

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 380**

51 Int. Cl.:

A61L 15/40 (2006.01)

A61L 15/42 (2006.01)

A61L 15/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2010 PCT/IL2010/000066**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.08.2010 WO10086848**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2010 E 10705443 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2381969**

54 Título: **Procedimientos para la preparación de apósitos para heridas, y un banco de apósitos para heridas**

30 Prioridad:

27.01.2009 US 147513 P

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

24.10.2016

73 Titular/es:

**REDDRESS LTD. (100.0%)
2 Shkedim St.
37011 Pardes Hana, IL**

72 Inventor/es:

**KUSHNIR, ALON y
KUSHNIR, IGAL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 587 380 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

Procedimientos para la preparación de apósitos para heridas, y un banco de apósitos para heridas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos para la producción de apósitos para heridas, y a un banco de apósitos para heridas.

Antecedentes de la invención

10 La piel es el órgano más grande del cuerpo de los mamíferos y desempeña diversas funciones críticas. En algunos casos, la piel se ve alterada por un trauma (por ejemplo, laceración, abrasión, quemaduras o punción) o una ulceración (por ejemplo, úlceras de pie diabético). Las alteraciones en la piel que no se curan, o que se repiten de forma espontánea, se conocen como heridas crónicas (Fowler (1990) en Chronic wounds: an overview. En: Krasner D, editor. Chronic wound care: a clinical source book for healthcare professionals. King of Prussia, PA: Health Management Publications, Inc; pág. 12-8 y Singh *et al* (2004) Asian J Surg 27:326-32).

15 Aproximadamente el 1% y el 2% de los individuos se verán afectados por la ulceración de la pierna durante su vida, y esta cifra probablemente aumentará a medida que la población envejece (Rees y Hirshberg (1999). Adv Wound Care 1999; 12:4-7 y Callam M. (1992) Phlebology 7:S6-S12). Los gastos globales para el cuidado de heridas alcanza hasta a \$ 13 a \$ 15 mil millones al año (Walmsley (2002) En: Clinica reports. London: PJB Publications, Ltd.).

20 Los grupos de pacientes que sufren heridas crónicas incluyen, pero no se limitan a, pacientes diabéticos, pacientes geriátricos y pacientes con problemas circulatorios. Además, las heridas crónicas pueden aparecer como resultado de un trauma agudo o como un síntoma después de la cirugía.

Las heridas crónicas pueden variar en tamaño, profundidad y estadio de curación. Las heridas pueden contener tejido necrótico, infección, costras, o exudados (purulenta, cerótico).

25 Las heridas crónicas se pueden clasificar por su causa, tal como presión, diabético, isquémica, venosa, y desgaste y/o por la naturaleza de la propia herida como su profundidad y/o estadio de curación y/o descarga y/o infecciones. Las quemaduras son otro tipo de herida que es difícil de tratar.

30 El tratamiento de quemaduras convencional se basa normalmente en una crema tópica de antibióticos (por ejemplo, sulfadiazina de plata) seguido de un apósito antiadherente y gasa. El uso de apósitos biológicos basados en los injertos de células cultivadas y/o productos sanguíneos fraccionados también se ha sugerido. De acuerdo con diferentes estrategias de manipulación de quemaduras, la frecuencia de los cambios del apósito puede variar de dos veces por día a aproximadamente una vez por semana.

Se han propuesto una serie de estrategias de tratamiento de quemaduras no convencionales. Una descripción no exhaustiva de algo de la técnica sigue a continuación.

35 El documento WO/2001/021195 describe un apósito que incluye fibrina preformada que funciona como una cubierta no adhesiva de una superficie de la piel quemada, funcionando del mismo modo como un vehículo de administración de compuestos farmacéuticos que están atrapadas dentro del coágulo de fibrina.

J. Travis (Science News Online 155 (25); 19de junio de, de 1999) describe vendajes de fibrina producidos por Martin MacPhee en el Laboratorio Holland de la Cruz Roja Norteamericana en Rockville, Md. Los vendajes emplean una tela hecha de material biodegradable saturado con trombina, fibrinógeno, y el factor de 13 purificado a partir de sangre humana. Los vendajes son frágiles hasta que se mojan, y luego se vuelven flexibles

40 El documento US 2002/0146446 describe un apósito quirúrgico médico que utiliza un sándwich de dos matrices extracelulares cultivadas en un material compuesto, compuesto de sulfato de gelatina-fibronectina-heparan. El medio de cultivo utilizado para cultivar los dos tipos de células (fibroblastos dérmicos y células endoteliales microvasculares dérmicas que forman la segunda matriz extracelular) es el medio acondicionado (CM) obtenida a partir de células endoteliales umbilicales humanas utilizadas para formar la primera matriz extracelular. Todas las células del cultivo de tejidos se separan dejando su matriz acelular secretada detrás e intacta. Este CM puede neutralizar también la enzima DISPASA utilizada comercialmente para separar láminas epiteliales cultivadas ("autoinjertos epiteliales cultivados '(CEA)) a partir de la matriz en la que las células epidérmicas humanas, que forman las láminas se cultivan. Los CEA se utilizan clínicamente en la manipulación de heridas y quemaduras.

50 Henderson L. *et al*, divulga la curación de quemaduras superficiales en la piel con un apósito de gel de plaquetas autólogo. (Ear, Nose & Throat Journal, 2003).

El documento US 3723244 describe un procedimiento de producción de fibrina en forma de láminas mediante la centrifugación de una dispersión acuosa de fibrina en la que moléculas de fibrina monoméricas se combinan mediante la polimerización para formar hebras de fibrina. La etapa de centrifugación se realiza en un recipiente que

tiene una pared para la interceptación de las partículas sometidas a aceleración centrífuga en su interior y a una velocidad que granula en dicha pared las hebras de fibrina resultantes de la polimerización, de modo que las hebras granuladas se interbloquean para formar una lámina que se recupera de la pared. La dispersión acuosa puede ser plasma sanguíneo y las láminas de fibrina resultantes se describen como útiles como un vendaje para quemaduras.

- 5 El documento US 6.521.265 describe un procedimiento de promoción de la curación de una herida sangrante que incluye mezclar un compuesto sustancialmente anhidro de un ferrato de sal, que se hidrata en presencia de agua para producir Fe^{+++} y oxígeno, en combinación con un material de intercambio catiónico insoluble, con una cantidad de un medio acuoso tal como sangre entera tomada directamente de la herida con agua desionizada; cloruro de sodio acuoso; gelatina disuelta acuosa; metacel carboxi acuosa; y una solución acuosa de hidratos de carbono para formar una pasta unttable. La pasta se aplica a la herida en un tiempo de trabajo corto para promover la coagulación de la sangre. De acuerdo con la descripción, la presencia de oxígeno, reduce sustancialmente el nivel de bacterias, virus y hongos en la herida a medida que se forma una capa protectora sobre la herida.

- 10 El documento US 4.347.841 describe un apósito biológico para heridas de quemaduras formadas mediante la eliminación de la hemoglobina libre de un concentrado de glóbulos rojos que se somete a hemólisis. El apósito contiene estroma, elementos subcelulares y proteína precipitada a partir del concentrado de glóbulos rojos humano liberado de la hemoglobina y que se puede utilizar en una forma en forma de polvos o capa con, si se desea, un soporte apropiado.

- 15 El documento US 2007/0275461 y el documento US 2004/0171145 describen dermis artificial obtenida a partir del plasma con plaquetas y fibroblastos humanos. El plasma con plaquetas se obtiene del fraccionamiento de la sangre entera del paciente por centrifugación liviana, y los fibroblastos humanos se obtienen de una biopsia de piel. La coagulación se obtiene mediante la adición de calcio. La dermis artificial se describe como para proporcionar el crecimiento rápido de los queratinocitos sembrados en su superficie para construir una piel artificial que puede ser fácilmente trasplantada. Grandes áreas de dermis artificial se describen como obteniéndose a partir de una pequeña biopsia de la piel y cantidades mínimas de plasma con plaquetas. La piel artificial se describe como útil para el tratamiento de grandes quemaduras, úlceras crónicas de la piel, o para utilizarse con células alteradas genéticamente, como un vehículo para la terapia génica.

- 20 El documento US 2004/0124564 describe un procedimiento para la preparación de una lámina compuesta de proteínas de fibrina-fibrilar modificadas químicamente (FFP) de uso médico y el material compuesto de FFP preparado de esta manera. De acuerdo con la descripción, la lámina de FFP encuentra uso potencial como una ayuda de apósito en el tratamiento de diversas heridas externas, incluyendo heridas de quemaduras.

- 25 También se describe el uso de componentes sanguíneos purificados o fraccionados en otros contextos médicos. Una descripción no exhaustiva algo de la técnica sigue a continuación. El documento US4035483 divulga composiciones antisépticas quirúrgicamente activas para el control de heridas obtenidas mediante la mezcla de una proteína y una solución acuosa de un hipoclorito. Preferentemente, el producto de reacción de ambos se impregna en o se reviste sobre un soporte de lámina. La proteína utilizada puede ser sangre entera.

- 30 Khalafi *et al.* (Eur J Surg Cardiothoracic 2008; 34: 360-364.) describe la aplicación de plasma rico en plaquetas y obre en plaquetas para reducir significativamente los casos de infección de heridas en el pecho, de drenaje torácico, y de drenaje de heridas en las piernas en injertos coronarios.

- 35 Medtronic, Inc., Minneapolis, MV; Estados Unidos produce dispositivos para el procesamiento de sangre autóloga para concentrar el plasma rico en plaquetas en un gel de plaquetas autólogas para su uso en la cirugía para mejorar la curación del tejido.

Algunos de los productos de cuidado de heridas disponibles en el mercado utilizan fracciones de la sangre y/o factores aislados de sangre.

- 40 Por ejemplo, se han encontrado que una variedad de factores de crecimiento desempeñan un papel en el procedimiento de curación de heridas, incluyendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento de transformación, y el factor crecimiento similar a la insulina. Diversas tecnologías de curación de heridas basadas en sangre fraccionada o factores de crecimiento derivados de la sangre están disponibles en el mercado.

- 45 Una de las tecnologías disponibles en el mercado emplea técnicas de ADN recombinante para crear factores de crecimiento purificados. El Gel REGANEX™ (fabricado por Systagenix Wound Management) es un gel tópico, que contiene el ingrediente activo becaplermina con una actividad similar a la de las plaquetas humanas derivadas del factor de crecimiento (PDGF). Este factor de crecimiento recombinante se produce mediante tecnología de ADN recombinante mediante la inserción del gen para la cadena B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en *Saccharomyces cerevisiae*.

- 50 Otra tecnología disponible en el mercado emplea plasma rico en plaquetas (PRP). El PRP se aísla de la sangre entera por centrifugación. El PRP autólogo contiene una mezcla de los factores de crecimiento activados citocinas y quimiocinas, con potencial reducido para la respuesta inmune. La exposición de PRP a una solución de trombina y

cloruro de calcio da como resultado la polimerización de fibrina a partir de fibrinógeno, creando un gel de plaquetas que se puede aplicar a las heridas. El PRP ofrece a la herida factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas que promueven la angiogénesis y regulan el crecimiento celular y la formación de nuevo tejido. AutoloGel™ (fabricado por Cytomedix, Inc.) y SafeBlood® (fabricado por SafeBlood Technologies) son dos productos derivados de la sangre autóloga que se pueden preparar a pie de cama para su aplicación inmediata. Tanto el AutoloGel™ como el SafeBlood® se han comercializado específicamente para la curación de heridas.

Otra tecnología disponible en el mercado emplea pegamentos o sellantes de fibrina con hemostasia y propiedades de pegado que mejoran la curación de heridas. Los pegamentos de fibrina comerciales se crean a partir de donantes humanos homólogos agrupados. Tisseel™ (fabricado por Baxter) es un ejemplo de sellante de fibrina disponible en el mercado. La acción de este producto simula supuestamente las características clave del procedimiento fisiológico de cierre de la herida. El producto contiene una solución de fibrinógeno aprotinina altamente concentrado, que entre otros ingredientes contiene Factor XIII, y una solución de trombina y cloruro de calcio se aplica al área de la herida, donde la mezcla se coagula. La presencia de Factor XIII hace que la fibrina se reticule, lo que da al coágulo resistencia adicional.

Sumario de la invención

La invención proporciona un procedimiento de preparación de un apósito para heridas como se reivindica en la reivindicación 1, un procedimiento para producir un apósito biológico para heridas de acuerdo con la reivindicación 4, y un banco de apósitos biológicos para heridas de acuerdo con la reivindicación 7.

En la presente memoria se describe un tratamiento de lesiones de la piel utilizando sangre coagulada. La sangre coagulada se forma de modo que se puede aplicar sobre una lesión en la piel.

La expresión "sangre entera" se debe entender como refiriéndose a (i) la sangre tomada de la circulación venosa o arterial; (ii) la sangre que no ha sido modificada excepto por la adición de un anticoagulante u otros químicos o sustancias biológicas o por la eliminación de uno o más componentes de la sangre (por ejemplo, una porción del plasma), donde dicha modificación no afecta a sus características físicas o químicas generales; o (iii) la sangre que contiene todos sus componentes, como los glóbulos rojos y blancos, plaquetas y más en particular, todos los componentes necesarios para la formación de coágulos. Cabe señalar que la expresión "sangre entera" no significa necesariamente que la sangre que se utiliza como fuente para la sangre coagulada es idéntica a la sangre extraída de un individuo. A veces, la sangre retirada podrá ser objeto de procedimientos tales como diálisis, paso a través de una columna, etc., para eliminar ciertos componentes, por ejemplo, aquellos indeseados, antes de su uso en la terapia de las lesiones de la piel de acuerdo con la invención (un ejemplo es el la eliminación de ciertos componentes inmunogénicos o anti-sueros en el caso de la utilización de sangre no autóloga). También, de acuerdo con algunas realizaciones ejemplares de la invención la sangre entera se complementa con uno o más aditivos. Los aditivos incluyen, pero no se limitan a aditivos que influyen la coagulación, aditivos que cambian las propiedades físicas y aditivos médicamente activos.

Las lesiones de la piel que pueden tratarse de acuerdo con la invención incluyen todo tipo de lesiones de la piel donde se pierde piel o donde los objetivos de la terapia son, entre otros, el re-crecimiento de la piel. Estas incluyen tanto heridas no hemorrágicas (por ejemplo, quemaduras y úlceras) y heridas sangrantes (por ejemplo, abrasiones).

Los aditivos que influyen la coagulación incluyen, pero no se limitan a anticoagulantes, anti-anticoagulantes y/o aceleradores de coagulación (tales como fosfolípidos cargados negativamente (PL) y agentes de contacto superficial como Caolín). Para evitar la coagulación incontrolada de la sangre, uno o más anticoagulantes (por ejemplo EDTA) se pueden añadir a la sangre inmediatamente después de la extracción desde un individuo. Los anticoagulantes se incluyen, de hecho, normalmente en tubos de ensayo u otros recipientes donde se recolecta la sangre. Además, la sangre almacenada en un banco de sangre incluye normalmente uno o más anticoagulantes. De acuerdo con algunas realizaciones ejemplares de la invención para contrarrestar el anticoagulante en toda la preparación de sangre, se añade un anti-anticoagulante para permitir la coagulación de la sangre. Por ejemplo, iones de Ca^{2+} se pueden utilizar para contrarrestar la actividad de EDTA. Estos iones se pueden añadir como una solución de una sal de calcio soluble. Puesto que el tipo y la cantidad de anticoagulante que se ha añadido a una unidad de sangre entera son normalmente conocidos, es posible seleccionar un anti-anticoagulante adecuado y calcular una cantidad apropiada para su uso.

Los aditivos que cambian las propiedades físicas incluyen, pero no se limitan a, diluyentes (por ejemplo, soluciones salinas), endurecedores (por ejemplo, minerales), plastificantes y elastizadores.

