

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 609**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.08.2011 PCT/FR2011/051919**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2012 WO12022914**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2011 E 11758509 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2605781**

54 Título: **Procedimiento de liofilización de plasma sanguíneo**

30 Prioridad:

**16.08.2010 FR 1056619**

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

**03.04.2017**

73 Titular/es:

**ETAT FRANÇAIS (MINISTÈRE DE LA DÉFENSE),  
SERVICE DE SANTE DES ARMEES (100.0%)  
La Rotonde" - 26, Boulevard Victor  
00457 Armees, FR**

72 Inventor/es:

**SAILLIOL, ANNE**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

**ES 2 607 609 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**

Procedimiento de liofilización de plasma sanguíneo

**5 Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un plasma liofilizado desleucocitado, viroatenuado, exento de anticuerpos hemolizantes y compatible con todos los grupos sanguíneos.

**10 Estado de la técnica**

El "plasma sanguíneo" o "plasma" es el componente líquido de la sangre, en el que las células sanguíneas están en suspensión. El plasma puede prepararse de sangre total por centrifugación o filtración a través de la membrana. El plasma sanguíneo está constituido esencialmente por agua, proteínas plasmáticas (principalmente albúmina y anticuerpos) y factores de coagulación tal como el fibrinógeno.

El plasma sanguíneo se utiliza en terapéutica para el tratamiento de coagulopatías graves con colapso de todos los factores de coagulación, así como para el tratamiento de hemorragias agudas, con déficit global de factores de coagulación.

Actualmente, el plasma terapéutico es plasma reciente congelado (PRC) viroatenuado. Un plasma de este tipo requiere una conservación a una temperatura inferior o igual a -25 °C, lo que implica que su administración solo puede efectuarse después de la descongelación en condiciones específicas. Además, este tipo de plasma no puede conservarse durante más que un año, lo que genera pérdidas consecuentes. Por último, este plasma terapéutico debe utilizarse con precaución ya que su administración debe respetar las normas de dispensación basadas en las compatibilidades ABO de los receptores. Debido a las restricciones relacionadas con su utilización y su conservación y por tanto su disponibilidad, un plasma de este tipo reciente congelado se considera inadecuado para una aplicación en situaciones de emergencia, particularmente en acciones militares.

Existe por tanto una necesidad de un plasma que responda a las limitaciones operativas de los militares en los escenarios de campos de batalla, que puedan conservarse a temperatura ambiente, exento de cualquier forma de contaminación bacteriana, vírica o parasitaria y compatible con cualquier receptor, independientemente de su grupo sanguíneo ABO.

**35 Objeto de la invención**

Como resultado de largas e intensas investigaciones, los autores de la invención han desarrollado un procedimiento de preparación de un plasma liofilizado cuyas características responden a estos requisitos de conservación y utilización.

Por tanto, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de plasma liofilizado atenuado que comprende las etapas siguientes:

- a) la selección de plasmas unitarios desleucocitados y atenuados fisicoquímicamente;
- b) la mezcla de plasmas unitarios seleccionados; y
- c) la liofilización de dicha mezcla de plasmas.

El procedimiento de la invención permite la obtención final de un "plasma liofilizado" o "plasma criodesecado", gracias a una etapa de liofilización apropiada. El plasma obtenido después de la reconstitución de plasma liofilizado en un disolvente de recuperación, responde a los requisitos reglamentarios a los que se someten los plasmas actualmente utilizados en terapéutica, en particular, las concentraciones en factores de coagulación son satisfactorias (por ejemplo, la concentración del factor VIII es superior o igual a 0,5 UI/ ml) y no hay activación de la coagulación.

Por "plasma unitario" se entiende plasma recogido de un solo individuo donante. Este plasma unitario puede prepararse a partir de sangre total o recogerse por aféresis. Preferentemente, en el ámbito de esta invención, los plasmas unitarios que constituyen la mezcla de plasmas de la etapa b) del procedimiento de la invención se recogen por aféresis. Este plasma unitario se coloca en una bolsa de plasma. Generalmente estas bolsas contienen entre 200 y 250 ml de plasma unitario. Preferentemente, los plasmas unitarios constituyen la mezcla de plasmas de la etapa b) que responden a los mismos requisitos reglamentarios que a los que se someten los plasmas actualmente utilizados en terapéutica. Por tanto, respetan los requisitos en vigor, particularmente en cuanto a tasas de factores de hemostasis. Los individuos donantes deben por tanto respetar los criterios de elegibilidad reglamentarios para donar plasma. Preferentemente, los plasmas unitarios se obtienen de donantes masculinos o exentos de anticuerpos anti-HLA. Adicionalmente, en el contexto de la presente invención, los donantes deben presentar un resultado de hemostasis normal y caracterizado por una tasa de factor VIII al menos o igual a 0,9 UI/ ml.

Por "individuo donante" se entiende un individuo que puede hacerse donante de sangre o de componentes sanguíneos.

Por "mezcla de plasmas" o "lote transfusional" se entiende una mezcla de plasmas unitarios.

Por "sangre total" se entiende el conjunto de compuestos y de células que constituyen la sangre.

Por "aféresis" se entiende una técnica de extracción, en un donante, de determinados compuestos sanguíneos. Los componentes que se desean extraer se preparan por centrifugación y se almacenan, mientras que los componentes no extraídos se reinyectan al donante.

### Descripción detallada de la invención

En un modo de realización particular, los plasmas unitarios que constituyen la mezcla de plasmas de la etapa b) del procedimiento de acuerdo con la invención se obtienen a partir de al menos diez individuos donantes diferentes. Una limitación de este tipo, en cuanto al número de individuos donantes, permite reducir considerablemente el riesgo infeccioso residual beneficiándose al mismo tiempo de las ventajas de la mezcla: inmunogeneidad reducida y obtención de un plasma universal para el grupo sanguíneo. Permite además una trazabilidad simplificada de los individuos donantes.

En el presente documento también se describe un modo de realización en el que los plasmas unitarios que constituyen la mezcla de plasmas de la etapa b) del procedimiento de acuerdo con la invención se obtienen a partir de a lo sumo veinte individuos donantes diferentes.

