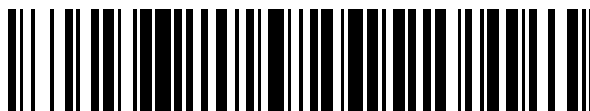


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 130**

51 Int. Cl.:

A61K 35/16 (2015.01)

A61L 26/00 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.04.2010 PCT/US2010/030031**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.10.2010 WO10117976**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2010 E 10762281 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2416790**

54 Título: **Productos de la sangre secados por aspersión y métodos para elaborar los mismos**

30 Prioridad:

09.04.2009 US 212321 P

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

01.10.2018

73 Titular/es:

**ENTEGRION, INC. (100.0%)
1007 Slater Road, Suite 170
Durham, NC 27703, US**

72 Inventor/es:

**FISCHER, THOMAS H.;
DACORTA, JOSEPH A. y
GALIGER, MICHAEL LAWRENCE.**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 684 130 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

Productos de la sangre secados por aspersión y métodos para elaborar los mismos

5 Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

10 La presente invención se dirige a métodos para preparar productos de la sangre secados mediante el uso de secado por pulverización como una alternativa a la liofilización convencional (secado por congelación) y productos preparados por el método. Con el uso del método de la invención, son posibles tasas de recuperación aumentadas de productos secados. El producto final muestra una concentración de al menos tres veces sobre el plasma original, así como tasas de reconstitución aumentadas cuando se mezcla con líquidos.

15 2. Breve descripción de la técnica relacionada

El secado por pulverización es una tecnología en la cual una solución se atomiza en una corriente de gas que fluye para la evaporación rápida del solvente (por ejemplo, deshidratación). El resultado es la formación de una escala de tiempo de sub-segundos de micropartículas compuestas del soluto residual. El secado por pulverización se ha usado como un proceso industrial en las industrias de materiales⁴, alimentos⁵ y farmacéutica^{6,7}, durante décadas. (*Por ejemplo*, ver Bergsoe⁸ para una revisión anterior). Más recientemente, el secado por pulverización ha facilitado la preparación de terapias proteicas como micropartículas para inhalación,⁹ la formulación de microestructuras terapéuticas de soporte avanzadas,¹⁰⁻¹² y nuevas clases de micromateriales.¹³⁻¹⁵ El papel de la cinética, la transición de fase, la transferencia de masa, la transferencia de calor y otros procesos físicos para determinar el tamaño de partículas final y la composición se entienden bien (*por ejemplo*, ver Vehring¹⁶ para una revisión reciente), y la investigación sobre secado por pulverización es un área extremadamente activa en la investigación de ciencia de materiales. Un hallazgo importante para este cuerpo de investigación es que en sistemas acuosos el calor de evaporación reduce la temperatura de las partículas durante el proceso de volatilización. Así, la desnaturalización térmica de las proteínas puede minimizarse para la preservación de las actividades de las proteínas.

30 Durante la II Guerra Mundial, se apreciaron los beneficios de la transfusión de sangre entera, pero dificultades logísticas relacionadas con la recolección, transporte, caducidad y la falta de coincidencia de tipaje para las reacciones de transfusión limitaron la utilización generalizada¹⁷. Se desarrolló así el plasma seco como una sustitución para la sangre entera¹⁸. Los servicios militares de transfusión americano, inglés y canadiense utilizaron ampliamente el plasma seco¹ durante la II Guerra Mundial con un perfil de seguridad muy favorable. Los métodos para preparar el plasma seco de la Armada de Estados Unidos se escalaron originalmente a volúmenes comerciales por Sharp and Dohme, Inc. (y posteriormente por un consorcio industrial mayor) con tecnologías de liofilización análogas a los protocolos de secado por congelación actuales¹⁹. El plasma seco de la Armada de Estados Unidos se anticoaguló con citrato de sodio (p/v) al 0,67%, y después de 1942 se rehidrató con ácido cítrico (p/v) al 0.1%. Se encontró que la rehidratación con ácido cítrico resultaba en un producto final de pH 7,4 - 7,6 para una conservación más favorable de la generación de trombina²⁰.

45 El plasma seco de la Armada de Estados Unidos se usó ampliamente en la sociedad civil después de 1945, y se usó en las fases iniciales de la Guerra de Corea. Sin embargo, a pesar del incipiente desarrollo de los métodos de descontaminación microbiana por irradiación ultravioleta²¹, la producción del plasma seco se suspendió en 1953, y la razón expuesta fue la contaminación de hepatitis. Sin embargo, el uso civil del plasma, principalmente como plasma congelado fresco, se ha expandido grandemente con más de 13 millones de unidades recolectadas en 2005²². En la práctica de la medicina actual el plasma se usa para una variedad de indicaciones, una de las más importantes es como un componente de mezclas de resucitación en traumas con pérdida masiva de sangre. El plasma contiene componentes, tales como los factores de coagulación y fibrinógeno, que se disminuyen frecuentemente en las coagulopatías relacionadas con choque hemorrágico (*por ejemplo*, ver Hardy y otros²³).

50 Varios hallazgos médicos apuntan hacia la utilidad de un producto de plasma hiperconcentrado. La factibilidad de la reanimación a bajo volumen, facilitada por productos tales como el plasma hiperconcentrado, se está aceptando cada vez más desde las observaciones iniciales de resultados adversos relacionados con la reanimación estándar.²⁴⁻²⁶ Incidencias de sobrecarga cardíaca asociada a transfusión y el síndrome de dificultad respiratoria aguda asociado a sobrecarga de líquidos pueden evitarse con reanimación a bajo volumen.^{27,28} La administración de volúmenes reducidos también puede ser deseable si la hemorragia en curso exacerba las coagulopatías dilucionales (*por ejemplo*, ver Stern para una revisión²⁹). El desarrollo de productos avanzados de reanimación, tales como portadores de oxígeno a base de hemoglobina (HBOC),³⁰ facilita la capacidad de lograr la oxigenación adecuada de los tejidos sin la infusión de grandes volúmenes de fluidos. Sin embargo, se anticipa que la introducción de HBOC crea una necesidad de productos a bajo volumen para sistemas hemostáticos de suplemento, tales como plasma concentrado.

60 Los productos de la sangre secados se conocen en la técnica, y la técnica predominante para lograr el producto seco es la liofilización (secado por congelación). Por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos núms. 4,287,087 y 4,145,185 de Brinkhous y otros describe plaquetas de sangre seca que se han fijado con un reactivo de reticulación tal como formaldehído. Las patentes de Estados Unidos núms. 5,656,498, 5,651,966; 5,891,393; 5,902,608; y 5,993,804 describen

productos de la sangre secados adicionales. Tales productos son útiles para propósitos terapéuticos, debido a que son estables, tienen larga vida en anaquel y pueden usarse potencialmente en forma de polvo para detener la hemorragia en pacientes que sufren de trauma severo. Sin embargo, tales productos deben elaborarse bajo estrictas condiciones estériles para evitar la contaminación.

Con las prácticas de transfusión actuales, el plasma se proporciona frecuentemente como un producto descongelado "congelado fresco" de un solo donante. Sin embargo, como la refrigeración es difícil de proporcionar en aplicaciones militares avanzadas, los países subdesarrollados y situaciones de medicina en el desierto, este factor de forma puede ser logísticamente problemático. Así, la eliminación de la congelación (liofilización) a través de un producto de plasma seco sería una ventaja significativa. Además, el producto de plasma seco es significativamente más fácil de reducir en patógenos que el plasma fresco congelado. Se cree que la presente invención es una respuesta a esa necesidad.

El documento US 2006/216687 se refiere a productos de sangre seca reconstituibles, procesos para su preparación y reconstitución, y sus usos médicos y no médicos (por ejemplo, investigación).

Polo J y otros, (Journal of Animal Science, vol. 83, no. 8 págs. 1933-1938, 2005) describe la eficacia del secado por pulverización para reducir la infectividad de la pseudorabia y los virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) y la seroconversión en cerdos alimentados con dietas que contienen plasma animal secado por pulverización.

Resumen de la invención

La presente invención se define por el alcance de las reivindicaciones y cualquier información que no se encuentre dentro de las reivindicaciones se proporciona solo a título informativo.

En una modalidad, la presente invención se dirige a un método para preparar productos de la sangre secos, que comprende las etapas de: (a) proporcionar plasma hidratado; (b) secar por pulverización dicho plasma hidratado a una tasa de flujo de aire de 415 litros de N₂ por hora a 120 °C o más para producir un producto de sangre deshidratado, en donde los factores de coagulación se conservan después del secado por pulverización, así como plasma deshidratado obtenido por el método.