Los aditivos médicamente activos incluyen pero no se limitan a los antibióticos, antisépticos, analgésicos, factores de crecimiento, citoquinas, enzimas, hormonas, células, agentes anti-inflamatorios y muchos otros que puedan proporcionarse por los expertos en la materia del cuidado de heridas.

El uso de aditivos médicamente activos y que cambian las propiedades físicas se describe en los documentos US 2004/0147024, US 5.610.148 y US 5.629.287.

Algunos ejemplos divulgados en la presente memoria se basan en la comprensión de que un coágulo de sangre contiene naturalmente las propiedades físicas, químicas y funcionales que lo convierten en un apósito efectivo para cubrir la herida y promover la curación.

- 5 Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que la sangre entera coagulada debe abordar necesariamente todos los requisitos básicos de un apósito para heridas. Opcionalmente, mediante el uso de un coágulo de sangre autólogo (un coágulo de la sangre entera extraída del paciente) cualquier posibilidad de una respuesta inmune se reduce en gran medida. Opcionalmente, cuando se utiliza un coágulo de sangre homóloga (es decir, un coágulo de la sangre entera extraída de un individuo diferente, por ejemplo obtenida a partir de un banco de sangre), el potencial para la respuesta inmune se puede reducir mediante la tipificación serológica.
- 10 Un aspecto de algunas realizaciones de la invención se refiere a la formación de una capa o lámina de sangre entera coagulada en una estructura de soporte. De acuerdo con algunas realizaciones ejemplares de la invención la estructura de soporte se incrusta dentro de la sangre entera coagulada. Como alternativa o adicionalmente, la estructura de soporte es externa al coágulo. De acuerdo con algunas realizaciones ejemplares de la invención, la estructura de soporte ayuda en la transferencia de la sangre entera coagulada de un lugar a otro y/o contribuye a un cambio en el comportamiento de contracción durante la coagulación y/o contribuye a un cambio en las propiedades físicas del coágulo de sangre entera resultante (por ejemplo, aumento de la resistencia). Un ejemplo de una estructura de soporte es una capa de un material fibroso tal como gasa.
- 15 Se divulga la formación simultánea de una pluralidad de coágulos de sangre entera estériles de una fuente de sangre entera. De acuerdo con algunas realizaciones ejemplares de la invención se forman los coágulos en láminas de un espesor deseado. Opcionalmente, las láminas de la pluralidad tienen un espesor común. Opcionalmente, las láminas se forman en una estructura de soporte.
- 20 Se divulga una lámina estéril de sangre entera coagulada que incluye un anticoagulante y suficiente anti-anticoagulante para permitir la coagulación. La lámina estéril de sangre coagulada se puede proporcionar en un paquete o envoltorio que mantiene su esterilidad durante el almacenamiento y/o de tránsito. También el coágulo de sangre se forma normalmente como una lámina, la invención no se limita a los coágulos de sangre formados en una forma tan específica.
- 25 Se divulga la aplicación de la sangre entera coagulada a una superficie de la piel de un sujeto. La sangre entera coagulada se puede aplicar como parte de un apósito húmedo o un apósito seco. La superficie de la piel incluye una herida (por ejemplo, úlcera o laceración) y/o una superficie de piel quemada.
- 30 Opcionalmente, la sangre entera coagulada se aplica con un soporte interno y/o externo, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria y a continuación. La sangre entera coagulada se puede cubrir con un apósito convencional. La expresión "apósito convencional" como se utiliza en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas se refiere a una cubierta que incluye una o más capas, cada una seleccionada independientemente de una capa no adhesiva, una capa absorbente (por ejemplo, gasa y/o tela no tejida o malla similar) y una capa de adhesivo (por ejemplo, cinta).
- 35 Un aspecto de algunas realizaciones de la invención se refiere a un banco de apósitos preparados a partir de unidades de sangre entera coagulada. De acuerdo con algunas realizaciones ejemplares de la invención, los apósitos son catalogados por identificadores únicos correspondientes a las unidades. Opcionalmente, los identificadores únicos se utilizan para hacer coincidir un sujeto con uno o más apósitos biológicos específicos.
- 40 De manera opcional, la información correspondiente se proporciona como datos legibles por máquina asociados con dicho identificador único en una tabla de consulta en una memoria de un ordenador. Los datos legibles por máquina incluyen, pero no se limita a, los datos relacionados con el tipo de sangre, datos de compatibilidad cruzada, datos de haplotipos HLA y otros datos genéticos. Como alternativa o adicionalmente, la información correspondiente se ofrece como una alícuota de sangre sin coagular reservada de cada una de dichas unidades de sangre entera a partir de las que se prepara cada una de dichas placas en dicha pluralidad, cada alícuota asociada catalogada por dicho identificador único. "Tipo de sangre" como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier caracterización de antígenos y/o anticuerpos y no se limita a A; B; AB; O y Rh^{+/+}.
- 45 Un aspecto de algunas realizaciones de la invención se refiere a la difusión de una cantidad, por ejemplo, una unidad de sangre entera obtenida de un donante o banco de sangre sobre un área, por ejemplo, 50-10.000 cm², y que permite que la sangre forme un coágulo. La esterilidad de la sangre se puede mantener durante la coagulación. Como fácilmente se puede entender, las medidas del área indicadas anteriormente son ejemplares y que pueden ser más pequeñas o más grandes. Puede, a veces, ser un intercambio entre la resistencia de la lámina resultante a coagular la sangre y el área, con áreas más grandes produciendo la formación de coágulos débiles. Una capa de soporte contribuye a la resistencia que permite la difusión de la sangre en un área mayor. En general, el espesor de la sangre se reduce durante la formación de coágulos por la supuración o sudoración de plasma del coágulo durante y/o después de la formación. Por ejemplo, una capa de 3 mm de sangre entera produce un coágulo con un espesor de aproximadamente 1,2 mm después de 1 día *in vitro*. De acuerdo con algunas realizaciones ejemplares de la invención se añade un iniciador de coagulación antes de la difusión. Opcionalmente, se selecciona el iniciador de
- 55

coagulación para neutralizar la actividad de un anticoagulante en la sangre.

Un aspecto de algunas realizaciones de la invención se refiere al uso de la sangre entera fraccionada en la fabricación de un apósito de sangre para heridas.

5 En la presente memoria se describe la aplicación de la sangre entera a un área de piel en necesidad de tratamiento para formar un coágulo de sangre sobre la misma. El área se puede cubrir por una capa absorbente. Opcionalmente, la capa absorbente incluye una malla tal como una gasa y/o de la tela no tejida. Opcionalmente, el coágulo se cubre después de la formación. La piel quemada se puede tratar. Opcionalmente, la esterilidad de la sangre se mantiene durante la aplicación.

10 Un aspecto de algunas realizaciones de la invención se refiere a cortar rodajas o láminas de sangre entera coagulada de un bloque de sangre entera coagulada. La expresión "bloque", como se utiliza en la presente memoria descriptiva se debe interpretar en sentido amplio para incluir todas las formas tridimensionales.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, el adjetivo "retirable" indica que el objeto descrito se ha diseñado para permitir su retirada por un usuario medio sin un esfuerzo excesivo. Retirable incluye tanto los elementos que se retiran sin herramientas, como los que requieren el uso de una herramienta (por ejemplo tijeras, cuchillos o abridores). En algunas realizaciones ejemplares de la invención, las herramientas para la retirada se proporcionan con sus partes retirables coincidentes en la forma de una lata de sardinas con una "llave" adjunta.

20 Se divulga un dispositivo para la coagulación de sangre entera y que forma la misma en un coágulo para su uso en el tratamiento de una lesión de la piel. El dispositivo tiene un receptáculo de sangre para recibir la sangre, el receptáculo se forma de una manera para impartir una forma final deseada, por ejemplo, plana, en el coágulo de sangre formado.

De manera opcional, la información de compatibilidad cruzada se ofrece como datos legibles por máquina asociados con el identificador único en una tabla de consulta en una memoria de un ordenador.

25 De manera opcional, la información de compatibilidad cruzada se ofrece como una alícuota de sangre sin coagular reservada de cada una de las unidades de sangre entera a partir de las que se preparó cada una de las placas en la pluralidad, cada alícuota asociada catalogada por el identificador único.

Opcionalmente, al menos algunas de las placas estériles de la sangre entera coagulada comprenden una estructura de soporte externo en contacto con la placa.

Opcionalmente, al menos algunas de las placas estériles de la sangre entera coagulada comprenden una malla incrustada en la placa.

30 Opcionalmente, el procedimiento comprende la adición de un iniciador de coagulación antes de la difusión. Opcionalmente, se selecciona el iniciador de coagulación para neutralizar una actividad de un anticoagulante en la unidad.

Opcionalmente, la difusión se produce en un recipiente revestido con una capa que evita el contacto entre la sangre entera y el receptáculo.

35 Opcionalmente, la difusión es en una malla que queda oculta en el coágulo.

Opcionalmente, la matriz se adhiere al coágulo y contribuye a una transferencia de la misma.

Opcionalmente, la matriz se construye de al menos un material seleccionado del grupo que consiste en nylon, un poliuretano, una tela tejida, una tela no tejida, silicio, caucho y organosilicona.

40 Algunas realizaciones ejemplares de la invención se refieren al uso de sangre entera no fraccionada en la fabricación y/o preparación de un apósito para heridas.

Se divulga un procedimiento para preparar placas de sangre entera coagulada, comprendiendo el procedimiento: (a) proporcionar un bloque de sangre entera coagulada en un aparato de corte; (b) hacer avanzar el bloque progresivamente; (c) cortar una porción del bloque; y (d) repetir como alternativa (b) y (c).

45 Opcionalmente, el procedimiento incluye cortar una porción del coágulo de dimensiones adecuadas para colocar un apósito sobre una herida específica.

Opcionalmente, el procedimiento incluye proporcionar una estructura de soporte sobre la que se forma dicho coágulo.

50 A menos que se defina lo contrario, todas las expresiones técnicas y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados, los

procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria se pueden utilizar en la implementación de la presente invención. En caso de conflicto, la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones, prevalecerá. Todos los materiales, procedimientos, y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "que comprende(n)" y "que incluye(n)" o variantes gramaticales de los mismos se deben tomar como especificando la inclusión de las características, números enteros, acciones o componentes indicadas sin perjuicio de la adición de una o más características, números enteros, acciones, componentes o grupos de los mismos. Esta expresión es más amplia e incluye las expresiones "que
10 consiste en y" que consiste esencialmente en tal como se define por el Manual del Procedimiento de Examen de Patentes de la Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos.

La frase "que consiste esencialmente en" o variantes gramaticales de la misma cuando se utilizan en la presente memoria se deben tomar como especificando las características, números enteros, etapas o componentes mencionados, pero no excluyen la adición de una o más características, números enteros, etapas, componentes o grupos de los mismos, pero solo si las características, números enteros, etapas, componentes o grupos de los
15 mismos no alteran materialmente las características básicas y nuevas de la composición, dispositivo o procedimiento reivindicado.

El término "procedimiento" se refiere a las maneras, medios, técnicas y procedimientos para realizar una tarea dada incluyendo, pero no limitado a, modales, medios, técnicas y procedimientos bien conocidos por, o fácilmente desarrollados a partir de formas, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los profesionales de la
20 arquitectura y/o informática.

Los porcentajes (%) de los productos químicos suministrados normalmente como polvos o cristales (por ejemplo, EDTA y sales de calcio) son W/V (peso por volumen) a menos que se indique lo contrario. Los porcentajes (%) de los productos químicos suministrados normalmente como líquidos (por ejemplo, soluciones y/o diluyentes de citrato) son V/V (volumen por volumen) a menos que se indique lo contrario.

25 **Breve descripción de los dibujos**

Para entender la invención y para ver cómo se puede llevar a la práctica, se describirán a continuación realizaciones, a modo de ejemplo no limitativo, con referencia a las figuras adjuntas. En las figuras, estructuras idénticas y similares, elementos o partes de los mismos que aparecen en más de una Figura se etiquetan generalmente con referencias iguales o similares en las figuras en las que aparecen. Las dimensiones de los
30 componentes y características mostradas en las figuras se escogen principalmente por conveniencia y claridad de presentación y no están necesariamente a escala. Las figuras adjuntas son:

la **Figura 1A** es un diagrama esquemático de un paciente tratado;

la **Figura 1B** es un diagrama de flujo simplificado que ilustra un procedimiento de tratamiento ejemplar;

la **Figura 1C** es un diagrama de flujo simplificado que ilustra la adaptación de procedimientos de tratamiento
35 ejemplares a las modalidades de tratamiento existentes;

la **Figura 2** es un diagrama de flujo simplificado que ilustra otro procedimiento de tratamiento ejemplar;

la **Figura 3** es un diagrama esquemático que ilustra un artículo de fabricación;

la **Figura 4** es una representación esquemática de un banco de coágulos de acuerdo con algunas realizaciones ejemplares de la invención;

la **Figura 5** es un diagrama de flujo simplificado que ilustra un procedimiento de fabricación ejemplar de acuerdo con algunas realizaciones ejemplares de la invención;

las **Figuras 6A y 6B** son diagramas esquemáticos que ilustran un aparato para la formación de coágulos en dos estados de operación diferentes;

la **Figura 7** es un diagrama esquemático que ilustra otro aparato para la formación de coágulos;

la **Figura 8** es un diagrama esquemático que ilustra otro aparato para la formación de coágulos;

la **Figura 9** es un diagrama de flujo simplificado que ilustra un procedimiento ejemplar de preparación de placas de sangre entera coagulada de acuerdo con algunas realizaciones ejemplares de la invención;

la **Figura 10** es una fotografía de una lámina ejemplar de sangre entera coagulada en un receptáculo;

la **Figura 11** es una fotografía de una lámina ejemplar de sangre entera coagulada con estructura de soporte integrada soportada por la estructura de soporte;

la **Figura 12** es una fotografía de láminas ejemplares de sangre entera coagulada con estructura de soporte integrada que representa el drenaje de líquido de las placas;

la **Figura 13** es una fotografía de una lámina ejemplar de sangre entera coagulada;

la **Figura 14** es una fotografía que ilustra la lámina de la Figura 13 aplicada a una superficie de la piel;

la **Figura 15** es una fotografía que ilustra la exudación de líquidos de la lámina de la Figura 13 después de la aplicación a la superficie de la piel en la Figura 14; y

las **Figuras 16A, 16B y 16C** son una serie de fotografías que ilustran la adhesión de la lámina completamente seca a la piel (Figura 16A) y su retirada por desprendimiento (Figuras 16B y 16C);

las **Figuras 17A, 17B, 18A, 18B, 19A, 19B, 20A, 20B, 21A, 21B, 22A, 22B, 23A y 23B** son una serie de fotografías que ilustran heridas antes del tratamiento (panel A en cada Figura) y después del tratamiento con un
60

apósito para heridas (panel B en cada Figura).

Descripción detallada de realizaciones ejemplares

5 En la presente memoria se describen anticoagulantes y anti-anticoagulantes que contienen sangre entera, la preparación de sangre entera coagulada y/o el uso de sangre entera coagulada en el tratamiento y/o preparación médica de apósitos para heridas y/o el almacenamiento de sangre entera coagulada para su uso como un apósito para heridas y/o aparato para la preparación de sangre entera coagulada y/o la aplicación de sangre entera a la piel para la formación *in situ* de coágulos.

En concreto, los apósitos para heridas se pueden utilizar para quemaduras y/u otras lesiones de la piel (por ejemplo, úlceras crónicas).

10 Los principios de la preparación y el uso de apósitos biológicos para heridas y/o el aparato para producirlos y/o los bancos para almacenarlos y/o los procedimientos de tratamiento médico que se basan en los mismos se pueden entender mejor con referencia a los dibujos y descripciones adjuntas.

