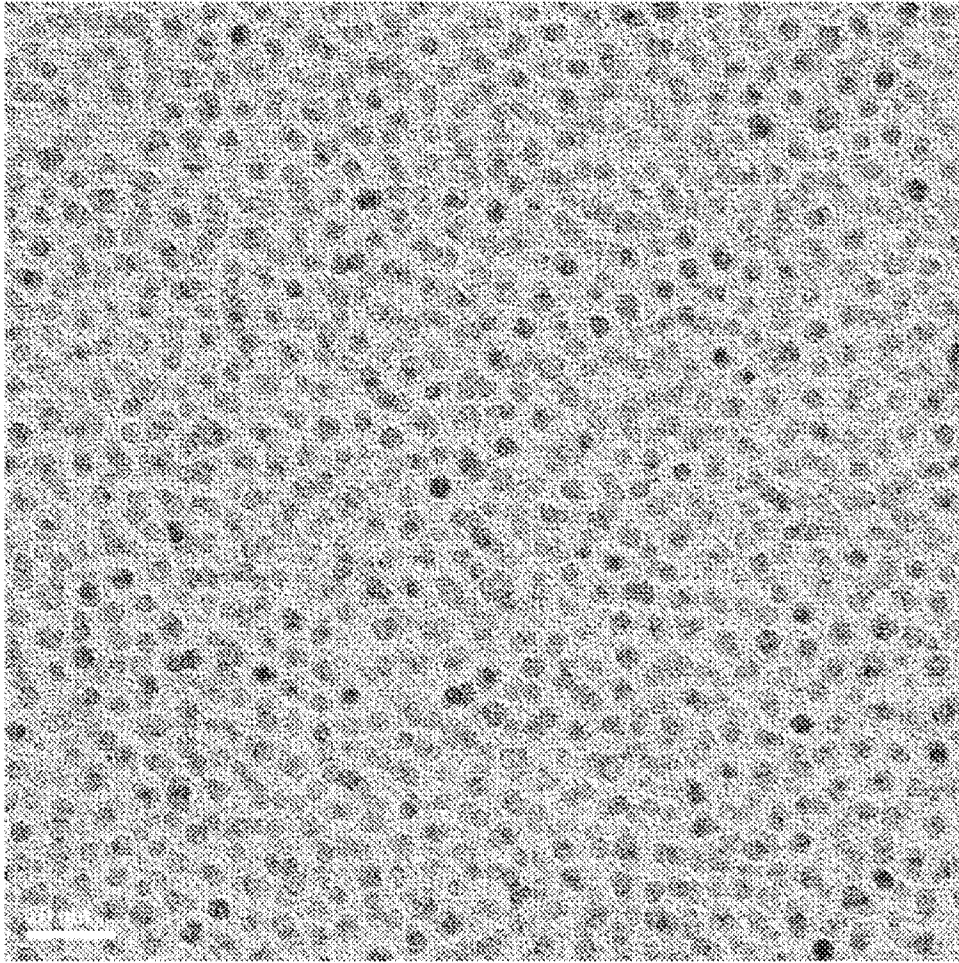


FIG. 107

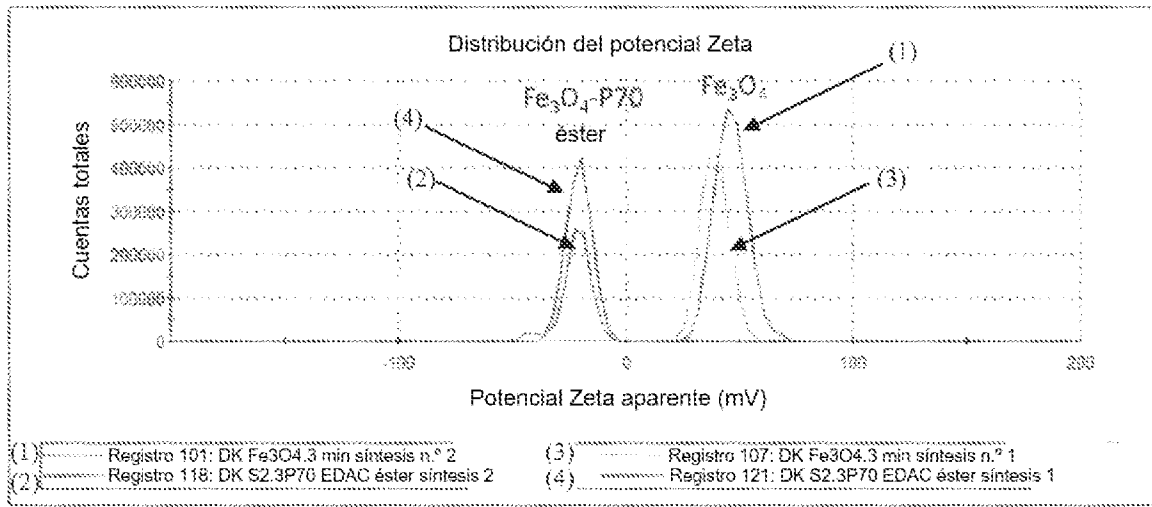


FIG. 108

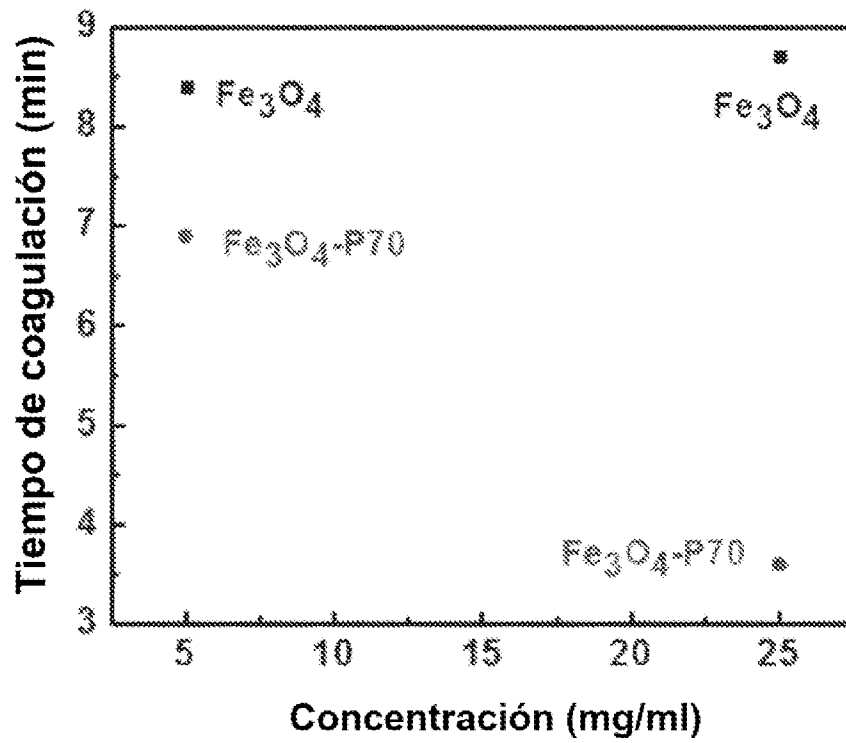


FIG. 109

	Media (mV)	Área (%)	Desv. Estándar (mV)
Potencial Zeta (mV): -20,5	Pico 1: -20,5	100,0	5,32
Desviación Zeta (mV): 5,32	Pico 2: 0,00	0,0	0,00
Conductividad (mS/cm): 0,0111	Pico 3: 0,00	0,0	0,00