En otra modalidad, la presente invención se dirige a una composición terapéutica rehidratada obtenida mediante la rehidratación de una cantidad terapéutica del plasma deshidratado para usar en el tratamiento de un paciente que padece un trastorno relacionado con la sangre.

En otra modalidad, la presente invención se dirige a un vendaje o auxiliar quirúrgico que comprende el plasma deshidratado descrito anteriormente.

En la presente descripción se describe también un método para preparar plaquetas sanguíneas fijadas deshidratadas, que comprende las etapas de: (a) proporcionar plaquetas sanguíneas fijadas hidratadas; y (b) secar por pulverización las plaquetas sanguíneas fijadas hidratadas para producir plaquetas sanguíneas fijadas deshidratadas, así como plaquetas sanguíneas fijadas deshidratadas obtenidas por el método.

En la presente descripción se describe también un método para tratar a un paciente que sufre de un trastorno relacionado con la sangre, que comprende las etapas de: (a) rehidratar una cantidad terapéutica de las plaquetas sanguíneas fijadas deshidratadas para producir una composición terapéutica rehidratada; y (b) administrar la composición terapéutica rehidratada al paciente.

Además, en la presente descripción se describe un vendaje o auxiliar quirúrgico que comprende las plaquetas sanguíneas fijadas deshidratadas descritas anteriormente.

En aún otra modalidad, la presente invención se dirige a plasma secado por pulverización, en donde cuando dicho plasma secado por pulverización se rehidrata para formar una composición de plasma sanguíneo rehidratado, la composición tiene un valor de una turbidez (A₅₀₀) menor que aquel de una composición liofilizada rehidratada comparable de plasma.

Estas y otras modalidades resultarán evidentes a la lectura de la siguiente descripción detallada de la invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una micrografía electrónica de las microesferas del plasma secado por pulverización de acuerdo con la presente invención;

La Figura 2 es un gráfico que muestra los niveles del factor de coagulación en varias muestras;

La Figura 3 representa gráficas que muestran el cambio de la trayectoria de coagulación original con el plasma secado por pulverización producido de acuerdo con el método de la invención;

La Figura 4 es una micrografía electrónica que muestra la ultraestructura de la fibrina del plasma secado por pulverización producido de acuerdo con el método de la invención;

La Figura 5 es un gráfico que representa la turbidez y la tasa de rehidratación del plasma secado por pulverización contra el liofilizado a varias concentraciones;

La Figura 6 es una micrografía electrónica de las plaquetas sanguíneas derivadas secadas por pulverización rehidratadas;

La Figura 7 es otra micrografía electrónica de las plaquetas sanguíneas derivadas secadas por pulverización rehidratadas;

y La Figura 8 son micrografías electrónicas que ilustra la aglutinación de ristocetina de las plaquetas rehidratadas secadas por pulverización obtenidas de acuerdo con el método de la descripción.

Descripción detallada de la invención

Como se indicó anteriormente, la presente invención se refiere a métodos para preparar plasma deshidratado y plasma deshidratado preparado por el método. Otros productos de la sangre hidratados útiles que pueden deshidratarse mediante el método de la descripción incluyen, pero no se limitan a, sangre entera, plaquetas sanguíneas, glóbulos rojos, suero sanguíneo y combinaciones de estos. Un producto de la sangre particularmente útil que es adecuado para el método de la descripción son las plaquetas sanguíneas que se han fijado con un agente fijador, tal como formaldehído o para formaldehído. Adicionalmente, los productos de la sangre de la invención pueden modificarse con agentes de diagnóstico o terapéuticos adicionales, seleccionados del grupo que consiste en agentes de formación de imágenes, factores de concentración, fármacos potenciadores del rendimiento, reactivos antimicrobianos y antivirales, soluciones de donantes universales, y similares, así como combinaciones de estos. Un ejemplo de un producto útil modificado es STASIX (plaquetas sanguíneas secas derivadas) disponibles de Entegrión, Inc. (Research Triangle Park, NC).

La técnica de secado por pulverización se usa en el método de la invención como una alternativa a las técnicas de secado convencionales conocidas en la técnica, tal como la liofilización (secado por congelación). El secado por pulverización es un método para transformar material en un estado fluido en una forma particulada seca por pulverización de una alimentación de un material en un medio de secado caliente. El secado por pulverización incluye la evaporación de la humedad a partir de una alimentación atomizada al mezclar la pulverización y el medio de secado de manera controlada. El medio de secado es típicamente aire, aunque también pueden usarse otros gases tal como nitrógeno. El secado procede hasta que se alcanza el contenido de humedad deseado en las partículas pulverizadas y el producto se separa después del medio de secado.

El proceso completo de secado por pulverización consiste básicamente en una secuencia de cuatro procesos. La dispersión puede lograrse con una boquilla de presión, una boquilla de dos fluidos, un atomizador de disco giratorio o una boquilla ultrasónica. La selección del tipo de atomizador depende de la naturaleza y cantidad de alimentación y de las características deseadas del producto seco. Mientras mayor es la energía para la dispersión, menores son las gotas generadas. La manera en que la pulverización entra en contacto con el aire de secado es un factor importante en el diseño del secador por pulverización, ya que tiene una gran influencia en las propiedades del producto seco al influir en el comportamiento de las gotas durante el secado. En una modalidad, el material se pulveriza en la misma dirección que el flujo del aire caliente a través del aparato. Las gotas se ponen en contacto con el gas de secado caliente cuando están más húmedas. En otra modalidad, el material se pulveriza en la dirección opuesta del flujo del gas caliente. El gas caliente fluye hacia arriba y el producto cae a través a través del aire cada vez más caliente en la bandeja de recolección. La humedad residual se elimina, y el producto se calienta mucho. Este método es adecuado sólo para productos térmicamente estables. En aún otra modalidad, las ventajas de ambos métodos de pulverización se combinan. El producto se pulveriza hacia arriba y solamente permanece en la zona caliente por un corto período de tiempo para eliminar la humedad residual. La gravedad impulsa entonces el producto hacia la zona más fría. Esta modalidad es particularmente ventajosa debido a que el producto está solamente en la zona caliente por un corto período de tiempo, y existe menos probabilidad que se afecte por el calor.

En el método de secado por pulverización, el aire se usa principalmente como medio de secado, pero pueden usarse otros gases tales como nitrógeno. La corriente de gas se calienta eléctricamente o en un quemador y después del proceso se expulsa a la atmósfera. Si el medio de calentamiento se recicla y se reutiliza, típicamente se usa un gas inerte como nitrógeno en lugar de aire. El uso de nitrógeno es ventajoso cuando se procesan solventes inflamables, productos tóxicos o productos sensibles al oxígeno.

Durante el proceso de secado por pulverización, tan pronto como las gotas de pulverización entran en contacto con el gas de secado, tiene lugar la evaporación de la película de vapor saturada, que se estabiliza rápidamente en la superficie de la gota. Debido al área superficial altamente específica y la temperatura existente y los gradientes de humedad, la transferencia de calor y de masa da como resultado un secado eficiente. La evaporación conduce a un enfriamiento de las gotas y así a una carga térmica pequeña. El diseño de la cámara de secado y la tasa de flujo de aire proporciona un tiempo de residencia de las gotas en la cámara, de manera que se completa la eliminación de humedad deseada de las gotas y el producto eliminado del secador antes de que la temperatura del producto alcance la temperatura del aire de salida. Por lo tanto, existe una pequeña probabilidad de que el calor dañe al producto.

Se usan dos sistemas para separar el producto del medio de secado. Primero, la separación primaria del producto de secado tiene lugar en la base de la cámara de secado, y, en segundo lugar, la recuperación total del producto seco en el equipo de separación. En una modalidad, se usa un ciclón para recoger el material. En base a las fuerzas de inercia, las partículas se separan a la pared del ciclón como una tensión descendente y se eliminan. Otros sistemas tales como

precipitadores electrostáticos, filtros textiles (bolsas) o recolectores de humedad tal como depuradores, pueden usarse para recoger el producto seco.

5 Como se usa en la presente invención, el secado por pulverización ofrece ventajas sobre otros métodos de secado tales como la liofilización (secado por congelación). El uso del secado por pulverización produce un producto que es más consistente, menos grueso y de mejor dispersión que los métodos de secado por congelación. Las partículas altamente dispersas producidas por secado por pulverización también permiten una tasa rápida de rehidratación, lo cual es probablemente un resultado de una mayor área superficial disponible. Por el contrario, la naturaleza agrupada de un producto liofilizado da como resultado tiempos de rehidratación sustancialmente más largos para los productos sanguíneos que se secan en el método de la invención. Dado que muchas transfusiones y otros usos de los productos de la sangre pueden ser altamente sensibles al tiempo, esta mayor tasa de rehidratación puede ser una ventaja significativa en el campo de batalla o en situaciones de tratamiento de emergencia. Como se explica en más detalle a continuación, las plaquetas sanguíneas fijadas y secadas por pulverización de la descripción pueden rehidratarse para formar una composición de plaquetas sanguíneas fijadas rehidratadas, y la composición tiene un valor de turbidez (A_{500}) menor que el de una composición liofilizada rehidratada comparable de plaquetas sanguíneas fijadas.