15 Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, se ha de entender que la invención no se limita en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de implementarse o realizarse de diversas maneras. Además, se debe entender que la fraseología y terminología empleada en la presente memoria tiene la finalidad de describir y no se debe considerar como limitantes.

Visión general:

20 La Figura 1A representa un ejemplo 100 en el que una porción de una superficie 110 de la piel de un sujeto se cubre con placas 120 de sangre entera coagulada preparada específicamente para ese fin. Las placas 120 se pueden proporcionar en combinación con una estructura 130 de soporte y/o cubrirse con un apósito 140 convencional. La porción de la superficie 110 de la piel de la materia cubierta por las placas 120 se selecciona debido a que requiere tratamiento (por ejemplo, una superficie de la piel quemada).

25 Las placas 120 dispuestas en la superficie 110 de la piel forman un apósito biológico, si se preparan con antelación, o pueden formarse *in situ* en el área de tratamiento. Los diversos ejemplos que se describen a continuación están unidos por la idea de que las heridas no sangrantes (por ejemplo, úlceras y/o quemaduras) se ven privadas de los beneficios curativos naturales de una costra formada por la coagulación de la sangre.

Procedimiento de tratamiento ejemplar:

30 La Figura 1B es un diagrama de flujo simplificado de un procedimiento de tratamiento que se representa generalmente con el número de referencia 102. El procedimiento 102 de tratamiento ejemplar incluye la preparación 122 una o más placas de sangre entera coagulada y la aplicación 132 de la placa o placas a un área de piel de un sujeto en necesidad de la misma (por ejemplo, un área quemada o ulcerada).

35 Una capa de soporte se puede adherir 142 a la lámina o láminas. Opcionalmente, la adhesión 142 puede ocurrir durante o después de la preparación 122. La capa de soporte se puede construir para ser permeable a gases y/o impermeable a líquidos.

40 Como alternativa o adicionalmente, el procedimiento 102 incluye la incorporación de una malla 152 dentro de la placa. Por lo general, la incrustación se realiza poniendo en contacto la sangre entera líquida con la malla y permitiendo que la sangre se coagule en la malla. Las mallas adecuadas para este fin incluyen, pero no se limitan a las mallas de tejido (por ejemplo, una gasa o tejidos de gasa o no tejido). Opcionalmente, la malla contiene fibras de algodón y/o de celulosa.

45 Como alternativa o adicionalmente, el procedimiento 102 incluye cubrir la lámina 162 con un apósito convencional. El apósito convencional puede servir para mantener la placa en su lugar y/o preservar la integridad de la lámina y/o absorber los exudados que emanan de la lámina y/o evitar la fuerza de contacto indeseada (por ejemplo, de colocación y/o retirada de ropa). Opcionalmente, el apósito convencional se cambia con una misma frecuencia o mayor frecuencia que la propia lámina.

La esterilidad de la lámina se puede mantener desde la formación de la misma hasta su aplicación a la superficie de la piel. La esterilidad se puede mantener por cualquier medio conocido en la técnica.

50 Las láminas se pueden preparar mediante la difusión de la sangre entera en una capa con un espesor de 1 mm, opcionalmente 2 mm, opcionalmente 3 mm o espesores intermedios o mayores o menores. Una lámina de sangre coagulada será normalmente menos gruesa que la capa original de la sangre líquida.

Escenarios de uso ejemplares

La Figura 1C es un diagrama 104 de flujo simplificado que ilustra la adaptación de los procedimientos 102 de tratamiento ejemplares a las modalidades de tratamiento 170 en húmedo y tratamiento 170 en seco existentes.

5 En algunos usos ejemplares, un modo 170 de tratamiento en húmedo se aplica y la lámina se mantiene húmeda 124 después de la preparación 124. La lámina húmeda se aplica 132 después a un área de piel en necesidad de tratamiento. Opcionalmente, la lámina se cubre 134 con un apósito húmedo y/o se cubre 136 con una barrera de retención de humedad.

10 En algunos usos ejemplares, se aplica un modo 180 de tratamiento en seco y la lámina se seca 126 después de la preparación 124. La lámina seca se aplica 132 después a un área de piel en necesidad de tratamiento. Opcionalmente, la lámina se cubre 133 con un apósito absorbente que opcionalmente se puede cambiar para que el fluido 135 continúe siendo extraído de la lámina.

15 Opcionalmente, se emplea una mezcla de las modalidades de tratamiento 170 en húmedo y tratamiento 170 en seco. En algunos usos ejemplares, la lámina se mantiene húmeda 124, se aplica 132 y cubre 133 con un apósito absorbente. En algunas realizaciones ejemplares de la invención, la lámina se seca 126, se aplica 132 y cubre con un apósito 136 húmedo.

Procedimiento de tratamiento ejemplar adicional:

20 La Figura 2 es un diagrama de flujo simplificado de otro procedimiento de tratamiento que se representa generalmente con el número de referencia 200. El procedimiento 200 ejemplar representado incluye la aplicación 210 de un absorbente que cubre un área de piel de un sujeto en necesidad de tratamiento (por ejemplo, un área quemada). Opcionalmente, se enmascaran los bordes de la cubierta absorbente. Opcionalmente, la cubierta absorbente incluye una malla tal como, por ejemplo, una gasa o una estopilla. Opcionalmente la malla contiene fibras de algodón y/o celulosa.

25 El procedimiento 200 representado incluye la aplicación 220 de sangre entera a la cubierta absorbente y permitir 230 que la sangre entera se coagule para formar una lámina de sangre entera coagulada. Si opcionalmente; se ha empleado enmascaramiento, el mismo puede servir para dirigir la sangre aplicada preferentemente hacia la cubierta absorbente aplicada.

En algunos procedimientos ejemplares, el procedimiento 200 incluye cubrir la lámina con un material permeable a gases (por ejemplo, nylon y/o algodón y/o poliuretano).

30 En algunos procedimientos ejemplares, el procedimiento 200 incluye cubrir la lámina con un apósito convencional como se ha descrito anteriormente para el procedimiento 102 y/o para mantener la esterilidad de la sangre durante la aplicación 220.

Artículo de fabricación ejemplar:

35 La Figura 3 es una representación esquemática de un artículo de fabricación representado en general con el número de referencia 300 visto en sección transversal. El artículo de fabricación ejemplar representado incluye una lámina 120 estéril de sangre entera coagulada. La lámina 120 incluye un material anticoagulante dispersado a través de la lámina y una cantidad suficiente de inhibidor de anticoagulante para permitir la formación de la lámina a pesar de la presencia del anticoagulante. Los anticoagulantes e inhibidores adecuados para su uso en diversas realizaciones de la invención se describen a continuación.

40 La lámina 120 se proporciona en el material 350 de envasado. El material 350 de envasado ejemplar representado incluye un sello 355 rasgable que permite la eliminación de la lámina 120 sin necesidad de herramientas. El material 350 de envasado se puede proporcionar como un sobre, una envoltura retráctil, un envase de burbujas, un tubo sellado, un frasco, un bote o cualquier otra forma de envase conocido en la técnica.

45 De acuerdo con diversas disposiciones ejemplares, artículo de fabricación 300 se puede proporcionar a la temperatura ambiente, o proporcionarse bajo refrigeración. Las temperaturas de refrigeración adecuadas incluyen 12, 8, 4, 0, -20, -70 y -170 grados centígrados y temperaturas intermedias.

De acuerdo con diversas disposiciones ejemplares, la lámina 120 puede incluir un soporte interno (por ejemplo, malla 330) y/o un soporte 340 externo. Opcionalmente, este soporte o soportes se pueden utilizar para facilitar la retirada de la lámina 120 de material 350 de envasado y/o la transferencia de la lámina 120 a un lugar de tratamiento deseado y/o la colocación de la lámina 120 en el lugar deseado.

50 Como alternativa o adicionalmente, el soporte interno (por ejemplo, malla 330) y/o el soporte 340 externo pueden contribuir a las propiedades estructurales de la lámina 120. Las propiedades estructurales incluyen resistencia a la tracción, resistencia a la compresión y elasticidad.

Instalaciones de almacenamiento ejemplares:

La Figura 4 es una representación esquemática de una instalación de almacenamiento representada generalmente con el número de referencia 400. La instalación 400 de almacenamiento ejemplar representada sirve como un banco de apósitos biológicos. La instalación 400 incluye una pluralidad de láminas 120 estériles de sangre entera coagulada, cada lámina catalogada por un identificador único (representado como un código 450 de barras) que indica una unidad de sangre entera de la que se deriva la lámina. En el ejemplo representado, las placas 120 se almacenan en grupos de 5 dentro de recipientes 410 de almacenamiento. En la realización representada, 5 láminas preparadas a partir de una sola unidad de sangre entera se almacenan juntas y se tratan opcionalmente como un único elemento de inventario o 5 artículos de inventario separados. Un recipiente 410 de almacenamiento único se representa en la inserción en detalle. En otras realizaciones de la invención, las láminas 120 se almacenan y catalogan individualmente.

La instalación 400 de almacenamiento incluye un compartimento 440 refrigerado que contiene láminas 120. En la realización representada, 8 recipientes 410 se representan en el compartimento 440 de manera que un total de 40 láminas se almacenan. Esta representación simplificada es únicamente en aras de la claridad de la presentación. En la práctica, el número de láminas 120 almacenadas, rondaría probablemente los miles, decenas de miles o incluso cientos de miles.

De manera opcional, la temperatura de almacenamiento y el número de láminas almacenadas se relacionan entre sí. Por ejemplo, las temperaturas de almacenamiento más bajas pueden contribuir a una mayor "vida útil" de las láminas 120 lo que, a su vez, contribuye a una capacidad de acumular un mayor número de láminas antes de que se deban desechar.

Opcionalmente, el almacenamiento de un mayor número de láminas contribuye a una mayor probabilidad de encontrar una coincidencia adecuada para un sujeto en necesidad de tratamiento.

La instalación 400 de almacenamiento ejemplar representada incluye información de compatibilidad cruzada para cada una de las unidades de sangre entera de la que se forman las láminas 120.

En algunas realizaciones ejemplares de la invención, se proporciona información de compatibilidad cruzada como datos legibles por máquina asociados con dicho identificador único (por ejemplo, código 450 de barras) en una tabla de consulta en una memoria 474 de un ordenador 470. Opcionalmente, el usuario introduce información de compatibilidad cruzada de un sujeto en necesidad de tratamiento a través de una interfaz de usuario adecuada (por ejemplo, el teclado 472) y se le presenta una lista de ubicaciones (por ejemplo, en la pantalla 480) en el compartimento 440 refrigerado, donde las láminas adecuadas 120 se pueden encontrar. Las láminas adecuadas en este caso son "teóricamente adecuadas" basándose en un panel de marcadores. Opcionalmente, un lector de código de barras (no mostrado) se utiliza para verificar la identidad de las láminas 120 en recipientes 410 específicos.

Como alternativa o adicionalmente, la información de compatibilidad cruzada se ofrece como una alícuota 430 de sangre sin coagular reservada de cada una de dichas unidades de sangre entera de las que se ha reparado de cada una de las láminas 120. Las alícuotas 430 se pueden asociar con el identificador 450 único. En la realización representada, la asociación es la asociación física resultante del almacenamiento en un mismo recipiente 410 como láminas 120 correspondientes. De acuerdo con estas realizaciones, la compatibilidad cruzada se comprueba prácticamente mediante la mezcla de sangre sin coagular a partir de un receptor potencial de una muestra extraída de la alícuota 430 como se conoce en la técnica.

Opcionalmente, las láminas teóricamente adecuadas se comprueban prácticamente antes de su uso real en un sujeto.

Opcionalmente, al menos algunas láminas 120 se proporcionan en una estructura de soporte externo en contacto con la lámina y/o al menos algunas de las láminas 120 incluyen una estructura de soporte interno (por ejemplo, una malla incrustada en la lámina 120).

Procedimiento de fabricación ejemplar:

La Figura 5 es un diagrama de flujo simplificado de un procedimiento de producción de un apósito biológico representado generalmente con el número de referencia 500. El procedimiento 500 ejemplar representado incluye la difusión 510 de una unidad estándar de sangre entera para cubrir un área de al menos 0,02 (por ejemplo 0,1 o más) metros cuadrados en tanto se mantiene 520 la esterilidad y se permite 530 que la sangre forme un coágulo. De acuerdo con diversas realizaciones ejemplares de la invención, el área puede ser de 0,15, 0,2 metros cuadrados o áreas mayores o intermedias.

En algunas realizaciones ejemplares de la invención, el procedimiento 500 incluye la adición de un iniciador de coagulación de la sangre entera antes de la difusión 510. De acuerdo con diversas realizaciones ejemplares de la invención, el iniciador de coagulación se selecciona para neutralizar una actividad de un anticoagulante en la unidad de la sangre entera.

Opcionalmente, la difusión 510 se produce en un receptáculo revestido con una capa de soporte que evita el contacto entre la sangre entera y el receptáculo, como se describirá en mayor detalle a continuación. Opcionalmente, la capa de soporte es permeable a gases e/o impermeable a líquidos.

5 En algunas realizaciones ejemplares de la invención, la difusión 510 se realiza sobre una malla que queda oculta en el coágulo.

En resumen, las realizaciones ejemplares de la invención abarcan cualquier uso de sangre entera no fraccionada en la fabricación de un apósito para heridas.

Aparato ejemplar para la producción de coágulos:

10 Las Figuras 6A y 6B son diagramas esquemáticos que ilustran un dispositivo para la coagulación de sangre entera ex-vivo en dos estados operativos diferentes representados generalmente con los números de referencia 600 y 601.

15 En la Figura 6A, el dispositivo se representa en un estado 600 operativo totalmente ensamblado en el que se conecta a una fuente 610 de sangre externa por un conector 612. El dispositivo ejemplar representado incluye una entrada 614 que comprende un canal de comunicación fluida a un interior del dispositivo y un receptáculo 650 de muestra adaptado para difundir una muestra dispuesta en su interior para producir una capa 620. La adaptación puede incluir, por ejemplo, la selección de un material adecuado para la construcción para mantener la tensión superficial de la sangre en un valor que promueva la difusión. Como alternativa o adicionalmente, una superficie de contacto con la sangre se puede tratar con un agente tensioactivo y/o texturizado para fomentar la difusión. El receptáculo 650 contiene una cantidad suficiente de un anti-anti-coagulante para causar la coagulación de la sangre introducida en el receptáculo.

20 La disposición representada incluye al menos una estructura 640 de soporte desplegada en el receptáculo 650 de manera que la capa 620 uniforme se forma sobre la estructura 640. La estructura 640 de soporte se representa como una capa externa que se adhiere a un coágulo de sangre formado sobre la misma. Opcionalmente, la capa es permeable a gases e/o impermeable a líquidos.

Opcionalmente, un espacio 642 está previsto entre el receptáculo 650 y la capa 640 para la acumulación de líquidos.

25 Como alternativa o adicionalmente, la estructura 640 de soporte incluye una malla incrustada en la capa 620 y la lámina 120 de coágulo resultante de la misma.

En la disposición representada, una cubierta 630 retirable adaptada para mantener la esterilidad de la capa 620 cubre el receptáculo 650.

30 En algunas disposiciones ejemplares, el interior del dispositivo se encuentra bajo presión de vacío. El volumen interior del dispositivo y/o el volumen de llenado deseado relativo y/o la flexibilidad de los materiales se consideran cuando se calcula un montaje de vacío a aplicar. Opcionalmente, vacío aplicado colapsa, o colapsa parcialmente el dispositivo.