Preferentemente, dichos individuos donantes pertenecen al grupo sanguíneo AB. Por tanto, la selección de plasmas unitarios se efectúa de tal manera que cada uno de los plasmas utilizados corresponde a plasmas obtenidos a partir de individuos donantes que pertenecen al grupo sanguíneo AB. Los plasmas unitarios obtenidos a partir de individuos donantes que pertenecen a este grupo se caracterizan por una ausencia de aglutininas anti-A y anti-B, lo que permite la administración de su plasma independientemente del grupo sanguíneo ABO del receptor. Esta situación ideal es raramente posible dada la escasez de individuos donantes que pertenecen al grupo sanguíneo AB. Asimismo, en un modo de realización particular de la invención, dichos individuos donantes se caracterizan por que al menos uno de dichos individuos donantes pertenece al grupo sanguíneo A y por que al menos uno de dichos individuos donantes pertenece al grupo sanguíneo B y por que el volumen de plasma obtenido a partir de uno o más de los individuos donantes que pertenecen al grupo sanguíneo A es idéntico al volumen de plasma obtenido a partir de uno o más de los individuos donantes que pertenecen al grupo sanguíneo B.

De este modo, la selección de plasmas unitarios puede efectuarse de tal manera que, entre los individuos donantes de plasmas unitarios, algunos pertenecen al grupo sanguíneo A, otros al grupo sanguíneo B y eventualmente otros al grupo sanguíneo AB. En cualquiera de los casos, el volumen de plasma obtenido a partir de individuos donantes que pertenecen al grupo sanguíneo A es idéntico al volumen de plasma obtenido a partir de individuos donantes que pertenecen al grupo sanguíneo B.

Por ejemplo, los plasmas unitarios que constituyen la mezcla de plasmas de la etapa b) del procedimiento pueden sin recogerse de individuos donantes cuyos grupos sanguíneos son los siguientes:

- 4 individuos donantes pertenecientes al grupo sanguíneo A;
- 4 individuos donantes pertenecientes al grupo sanguíneo B; y
- 2 individuos donantes pertenecientes al grupo sanguíneo AB.

En este caso particular, es conveniente tener en cuenta que el volumen de plasma obtenido a partir de cuatro individuos donantes pertenecientes al grupo sanguíneo A sea idéntico al volumen de plasma obtenido a partir de 4 individuos pertenecientes al grupo sanguíneo B.

Por tanto, gracias a la selección de plasmas unitarios, la invención palía el inconveniente relacionado con el número reducido de individuos donantes perteneciente al grupo AB, denominados "donantes de plasma universales", para la obtención de un plasma administrable a cualquier individuo receptor independientemente de su grupo sanguíneo ABO.

En un modo de realización particular, la mezcla de plasmas de la etapa b) de procedimiento comprende:

- De 20 a 50 %, preferentemente de 30 a 50 %, más preferentemente de 40 a 45 % en volumen de plasmas unitarios obtenidos a partir de individuos donantes pertenecientes al grupo sanguíneo A;
- De 20 a 50 %, preferentemente de 30 a 50 %, más preferentemente de 40 a 45 % en volumen de plasmas unitarios obtenidos a partir de individuos donantes pertenecientes al grupo sanguíneo B;
- De 0 a 60 %, preferentemente de 0 a 45 %, más preferentemente de 10 a 20 % en volumen de plasmas unitarios obtenidos a partir de individuos donantes pertenecientes al grupo sanguíneo AB;

Por "grupo sanguíneo", se entiende una clasificación de sangre que se basa en la presencia o ausencia de sustancias antigénicas sobre la superficie de los hematíes. Estas sustancias antigénicas definen el sistema ABO. El antígeno A, o aglutinógeno A, corresponde a una N-acetilgalactosamina. El antígeno B, o aglutinógeno B, corresponde a una galactosa. El sistema ABO dictamina las normas de compatibilidad de la transfusión sanguínea.  
 5 El no respetar estas normas puede acarrear un accidente hemolítico al individuo transfundido. Como el plasma contiene anticuerpos en función del grupo en el sistema ABO, los glóbulos rojos del receptor no deben presentar los antígenos correspondientes. Por tanto, conviene no administrar un plasma que comprenda aglutininas anti-A a un paciente perteneciente al grupo sanguíneo A y viceversa. El plasma de los individuos donantes que pertenecen al grupo AB no contiene aglutininas anti-A o anti-B y por tanto conviene a todos los individuos receptores. Se habla por  
 10 tanto de "donantes de plasma universales".

Por "individuo perteneciente al grupo sanguíneo A, B o AB", se entiende un individuo que posee respectivamente el fenotipo A, B o AB.

15 Los plasmas unitarios que constituyen la mezcla de los plasmas de la etapa b) del procedimiento de la invención son plasmas desleucocitados. La presencia de leucocitos en los productos transfundidos puede causar efectos indeseables diversos tales como la transmisión de virus como el citomegalovirus. La desleucocitación permite también la reducción de reacciones febriles relacionadas con reacciones de antígenos-anticuerpos en el sistema HLA. Esta desleucocitación, también denominada "reducción de leucocitos" o "reducción leucocitaria", se efectúa por  
 20 filtración sobre el plasma recogido por aféresis. Como alternativa, esta desleucocitación puede efectuarse por filtración sobre el plasma preparado a partir de sangre total.

Preferentemente, los plasmas unitarios que constituye la mezcla de plasmas de la etapa b) están exentos de anticuerpos hemolizantes. La verificación de la ausencia de anticuerpos hemolizantes se efectúa directamente sobre  
 25 los plasmas unitarios recogidos en el individuo donante. De este modo, la ausencia de anticuerpos hemolizantes en los plasmas recogidos permite la obtención de una mezcla de plasmas de la etapa b) que no contiene ningún anticuerpo hemolizante.

Los "anticuerpos hemolizantes" o "hemolisinas" son inmunoglobulinas G o IgG que pueden encontrarse en el plasma y que pueden producir la lisis de los hematíes. Las hemolisinas anti-A son específicas de hematíes que presentan el aglutinógeno A, mientras que las hemolisinas anti-B son específicas de los hematíes que presentan el aglutinógeno B. Su presencia en un plasma terapéutico "universal" es inaceptable. La presencia de dichos anticuerpos hemolizantes en la mezcla de plasmas volvería inadecuado al producto obtenido por el procedimiento para una  
 30 utilización "universal" en terapéutica. De este modo los plasmas unitarios que constituyen la mezcla de plasmas de la etapa b) del procedimiento de la invención no deben contener hemolisinas anti-A o anti-B.