10 Los productos secados por pulverización del método de la invención pueden usarse como tratamientos tópicos en el tratamiento de heridas. En una modalidad, los productos pueden usarse directamente sobre una herida para ayudar a la coagulación o en una modalidad de la invención pueden aplicarse a un vendaje o auxiliar quirúrgico o de cubierta para ayudar en la cicatrización de heridas. En una modalidad alternativa, las formas rehidratadas de los productos secados por pulverización del método de la invención pueden administrarse a través de inyección intravenosa como tratamientos terapéuticos a pacientes afectados con trastornos relacionados con la sangre, tales como trombocitopenia (incluyendo trombocitopenia en período de reposo farmacológico), disfunción plaquetaria hemorrágica y víctimas de trauma que experimentan sangrado severo.

25

EJEMPLOS

Diseño general y métodos

30 Concentración de plasma secado por pulverización. El plasma humano tratado con solvente-detergente combinado (Kedrion S.p.A., Barga, Italia) y plasma porcino de un grupo de diez animales (donado por Francis Owen Blood Research Laboratory, Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill) pueden secarse por pulverización en un rango de parámetros de corrida instrumental o secarse por congelación con un ciclo de liofilización estándar para obtener micropartículas deshidratadas de diferentes tamaños. Los productos se rehidratan después con diferentes volúmenes de agua estéril que contienen una baja concentración de glicina a pH = 2,4 para compensar la pérdida de protones durante el proceso de deshidratación y se comparan para establecer el límite superior de concentración. A continuación, los detalles de los experimentos:

40 Deshidratación de plasma. El plasma humano y porcino se puede secar por pulverización en un secador de pulverización de investigación Buchi B-270 con una tasa de flujo 415 litros de No por hora a 140°C, 130°C, 120°C, 110°C e inferior si puede obtenerse la deshidratación. Las corridas se realizaron preferentemente tres veces a cada temperatura y con cada tipo de plasma (es decir, porcino y humano). El producto final puede analizarse para determinar el contenido de humedad y micropartículas fotografiadas por microscopía electrónica de barrido. Las porciones de plasma de cerdo y humano pueden liofilizarse también a -20°C durante tres días a partir de una capa de 4mm para obtener una torta de "control de liofilización". Como se muestra en las Figuras acompañantes, se observa que el material secado por pulverización sea un polvo fino, y aparezca como microesferas bajo el microscopio, mientras el material liofilizado forma una torta.

45 Rehidratación del plasma. Los lotes de control de liofilización y secado por pulverización (cada uno por triplicado) se rehidratan con el volumen apropiado de agua estéril con glicina por 1x, 2x, 3x, 4x y posiblemente una hiperconcentración mayor del plasma. La rehidratación puede ser con soluciones de glicina a pH = 2,4 para un producto, con un pH = 7,4 de rehidratación final como sigue: 1x- 20 mM glicina, 2x- 40 mM glicina, 3x- 60 mM glicina, 4x- 80 mM glicina, etc.

50 Análisis físico y químico. El siguiente análisis puede realizarse con cada muestra por triplicado de plasma de partida (secado previo a la pulverización), cada material secado por pulverización del lote y el plasma de control liofilizado. Las comparaciones se pueden hacer con la *Prueba de Wilcoxon de Rangos Señalados*, y se valorarán direccionalmente usando la *Prueba de signos*.

55 Turbidez y tasa de solubilización - Las mediciones ópticas de absorción de luz a 700 nm pueden valorar la turbidez como una función del tiempo después del inicio de la reacción de rehidratación.

60

La viscosidad puede estimarse con un viscosímetro de bola descendente.

Los niveles del factor de coagulación (incluyendo FII, FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXII, FXII, FXIII, proteína S, proteína C, factor de von Willebrand) se miden con el análisis ELISA.

65

Cambio de la trayectoria de coagulación - Los tiempos de protrombina y los tiempos de protrombina parcial activada se miden con plasmas concentrados después de la dilución de las soluciones hiperconcentradas a 1x. Los coágulos finales se examinan con microscopía electrónica de barrido para evaluar el grosor y la densidad de la fibra.

5 Una solución concentrada tendrá preferentemente la reología apropiada para la práctica de transfusión estándar en la que los niveles y las actividades del factor de coagulación se encuentran dentro de los rangos de variación intra e interindividuales normales. Esta solución puede usarse para las infusiones "más concentradas" en estudios porcinos descritos a continuación.

10 Evaluación de seguridad de los productos de plasma concentrado en cerdos. El objetivo de estos estudios es identificar una dosis máxima tolerada para preparaciones de plasma hiperconcentradas en cerdos lesionados. Los animales se someten a lesiones hepáticas por pérdida de sangre e inducción de choque hemorrágico compensado. A continuación, los animales se infunden con preparaciones porcinas de plasma hiperconcentradas hasta que se observa una respuesta hemodinámica adversa. Al finalizar el experimento, los animales se sacrifican y se someten a análisis post mortem para evidencia histológica de complicaciones protrombóticas. El punto final de este análisis será la definición de la relación entre la dosis máxima tolerada y el grado de concentración de plasma.

Inducción de choque en cerdos e infusión de plasma hiperconcentrado. Se anestesiaron cerdos de 40 a 50 kg (obtenidos de la colonia de crías de la División de Medicina de Animales de Laboratorio (UNC)).

20 Análisis de los procesos hemodinámico y vasoactivo. Se colocaron varios detectores para seguir los procesos hemodinámico y vasoactivos: se inserta un catéter de termodilución de la arteria pulmonar a través de la vena yugular externa en una arteria pulmonar; se colocan catéteres con punta de micromanómetro a través de los vasos femorales izquierdos en la aurícula derecha y la aorta torácica; un catéter de calibre .22 se inserta en la arteria femoral izquierda y se conecta a una bomba de extracción. Los patrones de flujo sanguíneo se miden colocando sondas de flujo Doppler en las arterias cefálica y mesentérica; este procedimiento puede ser respaldado por la reducción de la arteria carótida y la laparotomía.

30 Inducción de choque e infusión de plasma hiperconcentrado. El choque hemorrágico se puede inducir retirando el 40% del volumen total de sangre durante un período de una hora. Después de la extracción de sangre y la verificación del choque hemorrágico (presión arterial media < 40 mm Hg, cambio en el patrón de flujo sanguíneo esplácnico y cefálico), los animales se infunden con dosis múltiples de 1x de plasma seco por pulverización o plasma hiperconcentrado seco por pulverización en un nivel de concentración intermedio y alto (que se determinará como se describió anteriormente). Cada infusión es preferentemente un volumen equivalente a 1/10 del volumen de sangre del animal y se realiza preferentemente durante un periodo de tres minutos con una bomba de jeringa Harvard. Pueden medirse los parámetros hemodinámicos y otros fisiológicos, y las infusiones pueden detenerse cuando dos bolos sucesivos den como resultado el empeoramiento de la estabilidad hemodinámica. Después, los animales se sacrifican para la autopsia y los análisis histológicos. El número de animales y los productos infundidos usados en este Ejemplo se muestran en la Tabla 1.

40 Tabla 1

Producto infundido	Número de animales
1x Plasma	3
Concentración intermedia (p. ej., 2x)	3
Concentración alta (por ejemplo, 4x)	3
Total de animales	9

50 Trastornos de microvasculopatías y hemolíticos. Después del sacrificio, el tejido renal, hepático, pulmonar, esplénico, pulmonar y otros seleccionados se preparan para el análisis en el microscopio de luz. El análisis histológico se enfocó en identificar signos de coagulación macroscópica o intravascular diseminada o inducción prematura de falla del órgano seleccionado.

55 Análisis de datos. Las comparaciones entre los grupos de plasma se realizan con la *Prueba de Wilcoxon de Rangos Señalados* y la direccionalidad se evalúa utilizando la *Prueba de Signos*.