Aparato ejemplar para la producción simultánea de múltiples coágulos:

35 La Figura 7 es un diagrama esquemático que ilustra un dispositivo representado generalmente con el número de referencia 700 para la coagulación de sangre entera ex-vivo para formar simultáneamente diversas láminas. El dispositivo 700 ejemplar representado incluye una entrada 710 que comprende un canal de comunicación fluida a un interior del dispositivo y una pluralidad de receptáculos 750 de muestra (cinco se representan, aunque otros números de receptáculos pueden emplearse) interconectados para permitir un flujo concurrente desde una fuente común. Cada uno de los receptáculos 750 se adapta para difundir una muestra dispuesta en su interior para producir una capa uniforme como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

40 El dispositivo 700 ejemplar representado incluye un protector 730 de esterilidad adaptado para mantener la esterilidad de la capa en cada uno de los receptáculos 750 apilados. En la realización representada, los receptáculos 750 se configuran como cajones de manera que la retirada de un receptáculo 750 no afecta la esterilidad de dicho cajón en cualquier otro receptáculo 750. Por tanto, al menos algunos de los receptáculos 750 sirven como protectores de esterilidad para otro de los receptáculos 750.

45 Como alternativa o adicionalmente, el protector 730 de esterilidad comprende una cubierta asociada con al menos algunos de los receptáculos 750.

En algunos ejemplos, el interior de la carcasa 720 se proporciona al vacío.

50 La **Figura 8** es un diagrama esquemático que ilustra un dispositivo representado generalmente con el número de referencia 800 para la coagulación de sangre entera ex-vivo para formar simultáneamente diversas láminas. El dispositivo 800 ejemplar representado incluye una entrada 810 que proporciona comunicación fluida a un interior de la carcasa 820.

El interior del alojamiento 820 está dividido en una pluralidad de receptáculos de muestra interconectados para permitir el flujo concurrente desde una fuente común por separadores 840. En el ejemplo representado la interconexión es en paralelo, aunque una disposición alternativa de los separadores se puede utilizar para proporcionar receptáculos en series. Series/combinaciones paralelas también son posibles en las realizaciones adicionales de la invención.

Cada receptáculo se adapta para difundir una muestra dispuesta en su interior para producir una capa uniforme como se ha descrito anteriormente.

La cubierta 820 de la carcasa 821 sirve como un protector de esterilidad adaptado para mantener la esterilidad de la capa en cada uno de los receptáculos.

Durante su uso, la sangre entera se carga a través de la entrada 810 y procede a través del lumen 830 en el que está en comunicación fluida con espacios los entre los separadores 840.

En el ejemplo representado, los separadores 840 sirven como estructura de soporte externa dispuesta en los receptáculos. Una capa de sangre entera de líquido se forma en cada una de las estructuras 840 de soporte que sirven como capas externas a las que se adhiere un coágulo de sangre a medida que se forma sobre las mismas.

En el ejemplo representado, se proporcionan capas 330 de malla entre los espacios 840. Las capas 330 de malla funcionan como estructura de soporte interna incrustada en la capa de sangre entera líquida, y el coágulo de sangre resultante de la misma.

En el ejemplo representado, el dispositivo 800 incluye una válvula 811 de salida que proporciona comunicación fluida entre el interior de la carcasa 820 y un entorno ambiental. Opcionalmente, la válvula 811 permite que el gas salga del dispositivo, a medida que se llena de sangre. En algunas realizaciones ejemplares de la invención, la válvula 811 es unidireccional y/o filtra de modo que no se pone en peligro la esterilidad.

En algunos ejemplos, el interior de la carcasa 820 se proporciona al vacío.

En los dispositivos representados en las Figuras 7 y 8, cada uno de los recipientes puede contener opcionalmente una cantidad suficiente de un anti-anti-anticoagulante para causar la coagulación de la sangre introducida en su interior.

Procedimiento ejemplar para producir láminas de sangre coagulada a partir de un bloque:

La **Figura 9** es un diagrama de flujo simplificado que ilustra un procedimiento 900 ejemplar de preparación de láminas de sangre entera coagulada. El procedimiento 900 ejemplar representado incluye proporcionar un bloque de sangre entera coagulada en un aparato de corte y hacer avanzar el bloque 920 progresivamente. Después del avance incremental, el bloque se corta 930 para formar una porción que se convierte en una "lámina" como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. El avance 920 y el corte 930 se pueden repetir 940 progresivamente para producir láminas adicionales.

El espesor de lámina se puede controlar mediante el ajuste del incremento de avance 920.

Opcionalmente, el bloque a cortar se congela para aumentar la dureza.

En algunos ejemplos, un volumen relativamente pequeño de la sangre (por ejemplo, 10, 20, 30, 40 o 50 ml o volúmenes intermedios) se recoge y coagula en un recipiente disponible (por ejemplo, tubo de ensayo o cilindro de jeringa). Opcionalmente, las piezas, en forma de porciones o láminas se cortan de este coágulo utilizando cualquier herramienta disponible (por ejemplo, una lámina de bisturí o navaja. En algunas realizaciones ejemplares de la invención, el corte se realiza sobre una superficie marcada (por ejemplo, papel de gráfico) para mantener porciones relativamente uniformes en espesor. Este tipo de procedimiento se puede emplear para tratar úlceras con tamaños pequeños (por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 centímetros cuadrados).

Materiales ejemplares:

Capas de soporte externas (por ejemplo, 340 y/o 640) se pueden construir de uno o más materiales que incluyen, pero no se limitan a nylon, poliuretano, algodón, un silicio y caucho. Opcionalmente, los materiales se seleccionan para ser permeable a gases e/o impermeables al agua.

Los receptáculos de formación de láminas (por ejemplo, 650 y/o 750) se pueden construir de uno o más materiales que incluyen, pero no se limitan a vidrio, poliuretano, cloruro de polivinilo, policarbonato, celulosa, poliestireno y un caucho.

En general, se seleccionarán materiales para la construcción de dispositivos de coagulación descritos anteriormente que sean de bajo coste, ligeros en peso y esterilizables. Todos estos factores contribuyen a la viabilidad de la producción de productos médicos de "un solo uso" o "desechables".

En algunas realizaciones ejemplares de la invención, los soportes internos (por ejemplo, 330) se proporcionan como mallas. Las mallas adecuadas para este fin incluyen, pero no se limitan a las mallas de tejido (por ejemplo, gasa de algodón o estopilla). En otras realizaciones ejemplares de la invención, las telas no tejidas se sustituyen por mallas. En otras realizaciones ejemplares de la invención, los soportes internos se proporcionan como otros tipos de matrices o disposiciones. Opcionalmente, la malla incluye fibras de algodón y/o de celulosa.

Dimensiones ejemplares:

En algunas realizaciones ejemplares de la invención, los receptáculos tienen un tamaño de aproximadamente 15 x 20 cm. Si una capa de líquido de sangre entera de 3 mm de profundidad se coloca en los recipientes de este tamaño, una unidad estándar de sangre entera llena 5 receptáculos. El área agregada de los 5 receptáculos es de 0,15 metros cuadrados, lo que corresponde al 10 % de la superficie de la piel de un individuo promedio. Un conjunto de cinco receptáculos dispuestos como se representa en la Figura 7 se puede preparar con una altura total de aproximadamente 5 a 8 cm y una base de aproximadamente 16 x 21 cm o menos.

Si se desean áreas de cobertura más grandes, capas más finas de sangre entera y/o un mayor número de recipientes se pueden emplear. Opcionalmente, la cobertura de más de 0,15 metros cuadrados implica el uso de más de 1 unidad de sangre entera.

En otros ejemplos, tales como úlceras, áreas de cobertura más pequeñas son suficientes. Opcionalmente, la recogida de pequeños volúmenes de sangre (por ejemplo, 3, 5, 10, 20 o 30 cc o volúmenes más pequeño o intermedios) es suficiente para preparar un coágulo para cubrir una úlcera. Correspondientemente, se emplean bandejas de coagulación más pequeñas y/o coágulos más finos.

Anticoagulantes ejemplares e inhibidores de anticoagulante:

Los anticoagulantes adecuados para su uso en el contexto de la presente invención incluyen, pero no se limitan a EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), EGTA (ácido tetraacético etilenglicol), citrato (citrato de sodio o dextrosa citrato ácido), heparina y oxalato.

Los inhibidores de anticoagulantes adecuados para su uso en el contexto de la presente invención incluyen, pero no se limitan a Ca^{2+} , Mg^{2+} , caolín, fosfolípido (PL) cargado negativamente y sulfato de protamina. La Tabla 1 resume las formas ejemplares en las que el tiempo de coagulación se puede controlar para obtener una ventana de trabajo deseada (por ejemplo, para la preparación de láminas 120).

Tabla 1: tiempos de coagulación in vitro ejemplares

Material probado	Tiempo de coagulación
Sangre entera	4-8 min
Sangre entera + EDTA o citrato	Infinito
Sangre entera citrada + Ca^{++}	2-4 min
Sangre entera citrada + PL (fosfolípidos cargados negativamente) + Ca^{++}	60-85 seg
Sangre entera citrada + caolín + PL + Ca^{++}	21-32 seg (aPTT)
Sangre entera citrada + tromboplastina + Ca^{++}	11-12 seg (PT)

La sangre entera con un anticoagulante añadido se puede obtener a partir de un banco de sangre y se añade suficiente inhibidor de anticoagulante para lograr un tiempo de coagulación de 2 a 8, opcionalmente de 4 a 8 minutos. Esta vez se considera suficiente para permitir la distribución de la unidad de sangre en receptáculos como un líquido para la coagulación posterior en su interior como se ha descrito anteriormente.

Procedimiento ejemplar adicional

En algunas realizaciones ejemplares de la invención, un procedimiento de preparación de un apósito para heridas incluye la recogida de un volumen de sangre y la coagulación de la sangre *ex vivo* para formar un coágulo. Opcionalmente, el volumen recogido es pequeño (por ejemplo, 5, 10, 15 o 20 ml o volúmenes más pequeños o intermedios). En algunas realizaciones ejemplares de la invención, el volumen a ser recogido se determina en consideración del área de una herida a tratar. Opcionalmente, el procedimiento incluye cortar una porción del coágulo a las dimensiones y/o forma adecuados para colocar un apósito sobre una herida específica. El corte puede, por ejemplo, ser con unas tijeras. Opcionalmente, el procedimiento incluye proporcionar una estructura de soporte sobre la que se forma dicho coágulo. Las estructuras de soporte pueden ser internas y/o externas, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

Kits ejemplares:

Se describen algunos kits ejemplares para la preparación de un apósito para heridas que incluye sangre entera coagulada. Opcionalmente, el kit incluye un recipiente estéril o esterilizable, adaptado para recibir un volumen de sangre y suficiente anticoagulante para evitar que el volumen de la sangre se coagule. El recipiente puede ser, por ejemplo, una jeringa, una bolsa o tubo de ensayo (por ejemplo, un tubo de ensayo lleno al vacío).

En algunos ejemplos del kit, el anticoagulante se proporciona en el recipiente. Opcionalmente, el kit incluye suficiente anti-anticoagulante para hacer que el volumen de sangre se coagule en presencia del anticoagulante. La adición de anti-anticoagulante a la sangre con anticoagulante da inicio a una ventana de tiempo durante la que se produce la coagulación. Durante esta ventana de tiempo, la sangre se transfiere a una bandeja adaptada para difundir el volumen de sangre hasta un espesor deseado. Los espesores adecuados incluyen 1, 2, 3, 4 y 5 mm y espesores intermedios o más grandes.

De manera opcional, la bandeja contiene una estructura de soporte sobre la que se forma dicho coágulo. Las estructuras de soporte pueden ser internas y/o externas, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

Los kits de este tipo se pueden utilizar por individuos y/o por médicos. Opcionalmente, un usuario prepara diversos apósitos a la vez y almacena todos o algunos de ellos para su uso futuro.

Ventajas ejemplares:

De acuerdo con diversas realizaciones ejemplares de la invención el uso de láminas 120 de sangre entera coagulada como se ha descrito anteriormente en la presente memoria promueve la curación de heridas y/o reduce la incidencia de infección y/o contribuye a una reducción en la frecuencia de desbridamiento y/o reduce la formación de cicatrices. Se cree que estas ventajas se consiguen más significativamente en heridas no sangrantes, tales como quemaduras y úlceras crónicas (por ejemplo, úlceras de pie diabético). Estas ventajas se cree que están disponibles, al menos hasta cierto grado, sin tener en cuenta la fuente de la sangre para las láminas 120.

Fuentes de sangre ejemplares

La sangre utilizada para formar las láminas 120 puede ser de sangre autóloga, sangre entera homóloga recibida de un banco de sangre o sangre entera homóloga agrupada o sangre entera heteróloga combinada. Es generalmente aceptado en la práctica médica que un individuo sano pueda donar 1 unidad de sangre entera cada 6 a 8 semanas sin efectos adversos. Como alternativa, una sola persona puede donar cantidades más pequeñas de sangre en una frecuencia más alta.

Un sujeto en necesidad de tratamiento (por ejemplo, una víctima de quemaduras con quemaduras en más del 8 % de su superficie corporal) dona una unidad de sangre entera que se utiliza posteriormente para formar las láminas 120 mediante el uso de procedimientos y/o dispositivos como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. Esta estrategia de tratamiento puede contribuir a una reducción de los riesgos asociados con la incompatibilidad entre donantes de sangre y el sujeto tratado. Sin embargo, hay una limitación práctica en cuanto a la cantidad de superficie de la piel que se puede tratar con una donación autóloga y/o si una donación autóloga posterior estará disponible para la continuación del tratamiento. Cada uno de estos factores se ve, a su vez, influenciado por el espesor de las láminas 120 como se describe en mayor detalle a continuación.

Un sujeto en necesidad de tratamiento (por ejemplo, una víctima de quemaduras con quemaduras en más del 16 % de su superficie corporal) se trata con láminas 120 preparados a partir de sangre homóloga (por ejemplo, humana) utilizando los procedimientos y/o dispositivos como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. Esta estrategia de tratamiento puede aumentar ligeramente los riesgos asociados con la incompatibilidad entre donantes de sangre y el sujeto tratado. Sin embargo, es menos limitado con respecto a cuánta superficie de la piel se puede tratar y/o la disponibilidad de láminas adicionales para la continuación de la terapia.

La sangre homóloga (por ejemplo, humana) de muchas unidades se agrupa para formar un gran volumen que se utiliza posteriormente para formar las láminas 120 para tratar sujetos en necesidad de las mismas como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. Esta estrategia de tratamiento es muy susceptible a escala industrial y reduce el tiempo y el trabajo asociado con la detección de compatibilidad cruzada. Sin embargo, un cierto grado de riesgo asociado con la incompatibilidad entre el donante o donantes de sangre y el sujeto tratado no se ha evaluado. Esta estrategia de tratamiento es prácticamente ilimitada con respecto a cuánta superficie de la piel se puede tratar y/o la disponibilidad de láminas adicionales para la continuación de la terapia. Hay una posibilidad de que la agrupación de un gran número de diferentes tipos de sangre antes de la coagulación para formar láminas 120 pueda resultar en una situación de "donante universal" puesto que los anticuerpos y antígenos se unen y se neutralizan los unos a los otros antes de la formación de coágulos.

La sangre heteróloga (por ejemplo, porcina o equina) de muchas unidades se agrupa para formar un gran volumen que se utiliza posteriormente para formar láminas 120 para tratar sujetos en necesidad de las mismas como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. Como alternativa o adicionalmente, un poco de sangre humana se puede extender mediante su mezcla con sangre heteróloga. Esta estrategia de tratamiento es también muy

susceptible a escala industrial y reduce el tiempo y el trabajo asociado con la detección de compatibilidad cruzada. Sin embargo, un cierto grado de riesgo asociado con la incompatibilidad entre los coágulos derivados de una o más especies heterólogas y sujetos tratados no se ha evaluado. Esta estrategia de tratamiento también es prácticamente ilimitada con respecto a cuánta superficie de la piel se puede tratar y/o la disponibilidad de láminas adicionales para la continuación de la terapia. Al igual que con la sangre homóloga agrupada, hay una posibilidad de que la acumulación de sangre de múltiples especies no relacionadas (por ejemplo, sangre porcina, ovina y equina y canina) antes de la coagulación para formar las láminas 120 pueda resultar en una situación de "donante universal" puesto que los anticuerpos y antígenos se unen y se neutralizan los unos a los otros antes de la formación de coágulos.