Preferentemente, los plasmas unitarios que constituyen la mezcla de plasmas de la etapa b) están exentos de aglutinina. Típicamente, los plasmas que no comprenden aglutininas, son plasmas obtenidos a partir de individuos pertenecientes al grupo sanguíneo AB.  
 40

Como alternativa, los plasmas unitarios que constituyen la mezcla de plasmas de la etapa b) presentan un título de aglutininas inferior a 64, preferentemente inferior a 32, preferentemente inferior a 16, preferentemente inferior 8, más preferentemente inferior a 4. La determinación del título de anticuerpos es muy conocida por el experto en la materia. Se trata de establecer una serie de diluciones de plasma y efectuar la relación de detección de aglutininas con cada  
 45 dilución. La dilución más alta que ofrece incluso una reacción positiva dará el título. De este modo, cuando en una dilución de 1/32 se detectan incluso las aglutininas a titular, aunque esta detección no se efectúe más a una dilución de 1/64, el título en aglutinina en este plasma es de 32.

Las aglutininas son inmunoglobulinas IgM presentes en el plasma y pueden de aglutinar los hematíes. Las aglutininas anti-A aglutinan los hematíes que presentan el aglutinógeno A. Las aglutininas anti-B aglutinan los hematíes que presentan el aglutinógeno B. La ausencia de aglutininas o su presencia a una concentración débil en la mezcla de plasmas obtenida en la etapa b) permite la obtención final de un plasma liofilizado de acuerdo con el procedimiento de la invención que podrá utilizarse, después de su reconstitución, en cualquier receptor, con independencia de su grupo sanguíneo.  
 50

Preferentemente, la mezcla de plasmas de la etapa b) del procedimiento está exenta de aglutinina irregular. Las aglutininas irregulares son anticuerpos que pueden estar presentes en el plasma y que se dirigen contra antígenos presentes en la superficie de los hematíes pero que no corresponden a los aglutinógenos A o B.  
 55

Los plasmas unitarios que constituyen la mezcla de plasmas de la etapa b) del procedimiento de la invención están viroatenuados o asegurados por tratamiento fisicoquímico.  
 60

Por "atenuación", "viroatenuación" o "aseguramiento", se entiende la eliminación de agentes patógenos que pueden de estar presentes en el plasma. Esta viroatenuación o aseguramiento destruye la mayoría de los patógenos con envoltura o sin envoltura o impide su replicación.  
 65

En el contexto de esta invención, la atenuación se hace por tratamiento fisicoquímico de plasmas unitarios, antes de su mezcla. Como alternativa, esta atenuación puede realizarse sobre la mezcla de plasmas obtenida en la etapa b). La atenuación por tratamiento fisicoquímico puede ser un tratamiento que utilice un agente fotoquímico, tal como amotosaleno o azul de metileno, o un disolvente-detergente.

5 Preferentemente, esta atenuación se efectúa utilizando un agente fotoquímico tal como amotosaleno, azul de metileno o riboflavina.

10 Por "agente patógeno" se entiende un contaminante bacteriano, vírico o parasitario. La presencia de dichos contaminantes es inaceptable para la utilización de un plasma en terapéutica.

15 Por "plasma atenuado" o "plasma viroatenuado" se entiende un plasma que ha experimentado una etapa de atenuación, es decir, la destrucción real o la inhibición de la replicación de agentes patógenos tales como contaminantes bacterianos, víricos o parasitarios.

20 En un modo de realización particular, los plasmas unitarios que constituyen la mezcla de plasmas de la etapa b) de procedimiento de la invención están atenuadas por acción de un agente fotoquímico seleccionado entre amotosaleno, riboflavina y azul de metileno. La utilización de un agente fotoquímico de este tipo implica la exposición a una agente luminosa. Cuando está activado por la luz de una longitud de onda apropiada, el agente fotoquímico, también denominado agente foto-oxidante, puede destruir directamente el contaminante bacteriano o vírico o bien inhibir su capacidad para replicarse. Una técnica de atenuación de plasma de este tipo es particularmente ventajosa porque permite la destrucción de cualquier contaminante, y comprende los que no son detectables por las técnicas clásicas de la técnica anterior. El experto en la materia conoce las condiciones operativas que permiten la eliminación de agentes patógenos usando un agente fotoquímico. Típicamente, este método se realiza siguiendo un protocolo estandarizado que se basa en la utilización de un dispositivo de uno solo. Al plasma se le añade al agente fotoquímico. A continuación, el plasma se somete a una fuente luminosa. La última etapa consiste en eliminar las trazas del agente fotoquímico residual y sus eventuales productos de degradación utilizando un filtro que permite su absorción. De acuerdo con la invención, esta técnica de eliminación de agentes patógenos se aplica preferentemente a cada plasma unitario recogido por aféresis.

30 Preferentemente, este agente fotogénico es el amotosaleno. La eliminación de agentes patógenos por amotosaleno presenta el interés de no conllevar una pérdida demasiado importante de factores de coagulación presentes en el plasma, y más particularmente el fibrinógeno (que juega un papel importante para la hemostasis del traumatismo hemorrágico) y el factor VIII. El amotosaleno es un derivado de psoralenos que se intercala de manera reversible a nivel de las bases pirimídicas de las moléculas de ADN o ARN, mono o bicatenario. La eliminación por la luz ultravioleta A (380 a 400 nm) crea enlaces covalentes irreversibles que interrumpen los ácidos nucleicos y bloquean su replicación, permitiendo de este modo reducir la carga bacteriana, vírica o parasitaria e inhibir la replicación bacteriana, vírica o parasitaria en el plasma antes de la liofilización. Este agente es particularmente eficaz para la inactivación de virus con envoltura o sin ella, de bacterias Gram + y Gram -, de espiroquetas, de esporas, parásitos y linfocitos residuales. Diversos estudios han mostrado que este agente no presenta riesgo de toxicidad a largo plazo ni de toxicidad reproductora. No es carcinógeno y no presenta ningún efecto tóxico notable. Típicamente, para que la eliminación de agentes patógenos sea eficaz, conviene tratar los plasmas unitarios con el amotosaleno a una concentración comprendida entre 100 et 200  $\mu\text{M}$ , preferentemente de aproximadamente 150  $\mu\text{M}$ . Después del tratamiento de los plasmas unitarios, conviene eliminar las trazas de amotosaleno residuales. El experto en la materia puede realizar ensayos de control para detectar la presencia de amotosaleno residual. Esta concentración en amotosaleno residual no debe superar preferentemente 2  $\mu\text{M}$ .

50 Preferentemente, este agente fotogénico es la riboflavina. La riboflavina, vitamina B2, es un compuesto natural, no tóxico, que cuando se utiliza en combinación con los rayos ultravioleta permite la inactivación de virus, bacterias y parásitos. Su utilización permite adicionalmente la neutralización de glóbulos blancos presentes en determinados constituyentes de la sangre. Típicamente la riboflavina se utiliza con ayuda del dispositivo Mirasol, comercializado por la sociedad CaradianBCT. Actualmente se utiliza para el tratamiento de plaquetas en suspensión en plasma y para el tratamiento de plasma reciente congelado. Los inventores han mostrado que este sistema también es muy adecuado para una utilización en el contexto de la presente invención.