Ejemplo 1: Secado por pulverización de plasma y conservación de las actividades de la proteína de coagulación

60 Las siguientes series de experimentos demuestran que el plasma puede secarse por pulverización para obtener micropartículas deshidratadas, y después rehidratarse al volumen original del plasma con niveles del factor de coagulación y los parámetros de coagulación originales. El plasma combinado de solvente-detergente se sometió a secado por pulverización estándar (415 litros de N₂ por hora a 120°C en B-270 de Butchi, Inc.) para obtener el producto representado en la Figura 1. La geometría esférica ondulada de las micropartículas resultantes es similar a las formas obtenidas cuando otras proteínas se secan por pulverización, lo que indica que la cubierta superficial de la proteína se forma como resultado

de las cinéticas iniciales de eliminación de agua y concentración (*por ejemplo*, ver Vehring¹⁶). Sin embargo, esta geometría es característica sobre el plasma liofilizado que muestra una textura superficial rugosa.

Tras la rehidratación con glicina 20 mM, pH = 2,4 para compensar la pérdida de protones durante el proceso de secado para la concentración original de proteínas, se encontró que los niveles del factor de coagulación eran esencialmente los mismos que en el plasma original antes del secado por pulverización como se muestra en la Figura 2. El secado por pulverización también tuvo un efecto insignificante sobre las cinéticas de la coagulación plasmática (Figura 3). Hubo una tendencia estadística (que no fue significativa en este análisis) hacia el aumento del cambio molecular de proteína de coagulación mejorada después del secado por pulverización, un efecto que pudiera relacionarse con diferencias en los estados de asociación de proteínas en las muestras de plasma. Los filamentos de fibrina después de la polimerización del plasma secado por pulverización tuvieron una morfología normal (Figura 4).

En contraste con los métodos de la presente invención, el plasma congelado y liofilizado da como resultado un producto que contiene dominios microscópicos y macroscópicos de composición variable debido a la separación de fases. El resultado es que la rehidratación a concentraciones súper fisiológicas consume mucho tiempo y da como resultado una suspensión turbia. Este punto se demuestra por los datos presentados en la Figura 5 que muestra la A_{500} (turbidez) para varias concentraciones de plasma rehidratado. El producto de plasma tratado con solvente-detergente se sometió a secado por pulverización o liofilización, después se rehidrató a la concentración final original (1x), 2x, 3x o 4x. Los tiempos de rehidratación, basado en el momento para que ocurra la dilución macroscópica, fueron dramáticamente más rápidos con el material secado por pulverización debido al área superficial masiva de la formulación de micropartículas, y da como resultado una suspensión significativamente menos turbia como se muestra por los valores de A_{500} más bajos en la Figura 5.

Además del plasma descrito anteriormente, otros productos de la sangre se pueden secar y rehidratar de acuerdo con la descripción anterior. Virtualmente cualquier producto de la sangre tratado o no tratado puede usarse en el método de la descripción. Los ejemplos de productos de la sangre incluyen sangre entera, plasma sanguíneo, plaquetas sanguíneas, glóbulos rojos, suero sanguíneo, así como combinaciones de estos. El plasma puede usarse en el método de la invención en su estado natural o puede modificarse de cualquier manera. Los ejemplos de modificaciones de estos productos de la sangre incluyen la fijación con un agente de fijación tal como formaldehído o paraformaldehído como se describe en las patentes de Estados Unidos núms. 5,651,966; 5,891,393; 5,902,608; y 5,993,804; además de los agentes formadores de imagen, factores de concentración, fármacos potenciadores del rendimiento, reactivos antimicrobianos y antivirales y soluciones de donantes universales. Un ejemplo de un producto útil modificado es STASIX (derivado de plaquetas de sangre seca) disponibles de Entegriion, Inc. (Research Triangle Park, NC). El siguiente es un protocolo general para la rehidratación de partículas STASIX secadas por pulverización.

Ejemplo 2: Rehidratación de plaquetas sanguíneas derivadas secadas por pulverización

El objetivo de este ejemplo es rehidratar plaquetas sanguíneas derivadas secadas por pulverización (vendidas bajo el nombre comercial STASIX y disponibles de Entegriion, Inc., NC) de manera que la concentración de todos los componentes (partículas de plaquetas, sales tampón, agentes de carga (*por ejemplo*, albúmina de suero humano)) son los mismos que la suspensión que entró en el secador por pulverización. Esto se logró en tres etapas.

Primero, se obtuvo un "valor de referencia A_{280} " para el medio de carga utilizado para la suspensión previamente secada por pulverización. Este es un valor A_{280} para el secado previo a la pulverización después de que las plaquetas se separaron por centrifugación, lo que refleja la concentración de proteína sobrenadante, que es en gran parte un agente de carga de albúmina de suero humano. En segundo lugar, se realiza una rehidratación de prueba con el polvo secado por pulverización posterior al 10% (p/v), y después se mide la densidad óptica a 280 nm (A_{280}) del agente de carga (albúmina de suero humano). En tercer lugar, se comparan los valores del sobrenadante A_{280} previamente secado por pulverización y 10% de sobrenadante A_{280} (relacionados) para determinar cuán lejos estaba la aproximación del 10% de rehidratación. Esta relación se usó después para calcular el porcentaje del peso exacto del polvo deshidratado que se necesita para igualar la concentración de proteína del agente de carga de la suspensión secada previamente por pulverización.

El contero de plaquetas de las partículas después de la rehidratación se mide entonces de dos maneras. Primero con un contador de células Hiska y segundo al medir la turbidez óptica. Estos valores, y los volúmenes de rehidratación relacionados, forman el punto de partida para todos los ensayos de caracterización de partículas.

Procedimiento

1. Medir la densidad óptica de la muestra secada por pulverización previa en para obtener el valor de referencia A_{280} .

a) Descongelar la muestra líquida secada por pulverización previa y hacer girar las partículas centrifugándolas en una microcentrífuga de mesa a una configuración de cinco por dos minutos. Retener el sobrenadante.
b) Diluir el sobrenadante 1/10 en solución salina citrada por triplicado y medir los valores de A_{280} con el espectrómetro de NanoDrop.

2. Medir la densidad óptica de la proteína de la suspensión al 10% (p/v).

a) Pesar varias porciones de partículas (aproximadamente 4) de 20-50 mg en tubos de microcentrífuga. Registrar la masa. Rehidratar un tubo con agua destilada para una suspensión de 10% (p/v). Guardar los tubos restantes para análisis futuros.

b) Hacer girar las partículas como se indica arriba y retener el sobrenadante.

5 c) Diluir cada muestra rehidratada del sobrenadante 1/10 en solución salina citrada por triplicado y medir los valores A_{280} .

3. Calcular el porcentaje en peso de la rehidratación para que coincida con el valor del secado por pulverización previo como sigue.

10 a) Dividir los valores A_{280} del sobrenadante seco diluido previo a la pulverización por el factor de dilución (1/10) y promediar los tres valores para obtener un valor de referencia teórica A_{280} o $A_{280, \text{ref}}$.

b) Dividir los valores A_{280} que forman el sobrenadante de rehidratación al 10% por el factor de dilución (1/10) y promediar los tres valores para obtener un valor A_{280} teórico no diluido, denominado como $A_{280, 10\%}$.

15 c) Relacionar el valor de $A_{280, 10\%}$ con el valor $A_{280, \text{ref}}$ de acuerdo con la Ecuación 1 para obtener la masa de rehidratación adecuada (p/v) del polvo secado por pulverización posterior para que la muestra rehidratada tenga el mismo valor A_{280} que el valor A_{280} de referencia.

$$\text{Porcentaje en peso (p/v)}^* = 10\% \text{ (p/v)} \times A_{280, \text{ref}} / A_{280, 10\%} \quad (\text{Ecuación 1})$$

*el porcentaje de peso puede estar en unidades de mg/ml, por ejemplo, 8,9% (p/v) es equivalente a 89 mg/ml.

20

Medición del conteo de partículas de STASIX

a) Diluir la suspensión de rehidratación al 10% (no realice la centrifugación celular) 1/10 con solución salina citrada por triplicado.

25 b) Medir la turbidez en A_{500} de cada muestra.

c) Medir el conteo directo de células con el analizador hematológico Hiska.

d) Calcular y factorizar la pérdida de rendimiento.

30 Las micrografías electrónicas de las plaquetas sanguíneas derivadas secadas por pulverización (STASIX rehidratadas) se muestran en la Figura 6 y la Figura 7.

Ejemplo 3: Estudio de toxicidad intravenosa en rango de dosis única en monos Cynomolgus

35 Se diseñó un estudio para evaluar la toxicidad de las plaquetas sanguíneas derivadas secadas por pulverización (secadas por pulverización como se describió anteriormente, y luego rehidratadas) cuando se administra por infusión intravenosa (durante aproximadamente 5 minutos) a los monos en una dosis única. Se observó un subgrupo de recuperación de los animales durante 7 días.