Explicación del espesor de lámina como una limitación del tratamiento

En algunas realizaciones ejemplares de la invención, una unidad de sangre entera se extiende sobre una superficie de 0,1 metros cuadrados o más y se deja coagular como se ha descrito anteriormente. El área que se puede cubrir depende del espesor de coágulo deseado después de la coagulación. La Tabla 2 resume las áreas de cobertura ejemplares (% del área total del cuerpo) de una sola unidad estándar de sangre entera en términos del espesor de capa inicial y espesor del coágulo resultante.

Tabla 2: % de cobertura de superficie corporal como una función del espesor de la capa de sangre entera líquida

Ejemplo	Espesor de sangre líquida (mm)	Espesor del coágulo (mm)	Área total (M ²)	% de Superficie corporal
1	3	1,2	0,15	10
2	2	0,8	0,23	15
3	1,5	0,6	0,30	20
4	1	0,4	0,45	30
5	0,5	0,2	0,90	60

El resumen en la Tabla 2 deja claro que hay una relación lineal entre la cantidad de superficie corporal que se puede cubrir por una unidad de sangre entera y el espesor inicial de toda la capa de sangre utilizado para preparar las láminas 12. En algunas realizaciones ejemplares de la invención, las capas de soporte internas (por ejemplo, malla 330) y/o capas de soporte externas (por ejemplo, 130 y/o 640) y/o el apósito convencional (por ejemplo 140) contribuyen a una reducción del espesor de sangre líquida y/o del espesor de coágulos que son compatibles con la eficacia de la terapia.

En el contexto del tratamiento de quemaduras, el logro de áreas de cobertura más grandes puede ser crítico. En el contexto de tratamiento de úlceras, una gran área de cobertura es menos importante, aunque la relación entre el área de cobertura y espesor permanece.

General

Tal como se utiliza en la presente memoria la expresión "aproximadamente" se refiere a un 10 %.

Aunque la invención se ha descrito junto con realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la materia.

En concreto, se ha utilizado una variedad de indicadores numéricos. Se debe entender que estos indicadores numéricos podrían variar incluso aún más basándose en una variedad de principios de ingeniería, materiales, uso previsto y diseños incorporados en la invención. Además, los componentes y/o acciones atribuidas a realizaciones ejemplares de la invención y representados como una sola unidad se pueden dividir en subunidades. Por el contrario, los componentes y/o acciones atribuidas a realizaciones ejemplares de la invención y representadas como sub-unidades/acciones individuales se pueden combinar en una sola unidad/acción con la función descrita/representada.

Como alternativa, o adicionalmente, las funciones utilizadas para describir un procedimiento se puede utilizar para caracterizar un vendaje para heridas, un aparato o un kit o artículo de fabricación y las características utilizadas para describir un vendaje para heridas, un aparato o un kit o artículo de fabricación se pueden utilizar para caracterizar un procedimiento.

Los ejemplos anteriores se proporcionan únicamente para propósitos de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención que se define únicamente por las siguientes reivindicaciones. Específicamente, la invención se ha descrito en el contexto de tratamiento de úlceras crónicas y/o quemaduras, pero también se podría utilizar para tratar otros tipos de heridas de la piel.

Las expresiones "incluir", y "tener" y sus conjugados como se utilizan aquí significa "incluyendo, pero no necesariamente limitado a".

Los objetos, ventajas y características novedosas adicionales de la presente invención serán evidentes para alguien de experiencia ordinaria en la técnica tras el examen de los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes.

- 5 Además, diversas realizaciones y aspectos de la presente invención tal como se expone anteriormente y como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

- 10 A continuación se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una manera no limitante.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Los siguientes materiales y procedimientos se utilizan en la realización de los experimentos descritos en los siguientes ejemplos:

- 15 Bandejas de coagulación se construyeron a partir de láminas de servicio de comida de plástico desechables con dimensiones de tamaño de 1 cm X 12 cm X 8 cm con fines de experimentación. En la práctica real, se pueden emplear otros tamaños y/o materiales. En algunas realizaciones ejemplares de la invención, se emplean polímeros plásticos biocompatibles y/o esterilizables.

Envoltura de Saran (cloruro de polivinilideno [PVDC] fabricado por SC Johnson & Son.; Estados Unidos) se utilizó para cubrir las bandejas de coagulación para reducir la tendencia de los coágulos que atenerse a las bandejas.

- 20 Gasa quirúrgica (malla 24x20, fabricada por M. Feingresh & Co. Ltd) fue empleada como una estructura de soporte incorporado ejemplar. Una doble capa de gasa de algodón se cortó a 9 cm X 13 cm o más grande para las bandejas de coagulación descritas.

- 25 Gluconato de calcio (B. Braun Melsungen AG, Alemania) se refiere a ampollas de 10 ml cuyo 10% contiene 940 mg gluconato de calcio H₂O; 50 mg calcio D-sacarato 4 H₂O y agua para la inyección. Cada 1 ml proporciona 0,23 mol e Ca⁺⁺.

Caolín (Imerys Minerals; Australia PTY) se utilizó como un polvo.

- 30 Sangre se recogió de un voluntario humano utilizando bolsas disponibles comercialmente de donación de sangre con citrato anticoagulante incluido. Para los controles no citrados, se recogió sangre en una jeringa desechable. Los volúmenes indicados se colocaron en vasos y se mezclaron con inhibidores anticoagulantes como se indica a continuación agitando y vertiéndose después inmediatamente en bandejas de coagulación.

Bolsas de donación de sangre eran conjuntos de infusión estériles de un solo uso no pirogénicas (MacoPharma; Francia) que contenían 63 ml de CPDA1 (Fórmula para 1L: 3.27g de Monohidr. de Ácido cítrico; 26,3 g de Natr. citras dihydr.; 2,51 g de Mononatr. fosphas dihydr.; 31,9 g de Dextr. Monohidr.; 0,349 g Adenin HCL y Agua en 1000 ml [Ph 5,6 +-0,3; 285 mmol de Na/L]).

- 35 **Ejemplo 1:**

Impacto de coagulantes y anticoagulantes en la formación de coágulos

- Para analizar los efectos de los anticoagulantes y los antagonistas basados en citratos de los mismos en la formación de coágulos, se ensayaron diversas combinaciones. Sangre entera no citrada (bandeja 2) sirvió como control negativo. Sangre entera citrada sin antagonista (bandeja 1) sirvió como control positivo. Las combinaciones experimentales de las bandejas 3, 4, 5 y 6 se detallan en la Tabla 3. Los ingredientes antagonistas fueron brevemente mezclado en un vaso de plástico por agitación y se vertieron sobre gasa quirúrgica pre-cortada colocada en bandejas de coagulación alineadas con una envoltura de saran a una profundidad de 4 mm. La **Figura 10** es una fotografía 1000 de un coágulo ejemplar en una bandeja de coagulación con estructura de soporte integrada que sobresale de los bordes 7 minutos después de la adición de gluconato de calcio. En este punto de tiempo, no hubo
- 45 ninguna diferencia perceptible visualmente entre las bandejas 3, 4, 5 y 6.

Tabla 3: combinaciones de coagulantes/anticoagulantes experimentales

Bandeja	Volumen de sangre (ml)	Citrada	Gluconato de calcio (ml)	Caolín
1	44	SÍ	ninguno	ninguno
2	44	NO	ninguno	ninguno
3	40	SÍ	4	ninguno

(continuación)

Bandeja	Volumen de sangre (ml)	Citrada	Gluconato de calcio (ml)	Caolín
4	40	Sí	8	ninguno
5	40	Sí	4	20 mg
6	40	Sí	8	40 mg

Después de la formación del coágulo, cada coágulo se transfirió por medio de su estructura de soporte incorporada a una bandeja angular más grande. La **Figura 11** es una fotografía 1100 de uno de los coágulos que se transfiere. Se observaron los coágulos en color y textura. El fluido exudado se caracterizó con respecto al volumen y la apariencia. La bandeja 1 de control negativo se mantuvo sin coagular y no estuvo involucrada en la manipulación y/u observación adicional.

La **Figura 12** es una fotografía 1200 de los coágulos representativos en bandejas en ángulo. El exudado de fluido es claramente visible en diversas bandejas.

Después de 12 minutos desde el momento en que se añade el gluconato de calcio (y caolín en su caso) a la sangre tratada con citrato:

La bandeja 2 contenía un coágulo que era de color rojo oscuro, suave y más fino que la profundidad original de líquido de 4 mm. Aproximadamente de 10 ml-13 ml de exudados de fluido de color rojo se recogieron en la bandeja angular y se coagularon.

La bandeja 3 contenía un coágulo que era menos rojo oscuro y más sólido y más grueso que la profundidad del líquido original de 4 mm. Aproximadamente 0,5 ml de fluido de color rojo se exudó y no se coaguló.

La bandeja 4 fue similar a la bandeja 3.

La bandeja 5 fue similar a las bandejas 3 y 4, pero el coágulo fue más sólido y más grueso que las bandejas 3 y 4. Había menos volumen de fluido rojo que en las bandejas 3 y 4.

La bandeja 6 contenía un coágulo que era más oscuro, más rígida y más grueso que el observada en otras bandejas. Había fluido menos rojo exudado que en todas las demás bandejas, y el color del fluido era más ligero que el observado en las otras bandejas.

Después de 23 minutos desde el momento en que se añade el gluconato de calcio (y caolín en su caso) a la sangre tratada con citrato, cada coágulo se transfirió a través de su estructura de soporte integrada a una bandeja angular más grande limpia. Todos los coágulos fueron fácilmente retirables de sus bandejas y mantuvieron su forma durante la transferencia.

La bandeja 2 contenía un coágulo de color rojo oscuro que no era rígido y tenía aproximadamente 2 mm o menos de espesor. Este coágulo continuó exudando fluido de color rojo a una velocidad de aproximadamente 1 ml/5 minutos. Este coágulo exhibió traslación axial con respecto a la estructura de soporte integrada indicando un grado insuficiente de adherencia.

En las bandejas 3, 4, 5 y 6 los coágulos eran de un color rojo más claro que en la bandeja 2 y eran muy sólidos y más gruesos que la profundidad del líquido original de 4 mm. Pequeñas cantidades de fluido de color rojo pálido continuaron exudándose.

La bandeja 6 contenía un coágulo con el mejor rendimiento en términos de retención de forma, mantenimiento de espesor, rigidez y retención de fluidos.

Después de 37 minutos cada uno coágulo se transfirió a través de su estructura de soporte integrada a una balanza para su pesaje. Los coágulos citrados de las bandejas 3, 4, 5 y 6 pesaron aproximadamente un 30 % más que el coágulo de control positivo de la bandeja 2.

En base a estas observaciones, 8 cc de gluconato de calcio no parece mejorar las propiedades de coágulos en relación con más de 4cc de gluconato de calcio.

El caolín, en cualquier cantidad, parece mejorar las propiedades de los coágulos.

En este experimento, las propiedades del coágulo de sangre entera fresca (Bandeja 2) se consideraron inferiores a las de los coágulos de sangre entera coagulada citrada.

Aproximadamente 42 minutos después de la adición de los antagonistas de anticoagulantes:

La **Figura 13** es una fotografía 1300 del coágulo de la bandeja 6. Este coágulo se colocó en un congelador estándar (-20 grados C) durante 5 días, se sacó y colocó en la piel del muslo y se fijó en su lugar con adhesivo médico, y se cubrió con capas de algodón.

La **Figura 14** es una fotografía 1400 del coágulo de la bandeja 3 que se colocó posteriormente en la piel del muslo y se fijó en su lugar con capas de gasa sujetadas con cinta adhesiva y se cubrió con capas de algodón.

retenidas con cinta adhesiva adicional.

El resto de los coágulos se dejaron secar al aire libre.

La prueba preliminar de sangre entera coagulada como un material de apósito para heridas se describe a continuación en los Ejemplos 2 y 3.

- 5 Los resultados presentados en este ejemplo indican que la estructura de soporte integrada era útil en la conservación de la integridad y/o forma de coágulos y/o para facilitar su transferencia y/o manipulación.

Este ejemplo ilustra que es factible preparar láminas de sangre entera coagulada en tamaños y formas deseadas para su uso en diversas realizaciones ejemplares de la invención como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

10 **Ejemplo 2:**

Uso ejemplar de una lámina de sangre recién coagulada en la preparación de un apósito para heridas

Para evaluar la posibilidad de utilizar láminas de sangre entera coagulada como parte de un apósito para heridas, el coágulo de la bandeja 3 se colocó sobre la piel (**Figura 14**) del muslo y se cubrió con capas de gasa quirúrgica y después capas de algodón retenidas en su lugar con cinta adhesiva.

- 15 Después de 12 horas, se eliminó el algodón. La **Figura 15** es una fotografía 1500 que muestra que los exudados del coágulo se han impregnado a través de la gasa quirúrgica colocada sobre el coágulo. Parece que los exudados de coágulo impregnados en la gasa superpuesta hicieron de este material parte de la capa de coágulos.

- 20 Este ejemplo ilustra que la sangre entera coagulada se adhiere bien a la piel intacta. La piel intacta se utiliza como modelo para heridas no sangrantes (por ejemplo, quemaduras y/o úlceras) por lo que los resultados confirman la viabilidad de utilizar sangre entera coagulada como un apósito para heridas no sangrantes. Opcionalmente, los apósitos de acuerdo con realizaciones ejemplares de la invención se pueden aplicar a heridas sangrantes también.

Ejemplo 3:

Efecto del coágulo de sangre aplicado a la superficie de la piel intacta

- 25 Siguiendo el ejemplo 2, el coágulo se separó manualmente de la superficie de la piel intacta a la que se había aplicado. La **Figura 16A** es una fotografía 1600 que muestra el coágulo seco adherido a la piel. La **Figura 16B** es una fotografía 1602 donde se desprende el coágulo seco de la piel. La **Figura 16C** es una fotografía 1604 que muestra que la retirada del coágulo seco de la piel no ha causado ninguna irritación perceptible. La retirada fue manual desprendiendo y tirando suavemente como se observa en la **Figura 16C**.

- 30 El coágulo era fino y completamente seco en esta etapa. Se observaron pequeños defectos en forma de orificios en el coágulo. Los orificios parecían corresponder a los lugares donde la estructura de soporte interna (gasa) se había roto o rasgado.

Este ejemplo ilustra que el uso de láminas de sangre entera coagulada en el contexto de tratamiento de quemaduras proporciona una alternativa a los procedimientos convencionales. Opcionalmente, láminas de sangre entera coagulada contribuyen a una reducción en el desbridamiento de heridas.

35 **Ejemplo 4:**

Uso ejemplar de una lámina de sangre coagulada congelada en la preparación de un apósito para heridas

- 40 Para demostrar que los coágulos se pueden preparar por adelantado y almacenarse para su uso posterior como apósitos para heridas, el coágulo de la bandeja 6 (**Figura 13**) se almacenó congelado durante 5 días y después se descongeló a temperatura ambiente. El coágulo se utilizó para preparar un apósito para heridas como en el Ejemplo 3. Los resultados fueron sustancialmente los mismos que en el Ejemplo 3.

Este ejemplo ilustra que el almacenamiento de coágulos de sangre antes de su uso como apósitos para heridas de acuerdo con realizaciones ejemplares de la invención es factible.