55 Les plasmas unitarios desleucocitados y atenuados pueden congelarse 8 horas después de la extracción en los individuos donantes. Los plasmas así congelados se conservan a continuación a una temperatura inferior o igual a -25°C hasta la preparación de la mezcla de estos plasmas. Después, estos plasmas se descongelan antes de proceder a su mezcla. Típicamente los pulsamos unitarios se descongelan en un baño maría a 37 °C. De este modo, la etapa a) puede realizarse de la siguiente manera:

- 65
- i. recogida de plasmas unitarios por aféresis;
  - ii. desleucocitación de dichos plasmas unitarios;
  - iii. atenuación fisicoquímica de dichos plasmas unitarios;
  - iv. ultracongelación de dichos plasmas unitarios 8 horas después de la recogida de los plasmas unitarios;
  - v. conservación de dichos plasmas unitarios congelados a una temperatura inferior o igual a -25°C;

vi. descongelación de los plasmas unitarios congelados, preferentemente en un baño maría a 37°C durante un tiempo inferior a 30 minutos, preferentemente durante un tiempo de 15 minutos aproximadamente.

5 De acuerdo con un modo de realización particular, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de plasma liofilizado atenuado que comprende las siguientes etapas:

a) la selección de plasmas unitarios desleucocitados y atenuados fisicoquímicamente por:

- 10 i. recogida plasmas unitarios por aféresis;  
 ii. desleucocitación de dichos plasmas unitarios;  
 iii. atenuación fisicoquímica de dichos plasmas unitarios;  
 iv. ultracongelación de dichos plasmas unitarios 8 horas después de la recogida de los plasmas unitarios;  
 v. conservación de dichos plasmas unitarios congelados a una temperatura inferior o igual a -25°C;  
 15 vi. descongelación de los plasmas unitarios congelados;

b) la mezcla de plasmas unitarios seleccionados; y

c) la liofilización de dicha mezcla de plasmas.

20 En un modo de realización particular, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de plasma liofilizado asegurado que comprende las siguientes etapas:

- 25 A) la selección de plasmas unitarios desleucocitados y asegurados por amotosaleno y que proviene de donantes que presentan un resultado de coagulación normal y una taxa de factor VIII superior a 0,9 UI/ ml, obteniéndose dichos plasmas a partir de a lo sumo diez individuos donantes diferentes y seleccionándose dichos donantes entre los donantes masculinos o los donantes exentos de anticuerpos anti-HLA;  
 B) la mezcla de los plasmas unitarios seleccionados; y  
 C) la liofilización de dicha mezcla de plasmas.

30 El procedimiento de la invención comprende una etapa de mezcla de plasmas unitarios. Se obtiene por tanto un "lote transfusional". La mezcla de plasmas unitarios se efectúa a temperatura ambiente. Típicamente, los plasmas unitarios (contenidos en las bolsas de plasmas) se mezclan para obtener un lote transfusional de volumen comprendido entre 2.000 y 10.000 ml, preferentemente entre 2.500 y 9.000 ml. En un primer modo de realización, este lote transfusional tiene un volumen comprendido entre 2.500 y 4.000 ml, preferentemente de aproximadamente 3.000 ml. En un segundo modo de realización, este lote transfusional tiene un volumen comprendido entre 35 aproximadamente 5.000 y aproximadamente 9.000 ml, preferentemente de aproximadamente 6.000 ml. se obtiene así una mezcla de plasmas unitarios cuya administración puede realizarse independientemente del grupo sanguíneo del individuo donante.

40 Típicamente, el contenido de este lote transfusional se distribuye en matraces de vidrio para perfusión de 500 ml. Esta distribución se realiza en condiciones estériles. Cada matraz contiene de este modo una cantidad de plasmas de 200 a 250 ml, preferentemente de 215 ml. Estos matraces, que se denominan "de tipo I", son característicos porque son neutros y no interaccionan con su contenido. De este modo, no se produce ninguna reacción entre el matraz y el plasma que contiene. Este tipo de matraz está adaptado para la preparación de un producto inyectable. Estos matraces responden a los requisitos de la farmacopea y se accede a ellos fácilmente en el comercio.

45 El procedimiento de la invención comprende una etapa c) de liofilización de la mezcla de plasmas atenuados. Esta etapa de liofilización es particularmente delicada porque conviene no comprometer las propiedades hemostáticas de la mezcla de los plasmas atenuados. Conviene por tanto de controlar el equilibrio entre una tasa de humedad residual muy débil y la conservación de factores de coagulación, que pueden parecer particularmente sensibles al procedimiento agresivo de liofilización. Típicamente, esta etapa de liofilización se efectúa en matraces de tipo I de 50 una capacidad de 500 ml que contienen las mezclas de plasmas tales como las obtenidas anteriormente. Típicamente, cada matraz contiene aproximadamente 215 ml de plasma y se coloca en un estante del liofilizador.

55 Preferentemente, la etapa c) de liofilización permite la obtención de un plasma liofilizado que presenta una tasa de humedad inferior a 2 %, preferentemente inferior a 1 %.

Típicamente, la liofilización de la etapa c) comprende varias fases: congelación, desecación primaria o sublimación y desecación secundaria o secado final.

60 Por "liofilización" o "criodesecación", se entiende una operación de deshidratación a baja temperatura que consiste en eliminar por sublimación, la mayor parte del agua contenida en un producto. Permite una conservación a largo plazo gracias a la disminución de la actividad del agua del producto. Preferentemente, en el contexto de esta invención, la liofilización comprende una fase de congelación rápida a -50 °C en la cual el agua contenida en el plasma se solidifica. Típicamente, esta etapa de congelación se efectúa con una rampa de una duración 65 comprendida entre 15 minutos y 60 minutos, preferentemente de aproximadamente 30 minutos y un escalón de una duración comprendida entre 100 y 600 minutos, preferentemente de aproximadamente 300 minutos.

A continuación, interviene una fase de sublimación, denominada también desecación primaria, que va a acarrear el paso del agua de la forma sólida a la forma de vapor, sin pasar por la forma líquida. Esta etapa se realiza a una presión inferior a 300 µBar y a una temperatura comprendida entre 10 y 15 °C. Típicamente, el primer escalón a 10 °C tiene una rampa de una duración comprendida entre 20 y 120 minutos, preferentemente de aproximadamente 60 minutos y un escalón de una duración comprendida entre 2.000 y 4.000 minutos, preferentemente de aproximadamente 3.000 minutos. El segundo escalón a 15 °C tiene una rampa de una duración comprendida entre 130 minutos, preferentemente de aproximadamente 10 minutos y un escalón de una duración comprendida entre 800 y 2.000 minutos, preferentemente de aproximadamente 1.200 minutos.