40 Se usaron cinco grupos de monos - Grupo 1 - vehículo control (tampón); Grupo 2 - dosis terapéutica 1X de STASIX; Grupo 3 - dosis terapéutica 5X de STASIX; Grupo 4 - dosis terapéutica 10X de STASIX; y Grupo 5: albúmina de suero humano (500 mg/kg). Las dosis fueron respectivamente 0,0, 2,1 x 10⁹, 1,05 x 10¹⁰, 2,1 x 10¹⁰, y 0,0 plaquetas/kg en los grupos 1, 2, 3, 4 y 5. Una dosis 1X es la dosis terapéutica estimada de STASIX en un paciente humano, es decir, 30,000 partículas de plaqueta adicionales por microlitro de sangre.

45 No se observaron efectos adversos ni sintomáticos ni micropatológicos en ninguno de los monos usados en el experimento. Ya que 2 monos machos y 2 monos hembras toleraron una dosis terapéutica 10X de STASIX infundida durante un periodo de tiempo muy breve de sólo 5 minutos, el nivel de efectos adversos no observables (NOAEL) es al menos 10X de la dosis terapéutica. En un ajuste clínico en humanos, la dosis de STASIX pudiera infundirse a un ritmo de tiempo más lento de 20 minutos.

50

La necropsia de los 14 monos del estudio que comprendía los 5 grupos de dosis se realizó el Día 2 o el Día 8 después de la infusión, y no mostró evidencia del desarrollo de microtrombos en el corazón o los pulmones. En resumen, en un estudio detallado en animales realizado por el un importante laboratorio de investigación externo, bajo todas las regulaciones apropiadas de uso y manejo de animales, se demostró que STASIX no muestra efectos dañinos a nivel macroscópico o microscópico a dosis hasta 10 veces la dosis terapéutica humana prevista.

55

Ejemplo 4: Secado por pulverización de plaquetas estabilizadas en aldehído

60 En este ejemplo se examina la utilidad del secado por pulverización como una alternativa a la liofilización para la deshidratación de plaquetas estabilizadas en aldehído. Las plaquetas de aféresis humana se estabilizaron usando el procedimiento de Read y otros, descrito en la patente de Estados Unidos núm. 5,651,966.

65 El secado por pulverización (415 litros de N₂ por hora a 120°C) de la suspensión final de plaquetas estabilizadas con aldehído a 2,0 millones de plaquetas/microlitro en albúmina de suero humano al 5% (p/v) como se describió anteriormente dio como resultado un polvo fino que, al examinarlo, consistió en partículas esféricas con diámetros de 3 a 30 micras similar a las mostradas en las Figuras 6 y 7.

Se prepararon diecisiete preparaciones independientes de plaquetas secadas con secado por pulverización y después se rehidrataron a los volúmenes de predeshidratación originales. El rendimiento (secado posterior a la rehidratación / secado por pulverización) de las plaquetas contables fue 96,8% +/- 7,0% (desviación estándar) de estas diecisiete corridas.

La Figura 8 representa las plaquetas secadas por pulverización después de la rehidratación, el intercambio en plasma humano normal (como una fuente del factor de von Willebrand) y la adición de ristocetina a 1 mg/ml (Panel B) o un volumen correspondiente del tampón de control (Panel A). Se observaron agregados grandes con la adición de ristocetina, lo que indica que el secado por pulverización preserva las funciones del receptor del factor de von Willebrand de la glicoproteína 1B.

Los monos cynomolgus (1 o 2/sexo/grupo) recibieron una sola dosis de infusión intravenosa de 5 minutos de las plaquetas secadas por pulverización a dosis de $2,1 \times 10^9$, $1,05 \times 10^{10}$, o $2,1 \times 10^{10}$ plaquetas/kg. Los animales de control (2/sexo) recibieron vehículo (5,375 mM de citrato de sodio y 2 mM de cisteína en solución salina fisiológica) y un grupo adicional recibió 500 mg/kg de albúmina de suero humano (HSA). El volumen de la dosis fue de 2 ml/kg/min para todos los grupos. Se observaron los animales durante 1 o 7 días después de la dosis. Un día después de la administración de la dosis, 1 animal/sexo/grupo se sacrificó y se sometió a necropsia. Un animal por sexo de los grupos control y de dosis alta ($2,1 \times 10^{10}$ plaquetas/kg) se mantuvieron durante 7 días antes de la necropsia. Los parámetros evaluados durante el estudio fueron, viabilidad, observaciones clínicas, pesos corporales, patología clínica (pre-prueba, día 2 y día 8), peso de órganos, observaciones macroscópicas y patología microscópica.

La administración de todas las dosis de plaquetas secadas por pulverización (hasta $2,1 \times 10^{10}$ plaquetas/kg) fue bien tolerada. Los cambios hematológicos se limitaron a una disminución en el número de plaquetas y un incremento en el volumen promedio de plaquetas en uno de los dos animales de dosis alta ($2,1 \times 10^{10}$ plaquetas/kg) (la hembra) el día siguiente a la administración de la dosis. No se observaron cambios en los parámetros de coagulación o patología clínica. Los incrementos en el peso del bazo, con relación a los valores de control, se observaron en todos los animales tratados con el artículo de prueba y HSA. Las observaciones microscópicas mostraron incrementos de ligeros a moderados en el tamaño de los centros germinales en el bazo en las hembras de dosis media y alta ($1,05 \times 10^{10}$ o $2,1 \times 10^{10}$ plaquetas/kg) y hembras tratadas con HSA el día 2 y hembras de dosis alta (sólo los grupos de necropsia) el día 8 que se correlacionaron con las observaciones microscópicas de decoloración de color canela y anomalías superficiales del bazo en algunos animales. El alargamiento del centro germinal en hembras se consideró una posible respuesta a HSA. No se observaron hallazgos similares en el control tratado con vehículo, el cual tuvo centros germinales más pequeños. Sin embargo, debido a que los centros germinales activos son un hallazgo común en bazo de mono, y debido a que el tamaño de la muestra fue pequeño, este hallazgo puede estar dentro del rango normal de fondo. La persistencia del alargamiento del centro germinal esplénico después de 7 días en un animal sugiere la falta de recuperación, lo cual sería consistente con la reacción del centro germinal a la estimulación antigénica, pero este hallazgo también puede reflejar variaciones normales de fondo.

Ejemplo 5- Secado por pulverización de plasma y pruebas en cerdos

El plasma separado de la sangre fresca porcina se almacenó como plasma fresco congelado (FFP) o se conservó como plasma liofilizado (FDP) o plasma secado por pulverización (SDP, preparado como se detalló en los ejemplos anteriores). Para la prueba in vitro: El SDP se reconstituyó en agua destilada que fue igual (1xSDP) o un tercio (3xSDP) del volumen original de FFP. El análisis incluyó las mediciones del tiempo de protrombina (PT), el tiempo parcial de tromboplastina (PTT), los niveles de fibrinógeno y la actividad de los factores de coagulación seleccionados. Para la prueba in vivo, los cerdos se sometieron a politraumas (fractura de fémur, daño hepático de grado V) y choque hemorrágico, (60% de hemorragia arterial, con la "triada letal" de acidosis, coagulopatía e hipotermia), y se trataron con FFP o 3xSDP (n=4-5/grupo). Los perfiles de coagulación (PT, PTT, tromboelastografía) se midieron al inicio (BL), post-choque (PS), post cristaloides (PC), tratamiento (M0), y durante las 4 horas de monitoreo (M 1-4).

La prueba in vivo reveló que los factores de coagulación se conservaron después del secado por pulverización. La coagulación de FFP y 1xSDP fueron similares con 3x SDP mostrando un PT/PTT prolongado. El politrauma/choque hemorrágico produjo coagulopatía significativa, y la infusión de 3xSDP fue tan efectiva como FFP y FDP para revertirlo. Estos resultados muestran que el plasma puede secarse por pulverización y reconstituirse a un tercio de su volumen original sin comprometer las propiedades de coagulación in vivo. Este plasma auto estable, de bajo volumen, hiperoncótico, hiperosmótico es una opción logísticamente atractiva para el tratamiento de coagulopatías asociadas con trauma y otras.

Referencias

1. Kendrick, B.G.D.B. Blood Program in World War II. U.S. Government Printing Office Library of Cong. Cat. No. 64-60006, <http://amedd.mil/booksdoc/wwii/blood/default.htm> (1964).
2. Ketchum, L., Hess, J.R. & Hiippala, S. Indications for early fresh frozen plasma, cryoprecipitate, and platelet transfusion in trauma. *The Journal of trauma* 60, S51-58 (2006).
3. Erber, W.N. & Perry, D.J. Plasma and plasma products in the treatment of massive haemorrhage. *Best Pract Res Clin Haematol* 19, 97-112 (2006).