Ejemplo 5:

Observaciones adicionales en coágulos de sangre de secado al aire

- 45 Para evaluar el potencial de almacenar sangre entera coagulada en condiciones ambientales, los coágulos de las bandejas 2, 4 y 5 se dejaron secar al aire libre durante 25 horas. En comparación con los coágulos vendados, los coágulos de secado al aire eran más gruesos, a pesar de que se secaron completamente. Estos coágulos se caracterizan por un color rojo muy oscuro y no presentaron defectos (orificios). Estos coágulos estaban libres de olores.

El Ejemplo 5 ilustra que es factible almacenar la sangre entera coagulada a temperatura ambiente durante al menos 1 día. La ausencia de olor sugiere que no hay putrefacción. No está claro si la falta de orificios es el resultado de una disminución en su manipulación o de otros factores.

En general, los coágulos de secado al aire eran más gruesas y mantuvieron más elementos de la sangre que los aplicados como vendas (Ejemplos 3 y 4).

Ejemplo 6:

Tratamiento de heridas reales en sujetos humanos

Para confirmar que se pueden emplear eficazmente como un apósito para heridas de sangre entera coagulada, sujetos humanos con heridas reales de diversos tipos fueron reclutados y tratados utilizando los apósitos preparados sustancialmente como se ha descrito anteriormente.

Los pacientes consecutivos referidos a la unidad de cuidados paliativos y a los departamentos de enfermería del Centro Médico Geriátrico Shoham (Pardes-Hanna; Israel) fueron seleccionados para su reclutamiento entre junio de 2009 y diciembre de 2009. Todos los sujetos potenciales ya estaban en tratamiento por sus heridas con la norma previamente aceptada de tratamiento de cuidados. El estudio fue aprobado por la junta de revisión institucional. Un total de 7 heridas con estadios de etiología 2-3 en 6 pacientes (2 hombres y 4 mujeres) fueron vendados con apósitos de sangre entera coagulada de acuerdo con las realizaciones ejemplares de la invención. Los sujetos o sus representantes legales firmaron los formularios de consentimiento informados antes de su inclusión en el estudio. Los criterios de selección fueron 18-100 edad, estadios de heridas 2-3 y consentimiento informado. Los criterios de exclusión fueron heridas más grandes que 8 cm por 8 cm, heridas cancerosas, incapacidad para proporcionar 30 cc de sangre por semana y una sepsis comprobada establecida por un cultivo de sangre en las últimas 2 semanas. Todos los tratamientos de cuidados localizados de heridas en curso se detuvieron antes de iniciar el tratamiento de acuerdo con una realización ejemplar de la invención. Las características de la herida se resumen en la tabla 4. La tipología y estadificación fue de acuerdo con los criterios previamente publicados (estadificación de úlcera por presión NPUAP 2007, [npup.org]; Prevention and treatment of skin tears K. Leblanc *et al*, Wound Care Canadá, Volumen 6, Número 1, 2008).

Tabla 4: Características de heridas

Herida	Edad/Género	Tipo/etiología	Ubicación	Tamaño cm ²	Estadio
1	93/M	Herida por desgarro	Pierna inferior izquierdo	28,1	3
2	88/M	Úlcera venosa y fístula	Parte posterior del pie derecho s	3,12	NA
3	88/M	Úlcera venosa	Empeine superior izquierdo	1,6	NA
4	48/M	Úlcera de presión	Talón derecho	3,61	3
5	32/H	Punta del dedo amputado	Dedo medio	0,89	3
6	90/H	Úlcera de presión	Talón izquierdo	4,7	3
7	65/M	Herida traumática	Espinilla derecha	2,8	2

Los apósitos basados en sangre entera coagulada se prepararon utilizando un kit de acuerdo con una realización ejemplar de la invención. El kit ejemplar contiene 3 tamaños de bandejas de coagulación estériles, de un solo uso, pequeño (14,5 cm²), mediano (26,4 cm²) y grande (64 cm²). Cada bandeja de coagulación está equipada con gasa de algodón médica extendida a través de la parte inferior de la bandeja. Como se ha explicado anteriormente la gasa se incrusta en el coágulo que se forma. Opcionalmente, la gasa contribuye a la robustez del apósito y/o simplifica la transferencia del apósito a la herida y/o hace que el recorte sea más fácil.

Para cada tratamiento de heridas, se determinó el tamaño de la herida midiendo la longitud máxima entre dos puntos en los bordes de la herida. De acuerdo con el tamaño determinado, se ha seleccionado una bandeja adecuada (por ejemplo, por la enfermera). La bandeja de coagulación se selecciona para que sea más grande que la herida para garantizar que todo el apósito de sangre coagulada pueda cubrir toda el área de la herida y más allá de, al menos 0,5 cm de la piel intacta alrededor de la herida. Las instrucciones específicas para la cantidad de CPDA1, sangre entera y mezcla de calcio y caolín de activación de coagulación se proporcionan como parte del kit para cada uno de los tres tamaños de bandejas de coagulación: pequeño, mediano y grande. Las cantidades ejemplares son CPDA1 (1,5 ml, 2 ml y 4 ml), la cantidad de sangre entera que se extrae (10 ml, 13 ml y 30 ml) y la cantidad de activador de coagulación, la mezcla de calcio y caolín (2 ml, 2,5 ml y 5 ml).

Opcionalmente, la preparación del lecho de la herida para el apósito se realizó de acuerdo con los procedimientos aceptados, por ejemplo, lavado con solución salina y/o desbridamiento estéril dependiendo del tipo de herida y/o estadio. El paciente y su estado clínico actual y pasado de la herida se documentaron y la herida fue fotografiada mientras se sujetaba una regla junto a los bordes de la herida como un medio para monitorear el progreso del

tratamiento.

Una jeringa (jeringa de 20 ml o 50 ml de acuerdo con la bandeja seleccionada) se llenó con la cantidad apropiada de CPDA1 y se utilizó para extraer sangre venosa del paciente. La extracción de sangre y la manipulación se realizó de acuerdo a las directrices de precauciones del hospital.

- 5 En paralelo, 5 ml de gluconato de calcio (B. Braun, Alemania) se mezcló en un vial estéril con 35 mg de polvo blanco de caolín estéril (Merck). La cantidad deseada (como se ha descrito anteriormente) de la mezcla de activación de coagulación se extrajo del vial con la jeringa que contenía la mezcla de sangre/anticoagulante. El contenido de la jeringa se mezcló uniformemente durante 10 segundos para inducir la coagulación.

- 10 En este punto, la sangre de coagulación se transfirió a la bandeja de coagulación pre-seleccionada y la bandeja se colocó sobre una superficie horizontal plana. La enfermera esperó después (por ejemplo, aproximadamente 10 minutos) para colocar el apósito que incluía una lámina de sangre entera coagulada para darle forma. En esta etapa, la bandeja de coagulación se abre utilizando guantes estériles y el apósito basado en sangre entera coagulada se transfirió a la herida, colocándolo en la herida de modo la almohadilla integrada quedó orientada hacia arriba. A continuación, el apósito de acuerdo con una realización ejemplar de la invención se fijó a la herida cubriéndolo cubre
15 con una almohadilla no adhesiva, a continuación, de gasa y envolviéndolo después con una venda elástica o mediante el uso de una banda Aid™ (Johnson & Johnson, Somerville, Nueva Jersey).

- Después del tratamiento inicial, se puso en práctica un programa de seguimiento que incluía dos tipos de visitas. En un primer tipo "de seguimiento" de visita, todo el apósito basado en coágulos de sangre entera ejemplar no se ha retirado de la herida. En una segunda visita de "re-aplicación" todo el apósito basado en coágulos de sangre entera ejemplar se retiró y un nuevo apósito basado en coágulos de sangre entera se ha creado y aplicado como se ha descrito anteriormente.
20

- Las visitas de seguimiento se realizaron cada 2 días. En estas sesiones no se ha retirado el apósito de acuerdo con una realización ejemplar de la invención, sino solo las almohadillas de gasa por encima del coágulo. La visita incluyó la inspección visual de la superficie expuesta del apósito de acuerdo con una realización ejemplar de la invención para documentar la adherencia del coágulo a la herida, la inspección visual de la periferia de la herida para eventos adversos y la inspección olfativa para monitorear la posible infección.
25

- Las visitas de re-aplicación regulares se programaron cada 6 a 8 días dependiendo de la disponibilidad de personal. Los cambios de apósitos fueron pre-programados para documentar el procedimiento de curación de la herida por debajo. En las dos heridas por trauma tratadas, el apósito sangre entera coagulada fue dejado en la herida hasta que se cayó de forma natural. Estas heridas no eran úlceras crónicas. Las visitas de re-aplicación incluyeron documentación, fotografía (del apósito existente y de la herida que está tratada) y retirada y sustitución del apósito basado en sangre entera coagulada de acuerdo con una realización ejemplar de la invención. La visita de re-aplicación incluyó también la preparación del lecho de la herida de acuerdo con los procedimientos estándar utilizando gasa y solución salina.
30

- 35 En este estudio, el tratamiento continuó hasta la curación completa de la herida o hasta la determinación clínica de que la herida no podía mejorar aún sin procedimientos invasivos adicionales, tales como cirugía de fístula, procedimientos que no se realizan en el centro geriátrico.

- Todos los componentes y materiales del kit se suministraron como elementos estériles de un solo uso con materias reguladas y pre-medidas. Todo el kit es desechable y fue desechado de acuerdo con las normas del hospital. A lo largo del estudio se tomaron medidas para evitar que el coágulo se mojara (por ejemplo, utilizando envoltura de plástico tales como CLING-FILM™ o SARAN WRAP™ para envolver las extremidades y almohadillas adhesivas impermeables especialmente dedicados a proteger la herida durante el baño).
40

- Las heridas fueron fotografiadas durante el procedimiento de curación usando una cámara digital (Cannon Power Shot A590) utilizando un flash, a una distancia definida de 50 cm de la herida, hacia la parte frontal de la herida. En cada fotografía una regla de referencia desechable se colocó en estrecha proximidad a los bordes de la herida. La regla incluía la fecha, el número del paciente y el número del estudio de la herida según se había rellenado por el personal de investigación.
45

- Las imágenes de la herida se analizaron mediante el uso de software de análisis de imagen NIH "ImageJ" (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD, Estados Unidos), que está disponible para su descarga en <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>. Este software es de dominio público. De acuerdo con otras realizaciones ejemplares de la invención, los productos comerciales del software de análisis de imagen se emplearon en lugar de Image J.
50

El análisis de imágenes, en este caso incluyó:

- 55 a. medición de la cantidad de píxeles en 10 mm tal como se presenta en la regla de referencia de la imagen.
b. delineaciones de los bordes de la herida y documentación del área de píxeles automático que sale de la imagen.

- c. repetir la etapa b tres veces.
- d. calcular el área de píxeles promedio de las 3 delineaciones separadas,
- e. transformación del área de píxeles a un área de 2 mm por los píxeles medidos por 10 mm,
- f. documentación del resultado final en los pacientes con CRF para la fecha específica la foto fue tomada.

5 Opcionalmente, otras estrategias de análisis de imagen se pueden sustituir por esta estrategia.

Los resultados clínicos de curar las heridas con apósitos de sangre entera coagulada de acuerdo con las realizaciones ejemplares de la invención se presentan en la tabla 5. Cinco de las siete heridas se curaron completamente y las dos restantes sanaron en más del 80%. Cinco de las siete heridas eran moderadamente a fuertemente exudativas al inicio del tratamiento con apósitos de acuerdo con las realizaciones ejemplares de la invención. En todas las heridas exudativas, se documentó la extracción de los exudados a través del apósito basado en sangre entera coagulada y su absorción en las almohadillas de cubierta. Esto demuestra que los apósitos de acuerdo con las realizaciones ejemplares de la invención no son oclusivos. En promedio había una aplicación de apósito cada 8,8 días. Los casos se presentan a continuación.

15 La Figura 18 ilustra un caso de una herida vascular diagnosticada con una fístula exudativa de 1 cm al lado de la herida principal, que requiere intervención quirúrgica antes del tratamiento (Figura 18A) y después del tratamiento (Figura 18B). Las fotografías indican que la herida principal mostró curación completa y buena, mientras que la fístula exudativa no sanó completamente aunque estaba cubierta con el mismo apósito de acuerdo con una realización ejemplar de la invención durante el mismo período de tiempo. Por lo tanto, se calculó la herida total incluyendo la fístula como curada solo en un 80 %.

20 La Figura 19 ilustra un caso de una úlcera venosa en la parte superior del pie izquierdo antes del tratamiento (Figura 19A), que fue completamente curada (Figura 19B) en 11 días de tratamiento con un apósito de acuerdo con una realización ejemplar de la invención.

25 La Figura 20A muestra una úlcera por presión en la que se detuvo el tratamiento después del 82 % del cierre (Figura 20B), debido a la re-apertura de la herida que resultó de la presión directa recurrente sobre la herida cuando no estaba cubierta con el apósito de acuerdo con una realización ejemplar de la invención.

30 Las dos heridas por trauma, un caso de laceración de la espinilla izquierda (herida por desgarró) en una mujer de 93 años de edad (Figura 17A antes del tratamiento) y una amputación de la punta del dedo medio de la mano derecha de un varón de 34 años de edad (pre-tratamiento Figura 21A) tuvieron una sola aplicación del apósito de acuerdo con una realización ejemplar de la invención, que duró 21 días (laceración) y 19 días (amputación), hasta que el apósito se cayó, la curación se logró sin la necesidad de un apósito adicional (véanse Figuras 17B y 21B respectivamente).

35 Hubo dos casos de úlceras en pacientes con diabetes, una úlcera por presión en el talón izquierdo (pre-tratamiento Figura 22A) y la otra una herida traumática en la espinilla derecha (Figura 23A), la curación de las úlceras en pacientes diabéticos fue similar a la curación en pacientes no diabéticos (véanse Figuras 22B y 23B respectivamente).

Tabla 5: Resultados del tratamiento

Herida	Tamaño (cm ²) pretratamiento	Tamaño (cm ²) post-tratamiento	Días (aplicaciones) *	Figura
1	28,1	0	21 (1)	17
2	3,12	0,71	61 (7)	18
3	1,09	0	11 (1)	19
4	3,61	0,64	36 (5)	20
5	0,89	0	19 (1)	21
6	4,7	0	49 (7)	22
7	2,8	0	7 (1)	23
* Días de vendaje con apósito de sangre entera coagulada (número de aplicaciones de apósitos)				

Los resultados presentados en este ejemplo demuestran claramente que un profesional sanitario puede preparar de manera eficaz y segura un apósito de sangre entera coagulada de acuerdo con las realizaciones ejemplares de la invención, opcionalmente a partir de un kit proporcionado en el punto de cuidado y que contiene componentes y/o herramientas pre-medidas asociadas con la preparación del apósito.

5 Como alternativa o adicionalmente, los resultados presentados en este ejemplo demuestran claramente que curar las heridas con un apósito que incluye un coágulo de sangre autóloga es seguro para su uso en heridas crónicas de diversas etiologías. No se observó retraso en la curación de heridas y no se observaron acontecimientos adversos (por ejemplo, sepsis y/o inflamación) durante el estudio. Los resultados resumidos en la Tabla 5 sugieren que los apósitos de acuerdo con realizaciones ejemplares de la invención en realidad aceleran la curación de heridas con relación al estándar disponible anteriormente en apósitos para el cuidado.