La última etapa, comúnmente denominada "secado final" o "desecación secundaria", es la etapa de consiste en extraer el agua por desorción, que queda atrapada en el producto. El agua atrapada corresponde a las moléculas de agua que quedan incluidas en la superficie de un producto sometido a una desecación primaria. Esta etapa de secado al final se efectúa a una temperatura comprendida entre 30 y 35 °C a una presión reducida de 30 µBar aproximadamente. Típicamente, el primer escalón 35 °C tiene una rampa de una duración comprendida entre 2.000 y 15.000 minutos, preferentemente de 6.000 minutos y un escalón de una duración comprendida entre 800 y 2.000 minutos, preferentemente de 1.200 minutos. El segundo escalón a una temperatura de 30 °C tiene una rampa de una duración comprendida entre 2.000 y 1.000 minutos, preferentemente de 480 minutos y un escalón de una duración comprendida entre 1.200 y 2.500 minutos, preferentemente de 1.800 minutos.

Este protocolo de liofilización y sus condiciones particulares permiten la obtención de un plasma liofilizado que presenta una tasa de humedad inferior a 2 %, preferentemente inferior a 1 %.

En el presente documento también se describe un plasma liofilizado y compatible con todos los grupos sanguíneos. Preferentemente, este plasma liofilizado está desleucocitado, atenuado y exento de anticuerpos hemolizantes para responder a los requisitos reglamentarios. Se habla de "Plasma Criodesecado Asegurado" (PCSS) o "plasma liofilizado" (FLYP: "French Lyophilised Plasma ").

Típicamente, este plasma liofilizado comprende una mezcla de plasmas recogidos de individuos donantes cuyo al menos uno pertenece al grupo sanguíneo A y al menos uno pertenece al grupo sanguíneo B y el volumen de plasma obtenido a partir de uno o más individuos donantes pertenecientes al grupo sanguíneo A es idéntico al volumen de plasma obtenido a partir de uno o más individuos donantes pertenecientes al grupo sanguíneo B.

Este plasma liofilizado presenta una tasa de humedad inferior a 2 %, preferentemente inferior a 1 %. Otra característica es que puede almacenarse a temperatura ambiente o en un recinto refrigerado a una temperatura comprendida entre 2 °C y 25 °C y durante un tiempo de tres años, preferentemente a dos años.

Preferentemente, este plasma sanguíneo liofilizado es estéril. En el presente documento también se describe un procedimiento de preparación de plasma reconstituido que comprende la etapa de reconstitución de plasma liofilizado desleucocitado, atenuado, exento de anticuerpos hemolizantes y compatible con todos los grupos sanguíneos en un disolvente de recuperación. La reconstitución de plasma permite así la obtención de una preparación inyectable, que puede administrarse a cualquier receptor en condiciones de emergencia.

Típicamente, la reconstrucción de plasma se efectúa en un volumen de disolvente de recuperación comprendido entre 100 y 400 ml, preferentemente de 200 ml. Típicamente esta reconstitución se efectúa con un volumen que permite obtener un plasma isoosmótico.

Preferentemente, este disolvente de recuperación es agua y más preferentemente agua para preparaciones inyectables. Preferentemente, la reconstrucción de plasma liofilizado para la obtención de una preparación inyectable se efectúa en menos de 6 minutos, preferentemente en menos de 3 minutos.

De este modo, la utilización del plasma descrito en el presente documento es muy ventajosa y se ahorra un tiempo necesario para la descongelación durante la utilización de plasma reciente congelado.

En el presente documento también se describe un plasma reconstituido, desleucocitado, atenuado, exento de anticuerpos hemolizantes y compatible con todos los grupos sanguíneos. Dicho plasma reconstituido puede administrarse a cualquier individuo independientemente, de su grupo sanguíneo. Por tanto, es muy adecuado para una utilización en condiciones de emergencia, particularmente en el terreno de acciones militares, pero también en el sector civil, para el tratamiento de urgencias hemorrágicas con coagulopatía, particularmente en situaciones aisladas con condiciones logísticas que no permiten controlar una cadena de frío negativo. El plasma reconstituido de acuerdo con la invención presenta adicionalmente la ventaja de que gran parte de los agentes patógenos están destruidos lo que reduce considerablemente la posible difusión de patógenos a los individuos receptores. Este plasma reconstituido responde a todos los requisitos reglamentarios a los que se someten los plasmas utilizados en terapéutica.

Preferentemente, el plasma reconstituido descrito en el presente documento está exento de anticuerpos

hemolizantes.

Preferentemente, el plasma reconstituido descrito en el presente documento está exento de aglutinina. Como alternativa, el plasma reconstituido de acuerdo con la invención presenta un título de aglutininas inferior a 64, preferentemente inferior a 32, preferentemente inferior a 16, preferentemente inferior a 8, y más preferentemente inferior a 4.

Preferentemente, el plasma reconstituido descrito en el presente documento está exento de aglutinina irregular. El plasma reconstituido de la invención se caracteriza por que la concentración de factor VIII es superior a 0,2 UI/ ml, preferentemente superior a 0,5 UI/ ml, preferentemente superior a 0,7 UI/ ml, más preferentemente superior a 0,9 UI/ ml e incluso más preferentemente está comprendida entre 0,5 y 1,5 UI/ ml.

El plasma reconstituido descrito en el presente documento se caracteriza por que la concentración de factor V es superior a 0,15 UI/ ml y preferentemente está comprendida entre 0,7 y 1,2 UI/ ml. Las unidades internacionales (UI) para los factores de coagulación expresan la actividad plasmática de las proteínas a las que se aplica esta expresión. Una unidad internacional (UI) de estas proteínas plasmáticas corresponde a la cantidad de este factor contenida en un ml de plasma humano normal.

El plasma reconstituido descrito en el presente documento se caracteriza por la concentración de fibrinógeno superior a 1 g/l y más preferentemente que está comprendido entre 2 y 4 g/l.

El plasma reconstituido descrito en el presente documento se caracteriza por que es estéril y apirógeno.

Finalmente, en el presente documento se describe un kit que comprende:

- a) plasma liofilizado de acuerdo con la invención;
- b) una cantidad adecuada de disolvente de recuperación, preferentemente agua para preparaciones inyectables; y
- c) un prospecto explicativo.