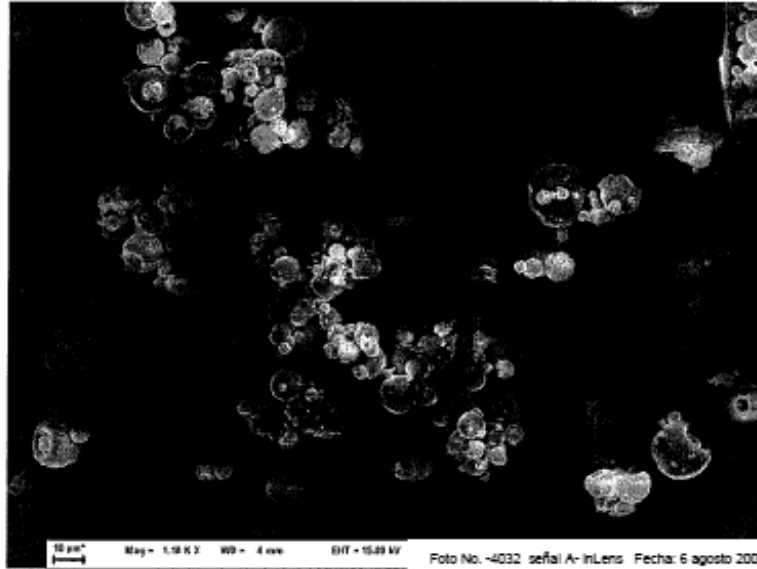
4. Smith, M.W. Spray-drying synthetic detergents. *Manufacturing chemist and aerosol news* 22, 186-187 (1951).
5. Heldman, D.R., Hall, C.W. & Hedrick, T.I. Air filtration for the spray drying of dairy products. *Journal of dairy science* 51, 466-470 (1968).
6. Raff, A.M., Robinson, M.J. & Svedres, E.V. Spray-drying of tablet granulations. I. A preliminary report. *Journal of pharmaceutical sciences* 50, 76-79 (1961).
7. Riegelman, S., Swintosky, J.V., Hiquchi, T. & Busse, L.W. Studies on pharmaceutical powders and the state of subdivision. IV. The application of spray-drying techniques to pharmaceutical powders. *Journal of the American Pharmaceutical Association* 39, 444-450 (1950).
8. Bergsoe, C. Progress in spray-drying. *Manufacturing chemist and aerosol news* 20, 72-75 (1949).
9. Maltesen, M.J., Bjerregaard, S., Hovgaard, L., Havelund, S. & van de Weert, M. Quality by design - Spray drying of insulin intended for inhalation. *Eur J Pharm Biopharm* 70, 828-838 (2008).
10. Borghetti, G.S., Lula, I.S., Sinisterra, R.D. & Bassani, V.L. Quercetin/betaCyclodextrin Solid Complexes Prepared in Aqueous Solution Followed by Spray-drying or by Physical Mixture. *AAPS PharmSciTech* (2009).
11. Mohammed, G.A., Puri, V. & Bansal, A.K. Coprocessing of nevirapine and stavudine by spray drying. *Pharmaceutical development and technology* 13, 299-310(2008).
12. Ochiuz, L. & Peris, J.E. Preparation and characterisation of alendronate-loaded chitosan microparticles obtained through the spray drying technique. *Medicinal chemistry (Sharjah (UnitedArab Emirates))* 5, 191-196 (2009).
13. Iskandar, F. y otros. Production of morphology-controllable porous hyaluronic acid particles using a spray-drying method. *Acta biomaterialia* (2008).
14. Sen, D. y otros. Evaporation Driven Self-Assembly of a Colloidal Dispersion during Spray Drying: Volume Fraction Dependent Morphological Transition. *Langmuir* (2009).
15. Zhang, X. y otros. Preparation of a dispersible PEGylate nanostructured lipid carriers (NLC) loaded with 10-hydroxycamptothecin by spray-drying. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 56, 1645-1650 (2008).
16. Vehring, R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharmaceutical research* 25, 999-1022 (2008).
17. Churchill, C. Surgery in World War II. The physiologic effects of wounds. U.S. Government Printing Office (1952).
18. Blalock, A. Report on Committee on Transfusion, National Research Council. (1940).
19. Harper, S.B. The preparation and experimental use of dried blood plasma. *Proceedings of Staff Meetings of the Mayo Clinic* 15, 689-694 (1940).
20. Strumia, D. Minutes, meeting of subcommittee on blood substitutes. Division of Medical Sciences, National Research Council (1942).
21. Allen, J., Enerson, D., Barron, E. and Sykes, C. Pooled plasma with little or no risk of homologous serum Jaundice. *J.A.M.A.* 152, 1421-1423 (1954).
22. Whitaker, B.a.S., M. The 2005 Nationwide Blood Collection and Utilization Survey Report. AABB and US Dept. HHS <http://www.aabb.org/apps/docs/05nbcursrpt.pdf> (2005).
23. Hardy, J.F., De Moerloose, P. & Samama, M. Massive transfusion and coagulopathy: pathophysiology and implications for clinical management. *Can J Anaesth* 51, 293-310 (2004).
24. Baxter, C.R. & Shires, T. Physiological response to crystalloid resuscitation of severe burns. *Annals of the New York Academy of Sciences* 150, 874-894 (1968).
25. Shires, T. Initial care of the injured patient. *The Journal of trauma* 10, 940-948 (1970).
26. Shires, T., Coln, D., Carrico, J. & Lightfoot, S. Fluid Therapy in Hemorrhagic Shock. *Arch Surg* 88, 688-693 (1964).
27. Skeate, R.C. & Eastlund, T. Distinguishing between transfusion related acute lung injury and transfusion associated circulatory overload. *Current opinion in hematology* 14, 682-687 (2007).
28. Triulzi, D.J. Transfusion-related acute lung injury: current concepts for the clinician. *Anesthesia and analgesia* 108, 770-776 (2009).
29. Stern, S.A. Low-volume fluid resuscitation for presumed hemorrhagic shock: helpful or harmful? *Current opinion in critical care* 7, 422-430 (2001).
30. Reynolds, P.S., Barbee, R.W., Skafien, M.D. & Ward, K.R. Low-volume resuscitation cocktail extends survival after severe hemorrhagic shock. *Shock (Augusta, Ga)* 28, 45-52 (2007).
31. Fischer, T.H., Merricks, E., Raymer, R., Nichols, T., Hayes, P., Bode, A., Pearce, L. and Manning, J. The co-infusion of rehydrated lyophilized platelets with HBOC-201 for hemostasis in dilutional thrombocytopenia. *Blood* 98, 2250 (2001).
32. Manning, J.E. et al. Selective aortic arch perfusion using serial infusions of perflubron emulsion. *Acad Emerg Med* 4, 883-890 (1997).
33. Manning, J.E. y otros. Selective aortic arch perfusion during cardiac arrest: enhanced resuscitation using oxygenated perflubron emulsion, with and without aortic arch epinephrine. *Ann Emerg Med* 29, 580-587 (1997).
34. Manning, J.E. y otros. Selective aortic arch perfusion with hemoglobin-based oxygen carrier-201 for resuscitation from exsanguinating cardiac arrest in swine. *Critical care medicine* 29, 2067-2074 (2001).
35. Toung, T., Reilly, P.M., Fuh, K.C., Ferris, R. & Bulkley, G.B. Mesenteric vasoconstriction in response to hemorrhagic shock. *Shock (Augusta, Ga)* 13, 267-273 (2000).
36. Brummel-Ziedins, K., Vossen, C.Y., Rosendaal, F.R., Umezaki, K. & Mann, K.G. The plasma hemostatic proteome: thrombin generation in healthy individuals. *J Thromb Haemost* 3, 1472-1481 (2005).
37. Budowsky, E., Ackerman, S., Purmal, A., Edson, C., Williams, M. Methods and compositions for inactivating viruses. *Patente de Estados Unidos* 6,369,048 (2002).
38. Burnouf, T. et al. Nanofiltration of single plasma donations: feasibility study. *Vox Sang* 84, 111-119 (2003).
39. Burnouf-Radosevich, M., Appourchaux, P., Huart, J.J. & Burnouf, T. Nanofiltration, a new specific virus elimination method applied to high-purity factor IX and factor XI concentrates. *Vox Sang* 67, 132-138 (1994).