Calidad del resultado: buena

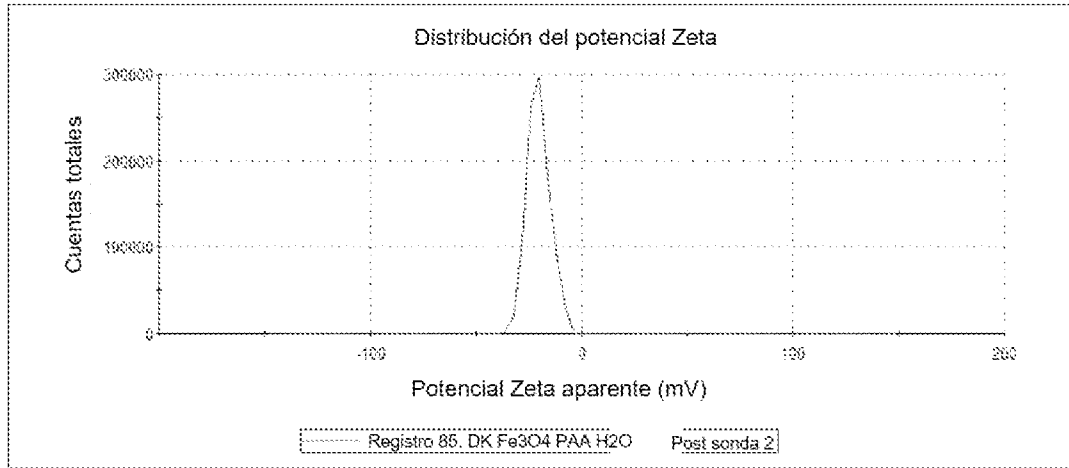


FIG. 110

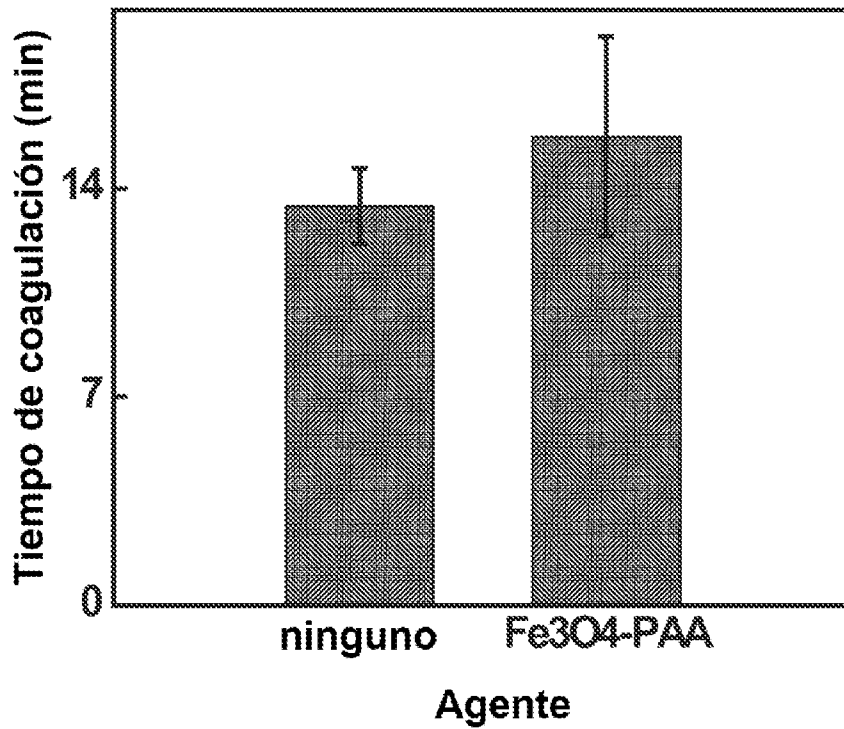


FIG. 111

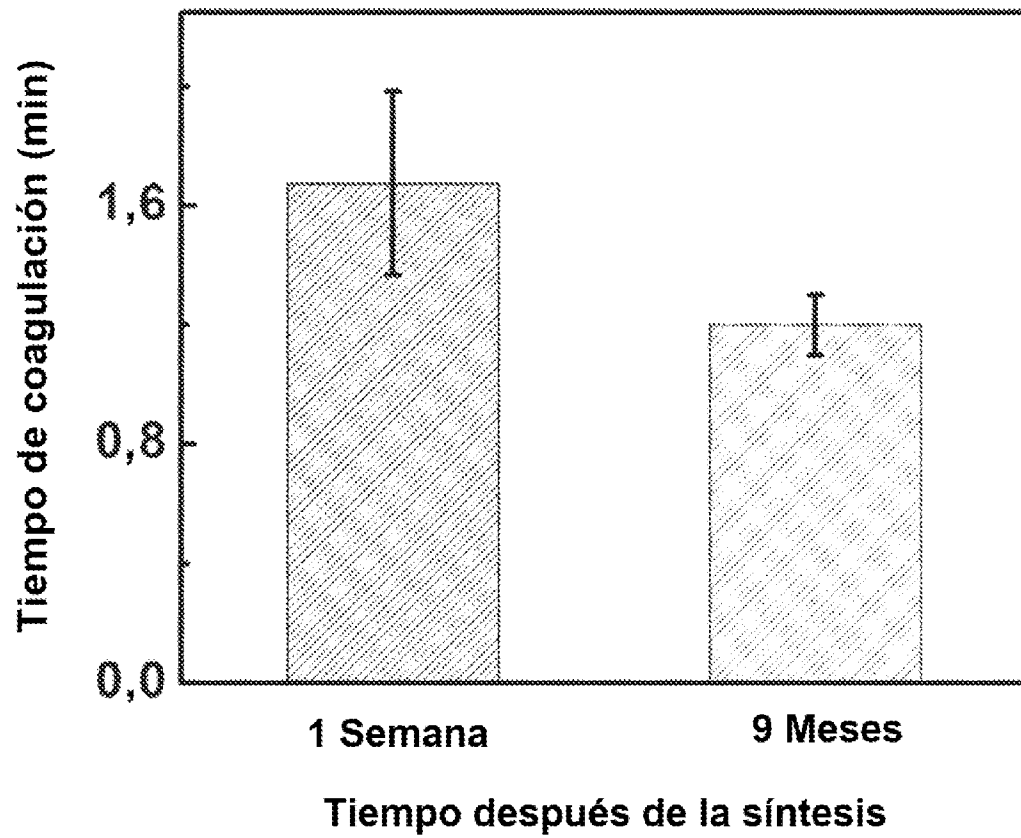


FIG. 112