10 Como alternativa o adicionalmente, los resultados presentados en este ejemplo demuestran claramente que en las 7 heridas tratadas con un apósito de sangre entera coagulada de acuerdo con realizaciones ejemplares de la invención, el apósito promueve la curación.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de un apósito para heridas, comprendiendo el procedimiento:
 - (a) proporcionar un volumen de sangre entera recogida;
 - (b) coagular dicha sangre entera para formar un coágulo *ex vivo*; y
 - (c) formar un apósito para heridas que comprende el coágulo.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende cortar una porción de dicho coágulo en dimensiones adecuadas para colocar un apósito sobre una herida específica.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende proporcionar una estructura de soporte sobre la que se forma dicho coágulo.
4. Un procedimiento de producción de un apósito biológico para heridas que comprende,
 - (a) difundir una unidad de sangre entera sobre una malla para cubrir un área; y
 - (b) permitir la coagulación de la sangre entera para formar con ello una lámina de sangre coagulada con la malla incrustada en dicho coágulo.
5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende la adición de un iniciador de coagulación antes de dicha difusión.
6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho iniciador de coagulación se selecciona para neutralizar una actividad de un anticoagulante en dicha unidad.
7. Un banco de apósitos biológicos para heridas, comprendiendo el banco:
 - una pluralidad de láminas estériles de sangre entera coagulada; y
 - información de compatibilidad cruzada para cada una de dichas láminas.

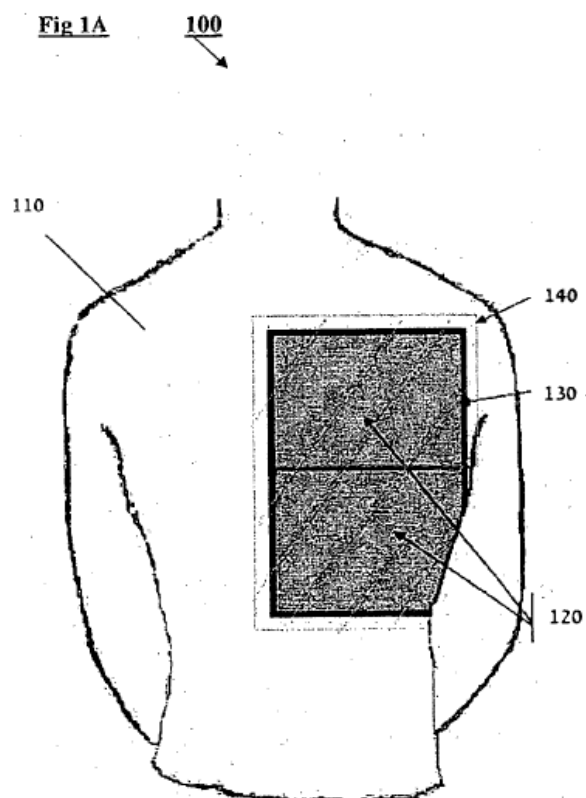


Fig. 1B

102

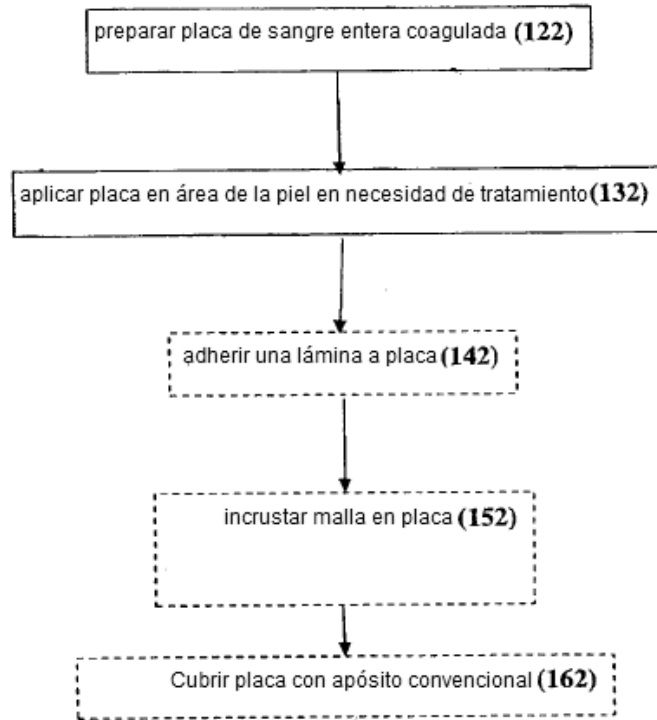


Fig. 1C **104**

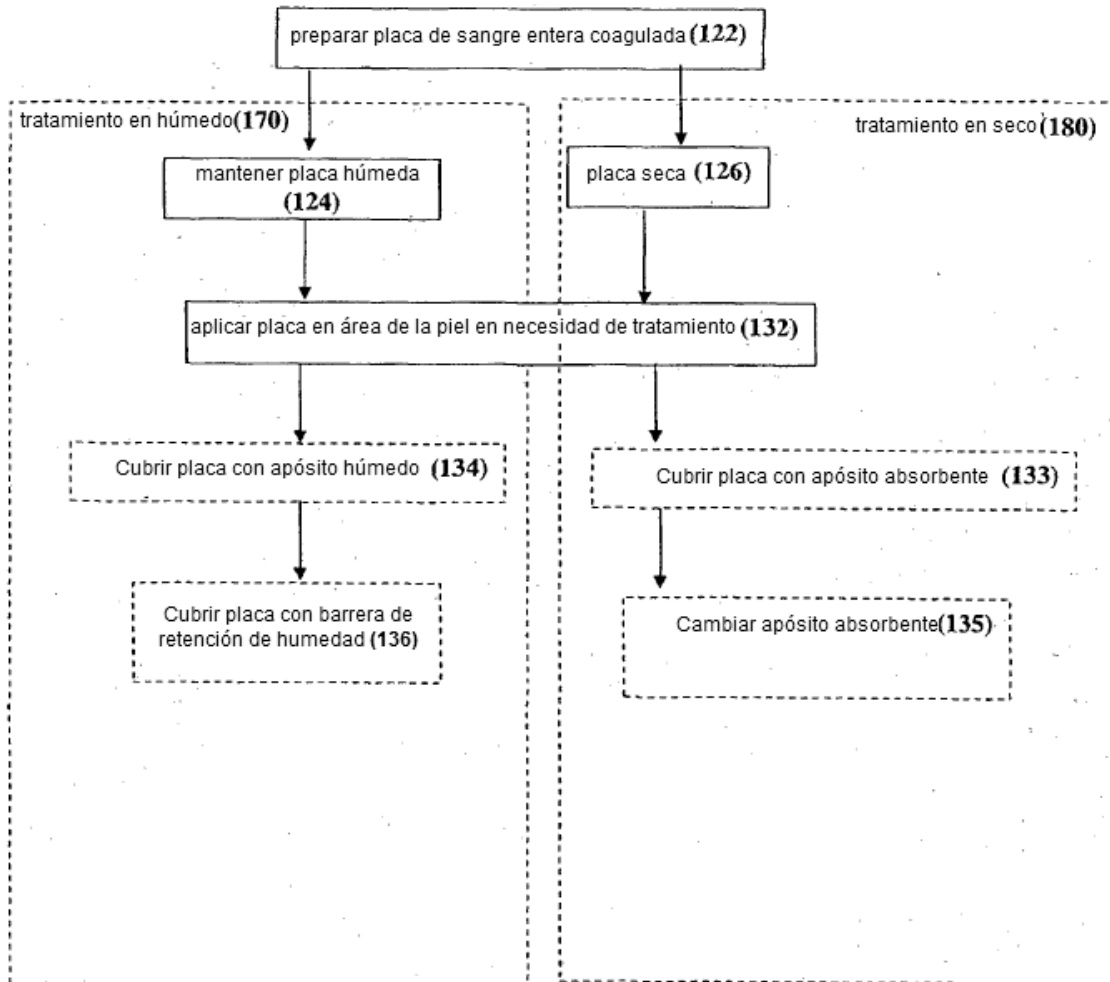


Fig. 2

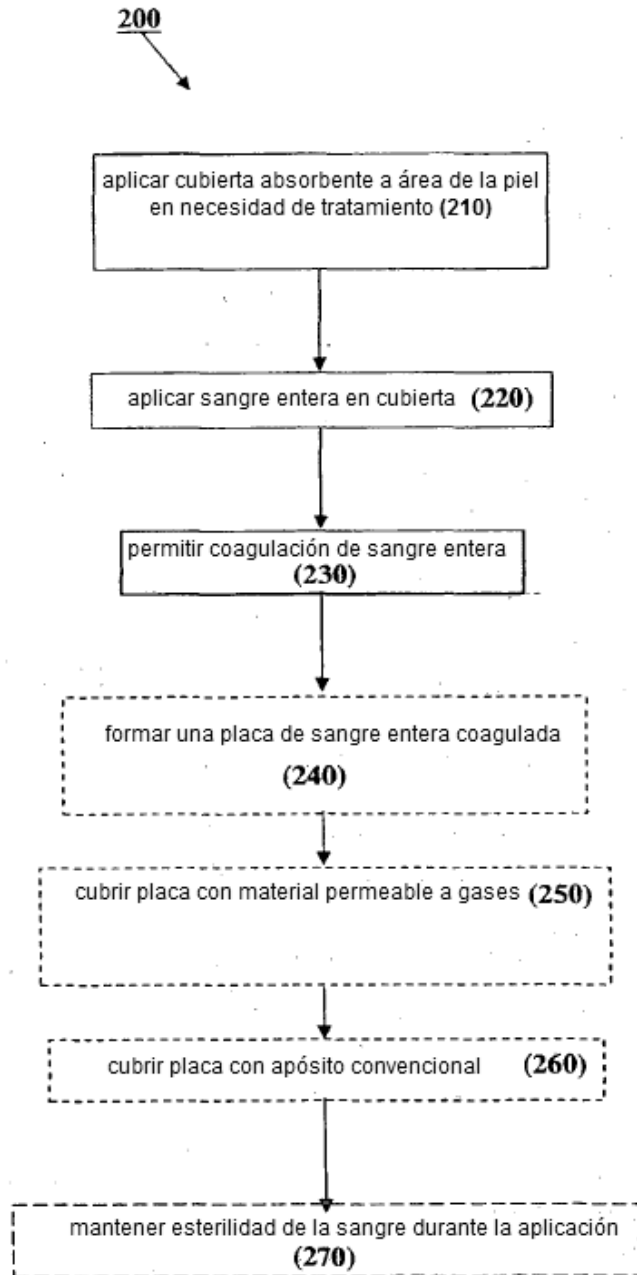
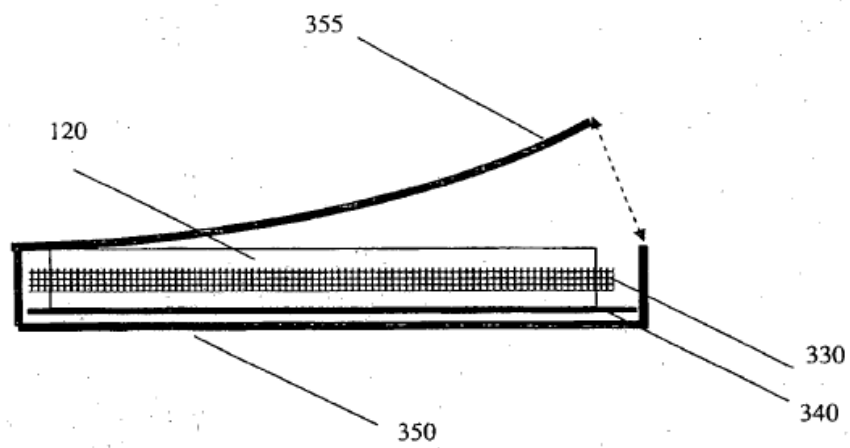