En un modo de realización particular, dicho kit comprende adicionalmente:

- d) una ficha de seguimiento clínico y biológico que se introduce en el marco de una hemovigilancia activa; y
- e) una ficha técnica de aplicación de la trazabilidad del plasma de acuerdo con la invención.

Preferentemente este plasma liofilizado se presenta en una forma adaptada a su uso en el escenario de acciones militares y en entornos muy aislados con dificultades logísticas para controlar una cadena de frío negativo.

### Descripción de las figuras

**Figura 1:** Análisis de las tasas de hemoglobina, plaquetas y fibrinógeno antes y después de la perfusión de plasma liofilizado reconstituido de acuerdo con la invención en soldados sobre el terreno de acciones militares.

*Ns: significa no significativo*

**Figura 2:** Análisis de las tasas de protrombina (TP) antes y después de la perfusión de plasma liofilizado reconstituido de acuerdo con la invención.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1 Liofilización de una mezcla de plasmas

##### a) Selección de plasmas unitarios

Se recogen por aféresis aproximadamente 200ml de plasma de individuos donantes pertenecientes a los grupos sanguíneos A, B y AB.

Cada individuo donante puede donar 2 o 3 bolsas de plasma por donación, pero puede introducirse más de una vez en la constitución de la mezcla. De este modo cada donante puede donar de aproximadamente 400 a aproximadamente 1.800ml de plasma.

Durante la recogida de plasma, se procede a la desleucocitación de dichos plasmas unitarios por filtración.

A continuación, se procede a la atenuación de dichos plasmas unitarios usando amotosaleno. Para esto, a cada una de las bolsas de plasma unitarias se añaden 15 ml de amotosaleno a una concentración de 150 µM. Los plasmas que comprenden amotosaleno se someten a una iluminación con luz ultravioleta A (380 a 400 nm) durante 5 a 10 minutos. Después del tratamiento, el amotosaleno se elimina por filtración sobre una resina absorbente.



A continuación, dichos plasmas unitarios atenuados se ultracongelan 8 horas después de su recogida. Esta etapa permite por tanto la conservación de dichos plasmas a una temperatura de -25 °C.

Quince minutos antes de proceder a la mezcla de los plasmas estos se descongelan en un baño maría a 37°C.

**b) Mezclas de plasmas unitarios seleccionados**

Se preparan 6 mezclas de plasmas M1 a M6, denominadas también lotes transfusionales. Cada una de las mezclas M1 a M6 corresponde a una mezcla de plasmas que se obtienen de individuos pertenecientes a los grupos sanguíneos A, B y AB. Por ejemplo, para la mezcla M1, se utilizan:

- 6 bolsas de plasmas (1327 ml de plasma) que se obtienen de 3 individuos donantes diferentes pertenecientes al grupo sanguíneo A,
- 6 bolsas de plasmas (1339 ml de plasma) que se obtienen de 3 individuos donantes diferentes pertenecientes al grupo sanguíneo B, y
- 2 bolsas de plasmas (445 ml de plasma) que se obtienen de 2 individuos donantes diferentes pertenecientes al grupo sanguíneo AB.

De este modo se obtiene una mezcla M1 que comprende 3111 ml de plasmas.

En la siguiente Tabla se detalla el volumen de los diferentes plasmas utilizados para estas mezclas y la distribución del grupo sanguíneo de los individuos donantes para cada una de las mezclas M1 a M6:

**Tabla 1: Distribución del grupo sanguíneo de los individuos donantes**

Mezcla	Volumen de plasma obtenido del donante de fenotipo A (ml)	Volumen de plasma obtenido del donante de fenotipo B (ml)	Volumen de plasma obtenido del donante de fenotipo AB (ml)
<b>M1</b>	1327	1339	445
<b>M2</b>	1329	1336	445
<b>M3</b>	1346	1352	437
<b>M4</b>	1264	1258	638
<b>M5</b>	1327	1338	442
<b>M6</b>	1315	1327	442

Se obtienen así 6 lotes transfusionales que comprenden de 3000 a 3300 ml de plasmas.

**c) Etapa de liofilización**

Las mezclas de plasmas se distribuyen en matraces de 500 ml “de tipo I”, de tal manera que cada uno de los matraces contenga 215 ml de mezcla de plasmas.

La liofilización de los plasmas contenidos en cada uno de los matraces previamente obtenidos se realiza en un liofilizador de tipo SMH 615, comercializado por USIFROID. Cada matraz se coloca en un estante. La liofilización se realiza en condiciones particulares detalladas a continuación.

*1. Pre-enfriamiento*

Esta etapa permite el enfriamiento de los estantes del liofilizador a una temperatura de -5 °C. Esta etapa permite evitar la degradación de factores de coagulación que son termosensibles durante el tiempo de la distribución. Los lotes se cargan según entran en el liofilizador.

*2. Congelación*

La mezcla de plasmas se congela a una temperatura de -50 °C. El producto se mantiene a esta temperatura durante 240 minutos. La duración de la rampa es de 30 minutos y la del escalón es de 300 minutos.

*3. Producción de vacío*

Para permitir la sublimación La composición y las características de los plasmas así reconstituidos se detallan, se procede a una producción de vacío del liofilizador. El vacío se efectúa durante dos minutos a una presión de 600 mBar.

*4. Sublimación*

Esta etapa se efectúa a una temperatura comprendida entre 10 y 15°C y una presión inferior a 300 µBar.

El primer escalón a 10°C de temperatura tiene una rampa de 60 minutos y un escalón de 3.000 minutos.

El segundo escalón con una temperatura de 15 °C tiene una rampa de 10 minutos y un escalón de 1.200 minutos.

5

*5. Desecación secundaria*

Esta etapa se efectúa a una temperatura comprendida entre 30 y 35 °C a una presión de 300 µBar.

10 El primer escalón a 35°C tiene una rampa de 600 minutos y un escalón de 1.200 minutos.

El primer escalón a 30°C tiene una rampa de 480 minutos y un escalón de 1.800 minutos.

**d) Controles de la calidad del liofilizado**

15

Este protocolo permite la obtención de un plasma liofilizado que presenta una tasa de humedad relativa inferior a 2 %.

**Ejemplo 2: Reconstrucción de plasmas liofilizados**

20

Se coge un matraz de 500 ml de cada uno de los lotes transfusionales M1 a M6. A cada uno de estos 6 matraces se añaden 200 ml de agua para preparaciones inyectables. De este modo se obtienen 6 plasmas reconstituidos PR1 a PR6.