40. Horowitz, B.a.C., S. Removal of antibodies from blood-derived compositions while retaining coagulation factors. *Patente de Estados Unidos* 5,541,294 (1996).
41. Bakaltcheva, I., O'Sullivan, A.M., Hmel, P. & Ogbu, H. Freeze-dried whole plasma: evaluating sucrose, trehalose, sorbitol, mannitol and glycine as stabilizers. *Thrombosis research* 120, 105-116 (2007).
- 5 42. MacLennan, S. & Williamson, L.M. Risks of fresh frozen plasma and platelets. *The Journal of trauma* 60, S46-50 (2006).
43. Solheim, B.G. Universal pathogen-reduced plasma in elective open-heart surgery and liver resection. *Clin Med Res* 4, 209-217 (2006).
- 10 44. Noddeland, H. y otros. Universal solvent/detergent-treated fresh frozen plasma (Uniplas--rationale and clinical properties. *Thrombosis research* 107 Suppl 1, S33-37 (2002).
45. Medwatch, F. Important safety information regarding Plas+SD. http://www.fda.gov/medwatch/safety/2002/plassd_deardoc.pdf (2002).
46. Monroe, D.M., Hoffman, M., Allen, G.A. & Roberts, H.R. The factor VII-platelet interplay: effectiveness of recombinant factor VIIa in the treatment of bleeding in severe thrombocytopenia. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 26, 373-377 (2000).
- 15 47. Monroe, D.M., Hoffman, M. & Roberts, H.R. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 1381-1389 (2002).
48. Deveras, R.A. & Kessler, C.M. Reversal of warfarin-induced excessive anticoagulation with recombinant human factor VIIa concentrate. *Annals of internal medicine* 137, 884-888 (2002).
- 20 49. Freeman, W.D. y otros. Recombinant factor VIIa for rapid reversal of warfarin anticoagulation in acute intracranial hemorrhage. *Mayo Clin Proc* 79, 1495-1500 (2004).
50. Sorensen, B., Johansen, P., Nielsen, G.L., Sorensen, J.C. & Ingerslev, J. Reversal of the International Normalized Ratio with recombinant activated factor VII in central nervous system bleeding during warfarin thromboprophylaxis: clinical and biochemical aspects. *Blood Coagul Fibrinolysis* 14, 469-477 (2003).
- 25 51. Talkad, A., Mathews, M., Honings, D., Jahnel, J. & Wang, D. Reversal of warfarin-induced anticoagulation with factor VIIa prior to rt-PA in acute stroke. *Neurology* 64, 1480-1481 (2005).

Reivindicaciones

1. Un método para preparar plasma deshidratado, que comprende las etapas de:
5 (a) proporcionar plasma hidratado;
(b) secar por pulverización dicho plasma hidratado a una tasa de flujo de aire de 415 litros N₂ por hora a 120°C o más para producir un producto de la sangre deshidratado, en donde los factores de coagulación se conservan después del secado por pulverización.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho producto de la sangre hidratado se modifica física o químicamente.
3. El método de la reivindicación 2, en donde dicha modificación es fijación química.
4. El método de la reivindicación 2, en donde dicha modificación comprende reactivos de diagnóstico o terapéuticos
15 adicionales.
5. El método de la reivindicación 4, en donde dichos reactivos de diagnóstico o terapéuticos se seleccionan del grupo que consiste en agentes de formación de imágenes, factores de concentración, fármacos potenciadores del rendimiento, reactivos antimicrobianos y antivirales, soluciones de donantes universales y combinaciones de los
20 mismos.
6. Plasma deshidratado elaborado por el método de la reivindicación 1.
7. Vendaje o auxiliar quirúrgico que comprende el plasma deshidratado de la reivindicación 6.
- 25 8. Plasma secado por pulverización preparado por el método de la reivindicación 1, en donde cuando dicho plasma secado por pulverización se rehidrata para formar una composición de plasma rehidratada, dicha composición tiene un valor de turbidez (A₅₀₀) menor que el de una composición de plasma liofilizada rehidratada comparable.
- 30 9. Una composición terapéutica rehidratada obtenida por rehidratación de una cantidad terapéutica del plasma deshidratado de la reivindicación 6 para usar en el tratamiento de un paciente que padece de un trastorno relacionado con la sangre.

Microesferas de plasma secadas por pulverización



20 micras microscopía electrónica de barrido de plasma secado por pulverización

Figura 1

El secado por pulverización afecta mínimamente el perfil de proteína de coagulación

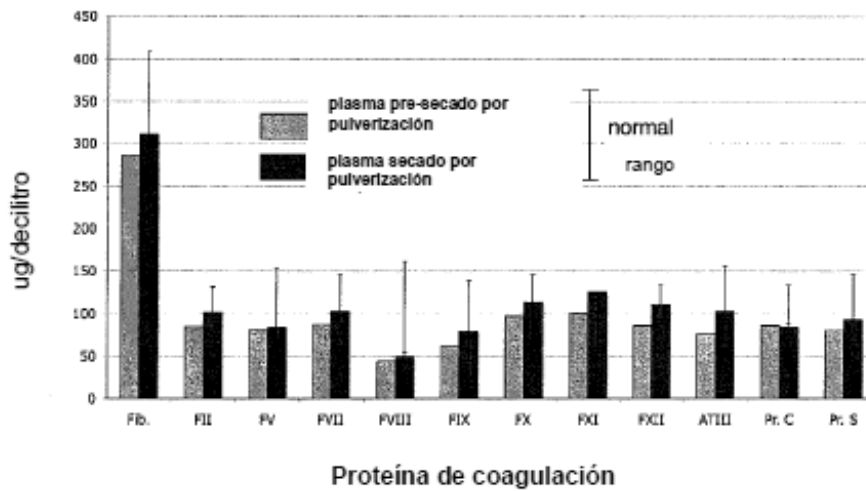


Figura 2

Cambio de la trayectoria de coagulación original con plasma secado por pulverización

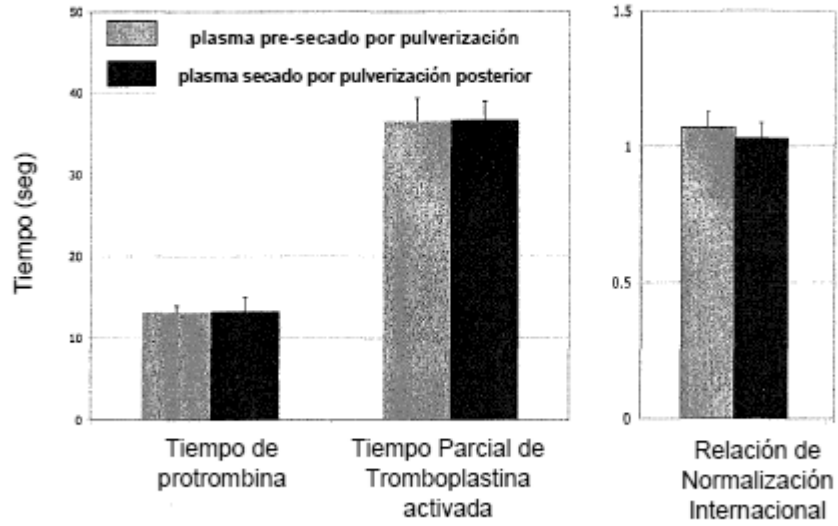
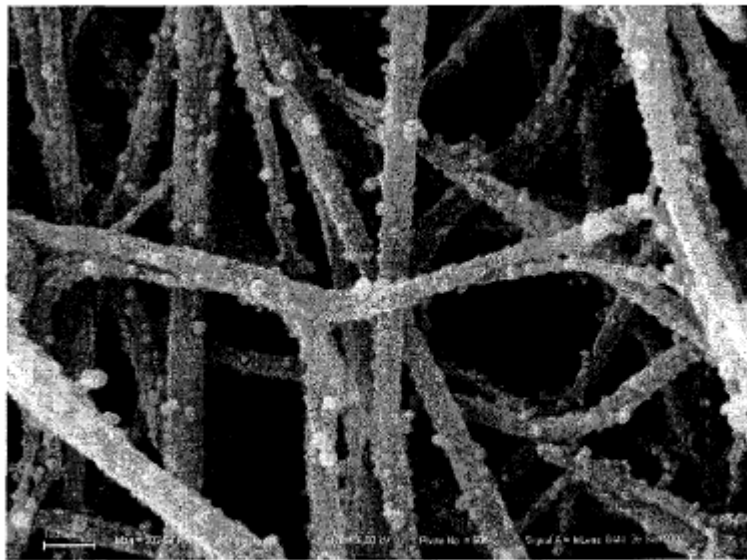