Fig. 3 300



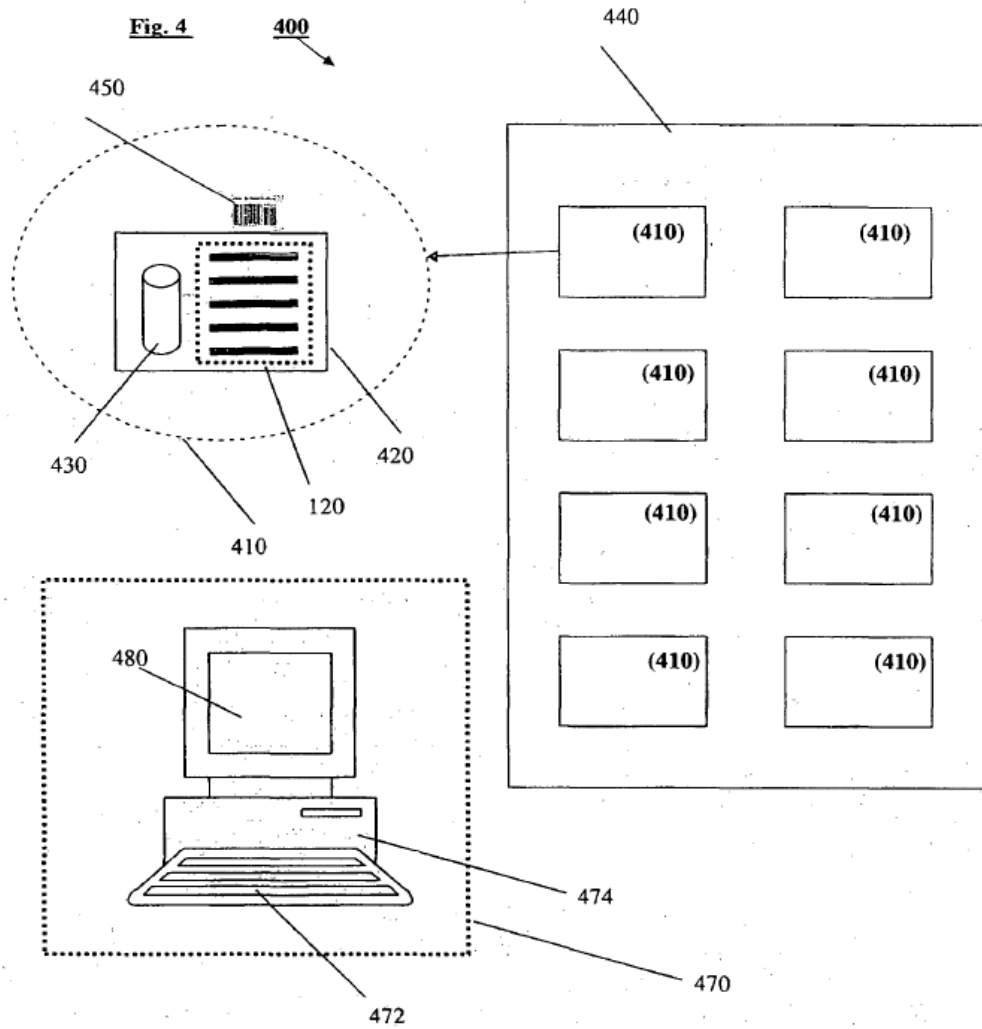


Fig. 5 **500**

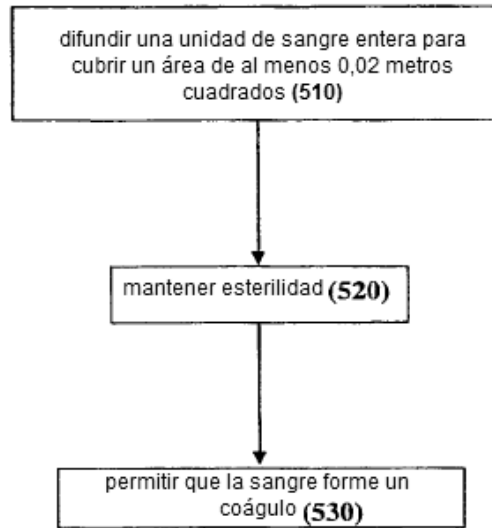


Fig. 6A

600

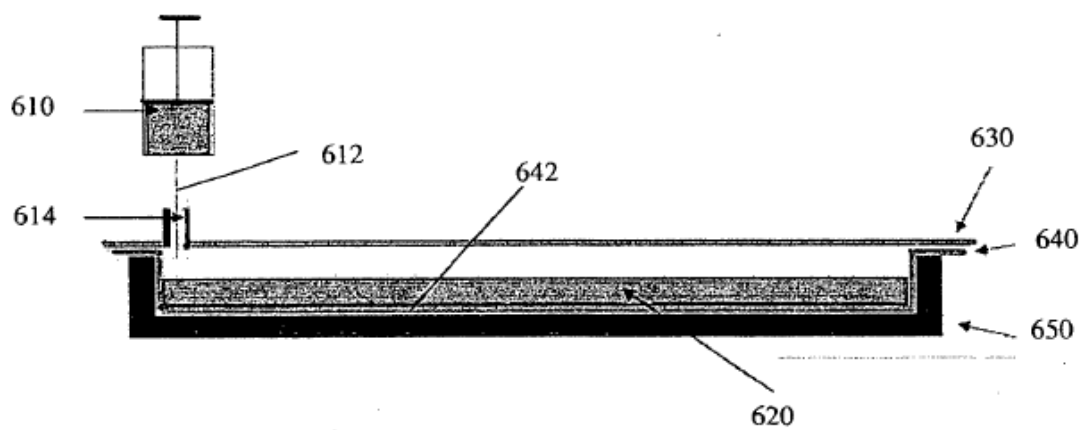
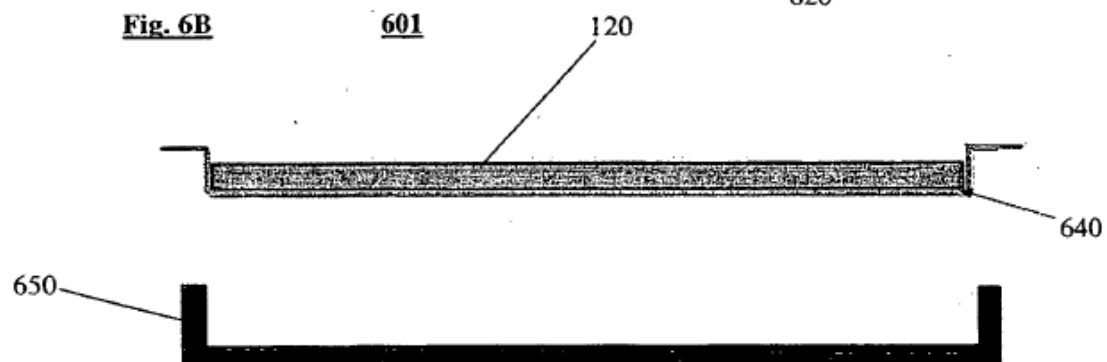


Fig. 6B

601



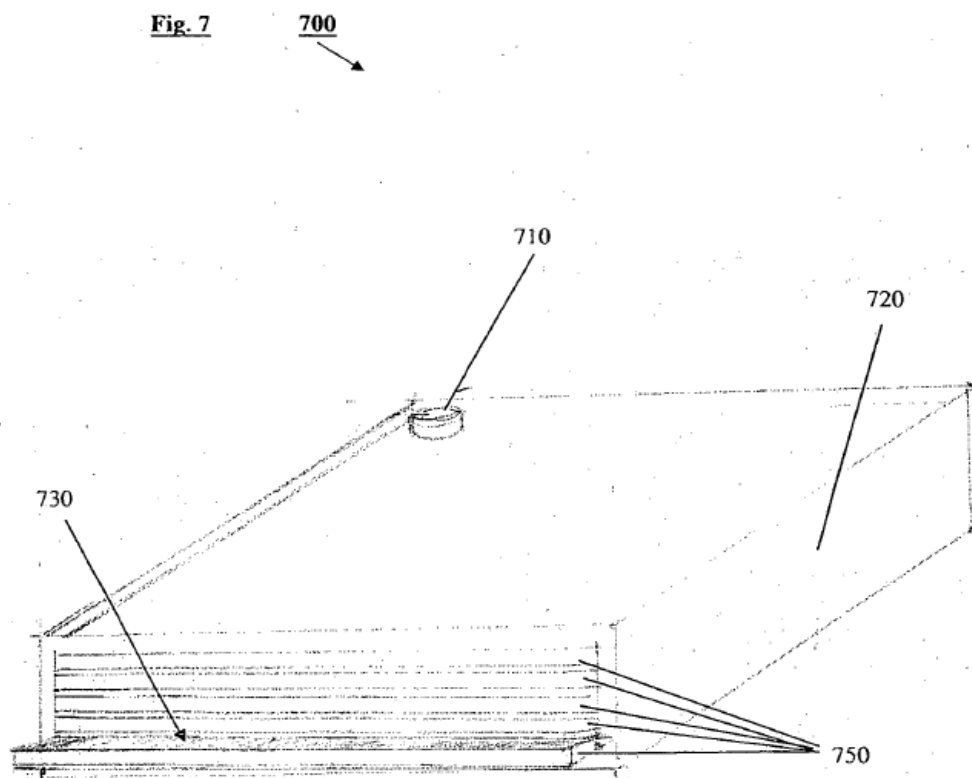


Fig. 8

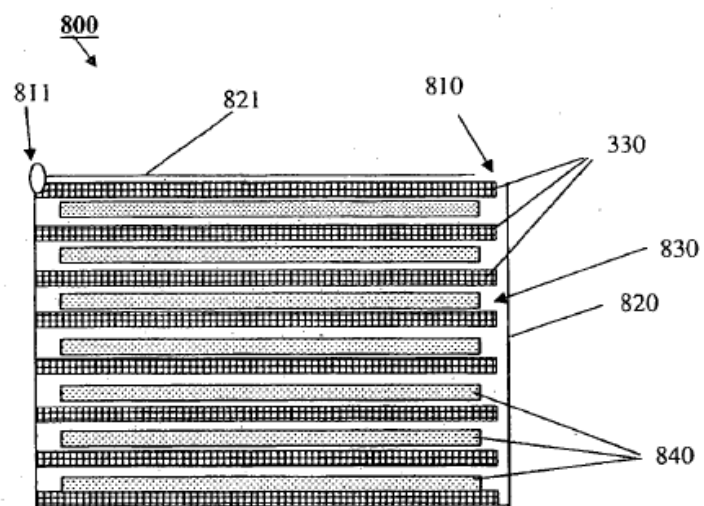


Fig. 9

900

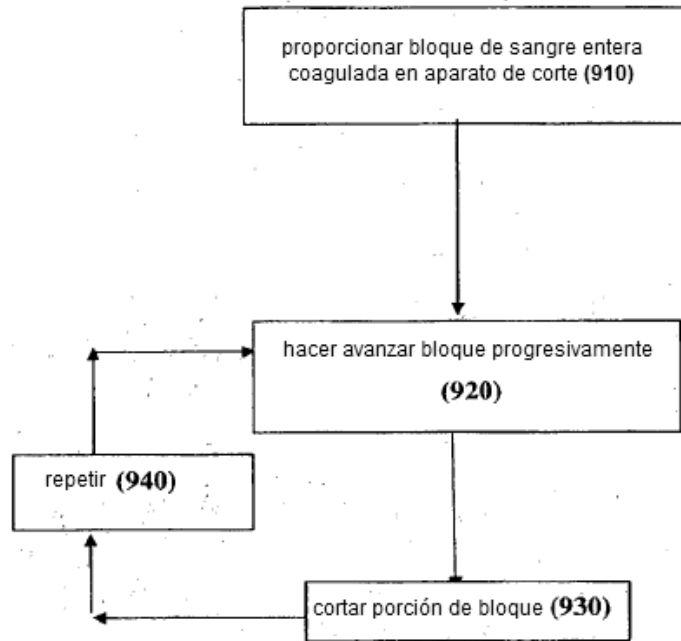


Fig. 10

1000
↓

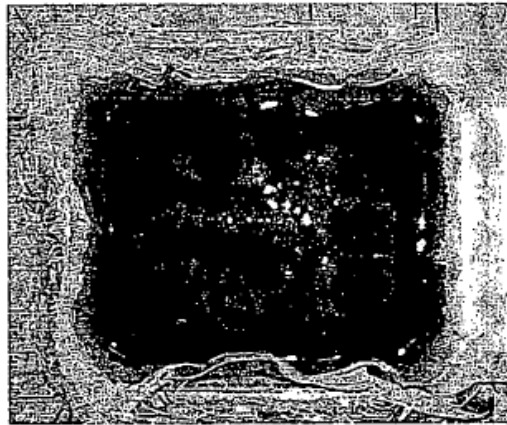


Fig. 11

1100
↓

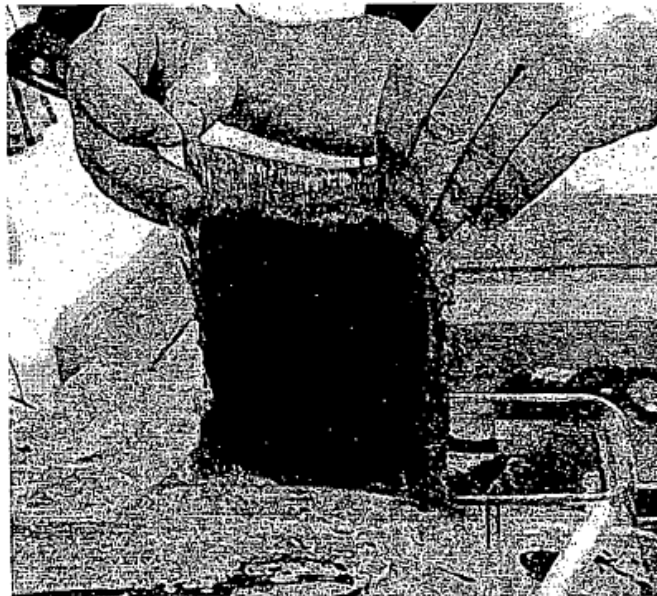


Fig. 12

1200

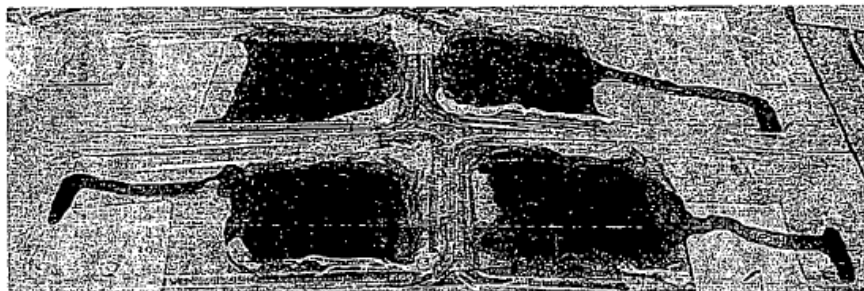


Fig. 13

1300

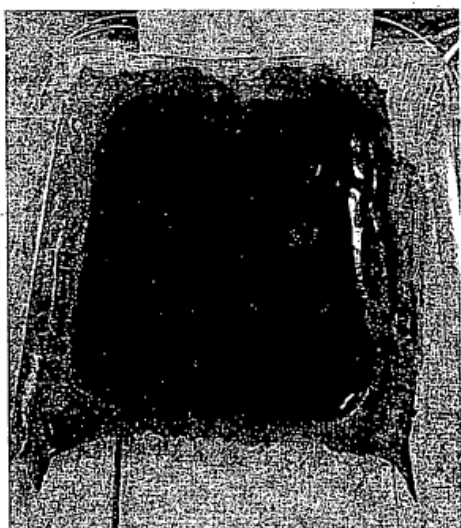


Fig. 14

1400



Fig. 15

1500

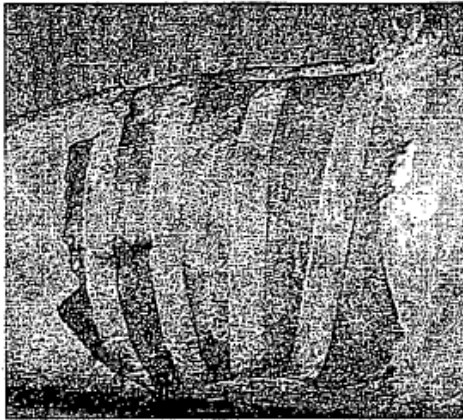


Fig. 16A

1600

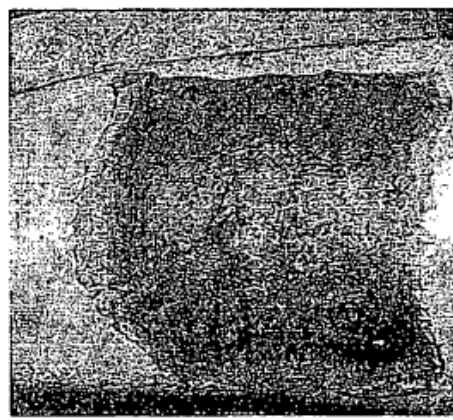


Fig. 16B

1602

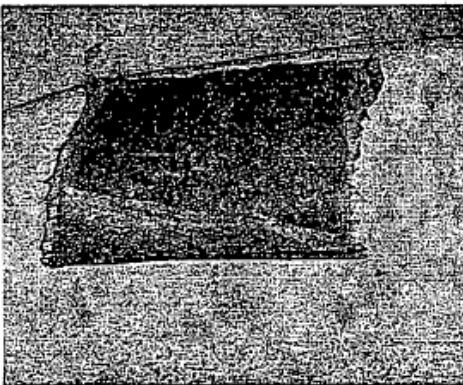


Fig. 16C

1604



Fig. 17A

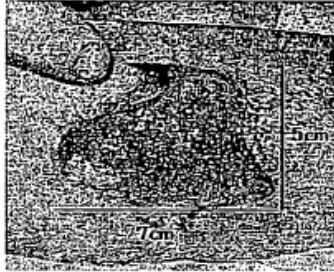


Fig. 17B

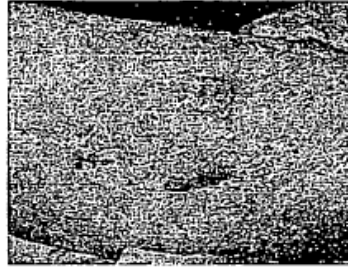


Fig. 18A

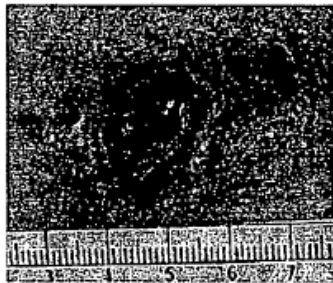


Fig. 18B



Fig. 19A



Fig. 19B



Fig. 20A



Fig. 20B

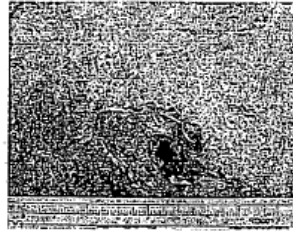


Fig. 21A

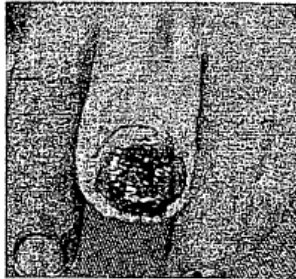


Fig. 21B

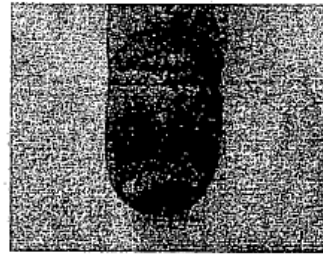


Fig. 22A

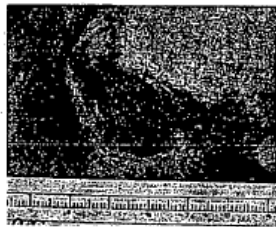


Fig. 22B

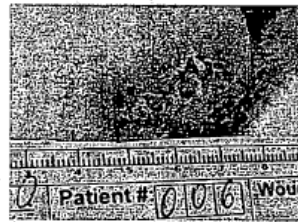


Fig. 23A



Fig. 23B