25 Después de la reconstitución, el producto obtenido debe responder a los siguientes requisitos:

- tiempo de reconstitución inferior a 6 minutos;
- concentración de factor VIII superior o igual a 0,5 UI/l;
- ausencia de hemolisinas anti-A y anti-B;
- título de aglutininas anti-A y anti-B inferior a 64;
- ausencia de aglutininas irregulares; y
- concentración de proteínas superior o igual 50 g/l.

30

En la siguiente tabla se detalla la composición y las características de los plasmas reconstituidos de esta manera:

35

Tabla 2: Composiciones y características de plasmas reconstituidos

Parámetros	Unidades	PR 1	PR 2	PR 3	PR 4	PR 5	PR 6	Media de factores	Valor de referencia
Fibrinógeno	g/l	2,55	2,18	2,49	2,95	2,18	2,69	2,5 (2,2-3)	2-4
Factor V	UI/ml	0,42	0,43	0,58	0,81	0,41	0,51	0,53 (0,418-0,81)	0,7-1,2
Factor VIII	UI/ml	0,65	0,53	0,57	0,72	0,52	0,71	0,62 (0,52-0,72)	0,5-1,5
Factor XI	UI/ml	0,89	0,74	0,64	0,96	0,76	0,81	0,8 (0,64-0,96)	0,5-1,4
XIII	UI/ml	1,24	1,12	0,89	1,12	0,95	1,08	1,06 (0,89-1,24)	0,2-1,2
Proteína C	UI/ml	1,09	0,9	1,02	0,89	0,83	0,88	0,94 (0,89-1,09)	0,7-1,2
Proteína S	UI/ml	0,64	0,56	0,79	1,14	0,7	0,74	0,76 (0,56-1,14)	0,7-1,4
Antitrombina III	UI/ml	1,06	0,97	1,03	1,06	1,04	0,94	1 (0,94-1,06)	0,8-1,2
α2 Antiplasmina	UI/ml	0,94	0,98	0,92	1	0,97	0,96	0,96 (0,91-1)	0,8-1,2
Complejos TAT	p g/l	3,4	2,1	2,3	5,9	2	3,1	3,1 (2-5,9)	2-4,2
Fragmentos 1+2	pM	127	112	134	154	111	140	130	29-229
Hemolisinas		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Título anti-A		16	16	2	4	4	8	8	<64
Título anti-B		8	32	2	2	0	0	8	<64
Aglutininas Irregulares		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Proteínas totales	g/l	55,1	60,2	61,6	58	60	61	59,3	>50
Electroforesis de proteínas		Trazado normal	Trazado normal	Trazado normal	Trazado normal	Trazado normal	Trazado normal	Trazado normal	Trazado normal
Amotosaleno residual	pM	0,78	0,75	0,85				0,79	<2
Humedad	%	1,15	0,58	0,22	1,91	1,29	1,17	1,05	<2 %
Tiempo de reconstitución	segundos	125	270	205	145	140	130	169	<360

Los criterios medidos son conforme a los requisitos reglamentarios. El plasma obtenido de acuerdo con el procedimiento de la invención es por tanto adecuado para una utilización terapéutica.

**Ejemplo 3: Efecto de la liofilización sobre las coagulopatías y las hemorragias**

5 Los inventores han administrado el plasma liofilizado reconstituido de acuerdo con la invención en el escenario de las acciones militares, soldados que habían sufrido graves traumatismos tales como heridas por armas de fuego, explosiones e incluso colisiones.

10 *Materiales y métodos*

Antes y después de la perfusión del plasma liofilizado reconstituido de acuerdo con la invención, a los soldados objeto de la perfusión se les realizó un análisis de sangre y de hemostasis.

15 Las variables así recogidas se analizaron de acuerdo con las técnicas estadísticas clásicas, basadas en el ensayo de la t de Student, el ensayo de Wilcoxon e incluso el de la  $\chi^2$ .

20 Se realizó perfusión en 87 soldados usando plasma liofilizado de acuerdo con la invención, de los cuales 32 eran víctimas de heridas por bala, 22 por politraumatismo, 10 por explosiones, 7 por traumatismo craneal y finalmente 4 por otros tipos de heridas.

Los datos relacionados con esta transfusión se resumen en la siguiente tabla:

**Tabla 3: Características sanguíneas de los soldados transfusionados**

Características antes de la administración de la sangre	Mediana	Intervalo	Porcentaje del paciente (%)
Eritrocitos (unidad)	3	1-13	32
Sangre total (unidad)	4	1-7	5
Cristaloide (l)	1	0,2-5	56
Coloide (ml)	500	100-8000	15
Factor VIIa (mg)	2	1-7	9
Fibrinógeno (g)	1,5	1-3	6

25 *Resultados*

En la figura 1 se muestran los resultados.

30 Las diferencias en las tasas de hemoglobina, de plaquetas y de fibrinógeno antes y después de la transfusión no parecen ser significativas. Además, los inventores han mostrado que el nivel de factores sanguíneos no se encuentra afectado y que la utilización del plasma de la invención no parece entrañar riesgos sobre la salud del soldado objeto de la perfusión de dicho plasma.

35 Por otro lado, los inventores han logrado mostrar que el plasma liofilizado de acuerdo con la invención permite controlar coagulopatías en las heridas de guerra. Adicionalmente, los inventores han recalcado el hecho de que la perfusión de plasma liofilizado sanguíneo de la invención permite reducir la tasa de protrombina, como se muestra en la Figura 2. Estos resultados indican que el plasma de la invención es eficaz para el tratamiento de hemorragias.

40 Finalmente, los resultados muestran que el plasma liofilizado de acuerdo con la invención permite obtener excelentes resultados con la ventaja principal de poder reconstituirse en menos de 6 minutos y de proporcionar una cantidad de 210 ml de plasma listo para emplear. Estos resultados son por tanto comparables a los que pueden obtenerse durante la perfusión con plasma reciente congelado.

45 **Ejemplo 4: Utilización de plasma liofilizado de acuerdo con la invención en el tratamiento de hemorragia masiva.**

50 Numerosos estudios muestran que la perfusión de plasma de manera consecuyente y precoz mejora considerablemente la supervivencia de los soldados en las acciones militares. Se realizó perfusión en 63 soldados utilizando de una a nueve bolsas de plasma de acuerdo con la invención.

Los inventores analizaron su sangre antes y después de la perfusión de dicho plasma. Los resultados muestran que la tasa de protrombina pasó de 17 segundos antes de dicha perfusión a 15,6 segundos después de dicha perfusión.

Esta disminución indica una mejora de la homeostasis, mejora que puede considerarse crucial previamente a una intervención quirúrgica.

La utilización de plasma liofilizado reconstituido de acuerdo con la invención no mostró ningún efecto indeseable.