Figura 3

Ultraestructura de la fibrina del plasma secado por pulverización



100 nanómetros micrografía electrónica de barrido del coágulo de fibrina

Figura 4

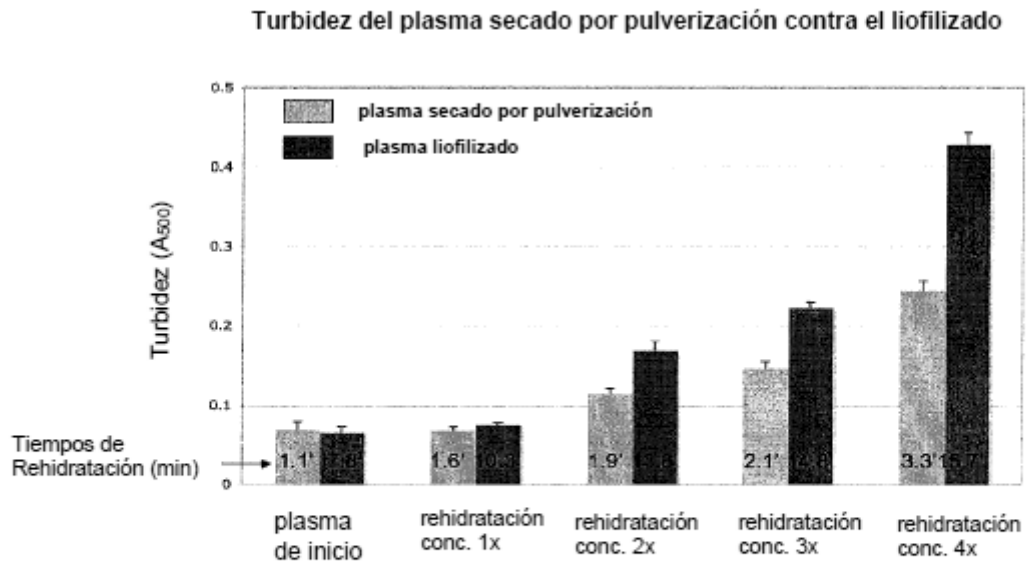


Figura 5

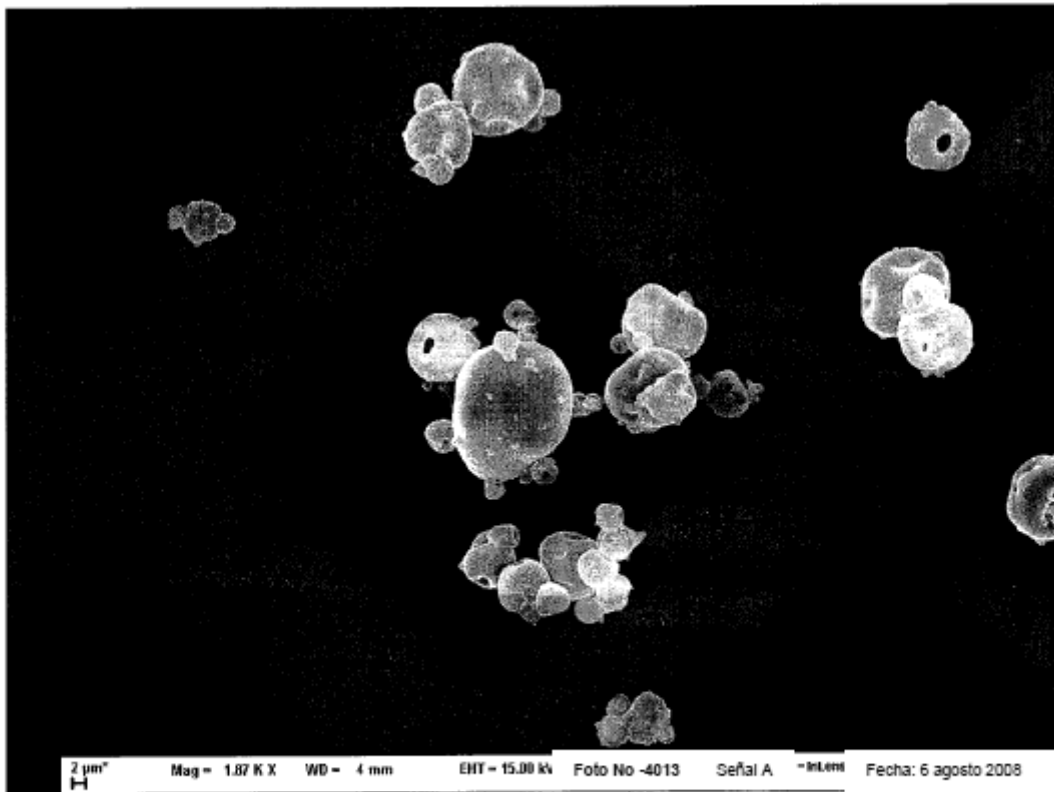


Figura 6

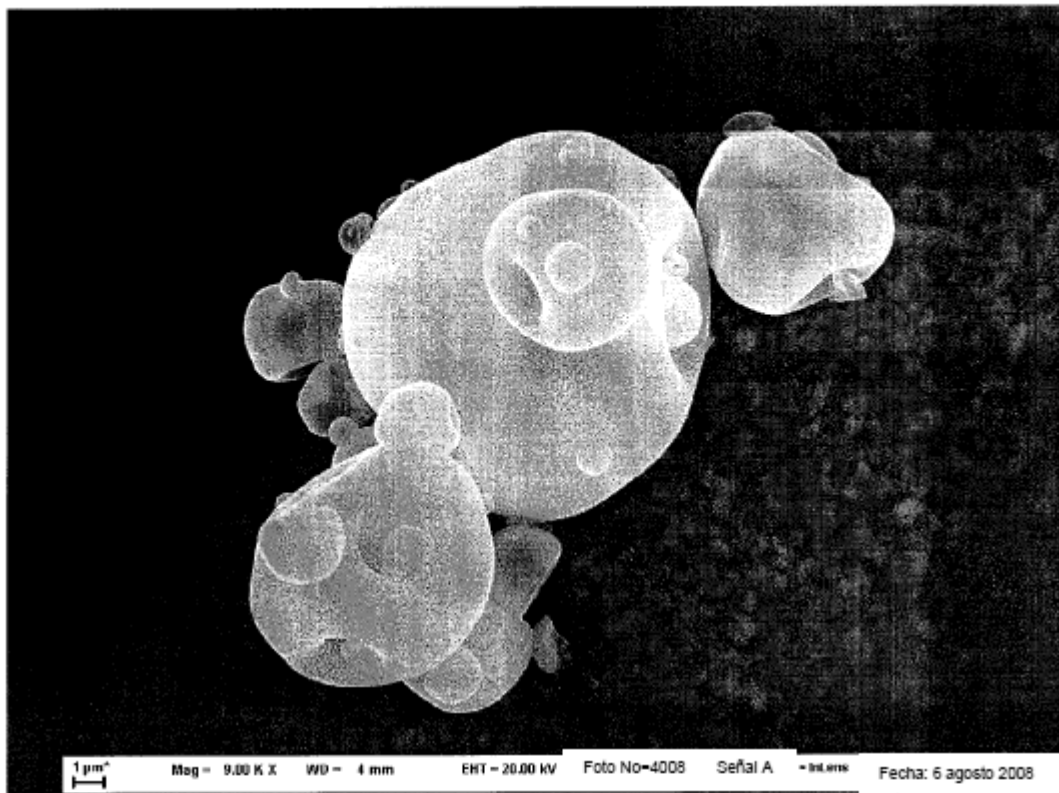


Figura 7

Aglutinación de Ristocetina de plaquetas RL secadas por pulverización
Microscopía visible

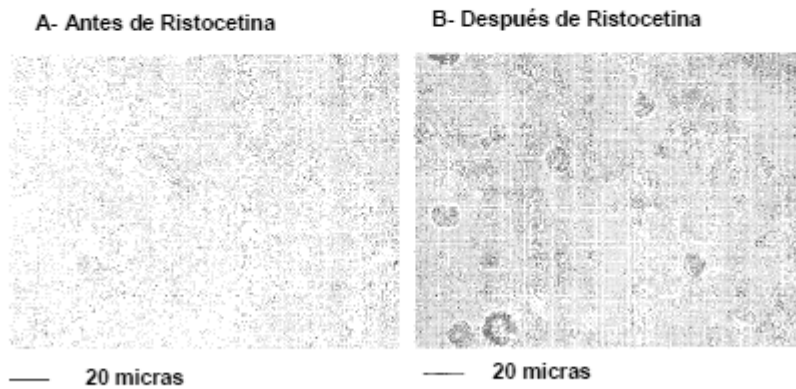


Figura 8