5 **Ejemplo 5: Efecto de la liofilización sobre las capacidades hemostáticas globales del plasma liofilizado reconstituido de acuerdo con la invención**

10 Los inventores han estudiado el efecto de la liofilización sobre la calidad del plasma obtenido y su efecto sobre la hemostasis.

*Materiales y método*

15 Los inventores realizaron 27 lotes antes y después de la liofilización.

Usando ensayos colorimétricos y cronométricos los inventores han determinado el nivel de fibrinógeno, así como el de los factores de coagulación V, VIII, XI y XIII. También se realizó un ensayo de generación de trombina. Después, tras la dilución del plasma liofilizado y de un control estandarizado, se efectuó una tromboelastografía.

20 Finalmente, la sangre de 17 donantes sanos se diluyó hasta el 60 %:

- 60 % de lactato Ringer, o
- 30 % de lactato Ringer + 30 % de plasma liofilizado antes de la liofilización, o
- 30 % de lactato Ringer + 30 % de FDP después de la liofilización.

25 Finalmente se realizó una tromboelastografía.

*Resultados*

30 Los resultados obtenidos después de la liofilización se resumen a continuación:

- una disminución de aproximadamente 22 a 26 % en la actividad del factor VIII y del factor V (0,6 UI/ml  $\pm$  0,1);
- una disminución de aproximadamente 10 % en el nivel de la proteína S (0,8 UI/ml  $\pm$  0,2);
- ninguna disminución de la actividad del fibrinógeno (2,4 g/l  $\pm$  0,2), del factor X (0,8 UI/ml  $\pm$  0,1), del factor XIII (1 UI/ml  $\pm$  0,1), de la proteína C (0,9 UI/ml  $\pm$  0,1) y de la alfa2-antiplasmina (1 UI/ml  $\pm$  0,1);
- sin alteración de la generación de trombina; y
- sin activación de los factores de coagulación.

40 Los inventores también han mostrado que después de la dilución, la liofilización no induce ninguna modificación en los parámetros del tromboelastograma.

Estos resultados cuantitativos y cualitativos indican que, en comparación con el plasma no liofilizado, las capacidades globales de la hemostasis del plasma liofilizado se conservan.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de preparación de plasma liofilizado, viroatenuado, que comprende las siguientes etapas:

- 5       A) la selección de plasmas unitarios desleucocitados y viroatenuados por la acción de un agente fotoquímico, obteniéndose dichos plasmas a partir de al menos diez individuos donantes diferentes y presentando dichos donantes resultados de hemostasis normal, una tasa de factor VIII superior a 0,9 UI/ml y seleccionándose entre donantes masculinos o donantes exentos de anticuerpos anti-HLA;
- 10       B) la mezcla de los plasmas unitarios seleccionados; y
- C) la liofilización de dicha mezcla de plasmas.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** dicho agente fotoquímico se selecciona entre amotosaleno, azul de metileno y riboflavina.

- 15       3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, **caracterizado por que** dicho agente fotoquímico es amotosaleno.

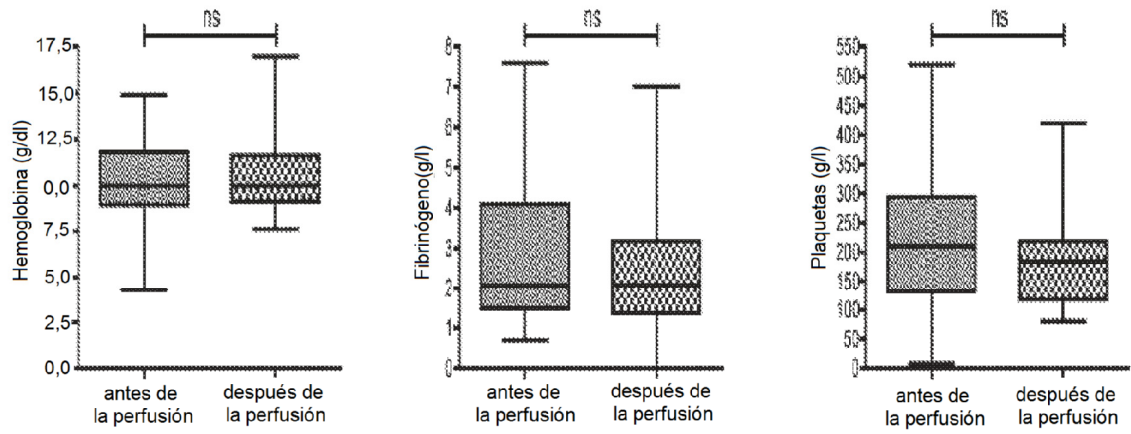


Figura 1

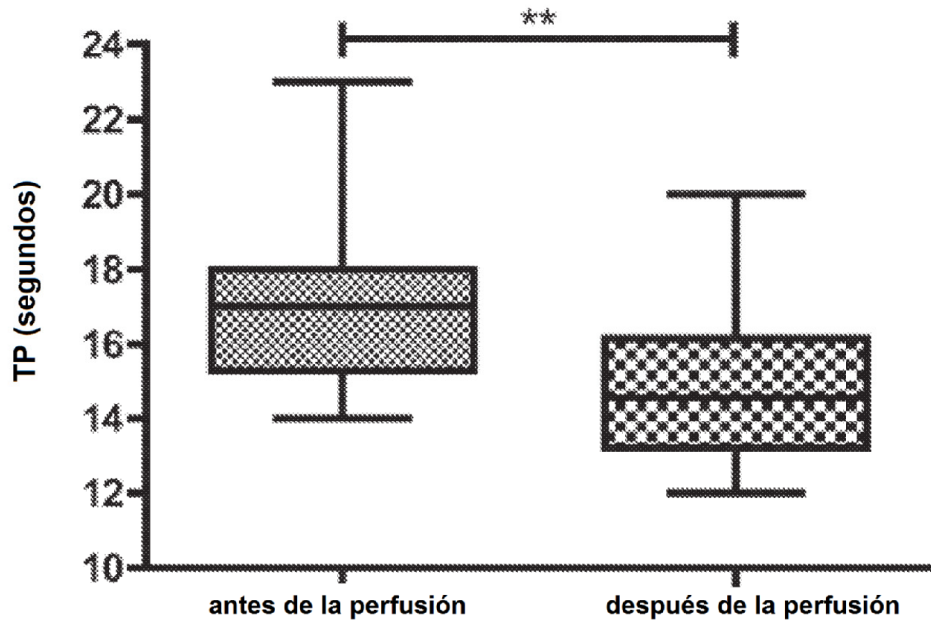


Figura 2