

REPUBLICA DE COLOMBIA



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-151086- -00000-0000
Fecha: 2011-11-08 16:23:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 40

PATENTE DE INVENCION

EXPEDIENTE No. _____

Contiene los documentos relativos a la solicitud de Patente de:

Titulo: PRODUCTOS SANGUÍNEOS DESHIDRATADOS
POR ASPERSIÓN Y MÉTODOS PARA
ELABORAR LOS MISMOS.

Solicitante: ENTEGRION, INC.

De: CAROLINA DEL NORTE, ESTADOS UNIDOS.

Apoderado: MAURICIO JARAMILLO C.

Bogotá, D.C., Noviembre de 2011

WF-3787

PETITOR		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO	
		 No. 11-151086- -00000-0000 Fecha: 2011-11-08 16:23:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Evg: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 40	
FORMULARIO UNICO DE SO PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL			
1 ☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad			
☒ Capitulo I		☐ Capitulo II	
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: ENTEGRION, INC. Dirección: 79 TW Alexander Drive, 4401 Reserach Commons Research Triangle Park, NC 27709 Estados Unidos Teléfono: Fax: E-Mail: Domicilio: Carolina del Norte, Estados Unidos	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número	
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: MAURICIO JARAMILLO CAMPUZANO Dirección: Calle 67 No. 7 – 35 Oficina 1204 Bogotá D.C., Colombia Teléfono: 3192900 Fax: 3210295 E-Mail: mjaramillo@gpzlegal.com	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número 80.421.942 TP 74.555	
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: 1: Thomas H. FISCHER 2: Joseph A. DACORTA 3: Michael Lawrence GALIGER Dirección: 1: 3119 Wood Duck Lane, Hillsborough, NC 27278, USA 2: 6019 Old North Carolina, Route 86, Chapel Hill, NC 27516, USA 3: 12039 Wicker Drive, Chapel Hill, North Carolina 27517, USA Domicilio: Carolina del Norte, Estados Unidos	C.C. ☐ NIT. ☐	
5 PCT (86) Solicitud internacional No.: PCT/US2010/030031 Fecha: 06/04/2010 Publicación Internacional No.: WO2010/117976 Fecha: 14/10/2010			
6 TITULO (54): PRODUCTOS SANGUÍNEOS DESHIDRATADOS POR ASPERSIÓN Y METODOS PARA ELABORAR LOS MISMOS			
7 Clasificación Internacional (51): A61K 35/16 (2006.01), G01N 33/50 (2006.01)			
8 Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	Estados Unidos	09/04/2009	61/212,321
9 Comprobante de pago No. Fecha:			

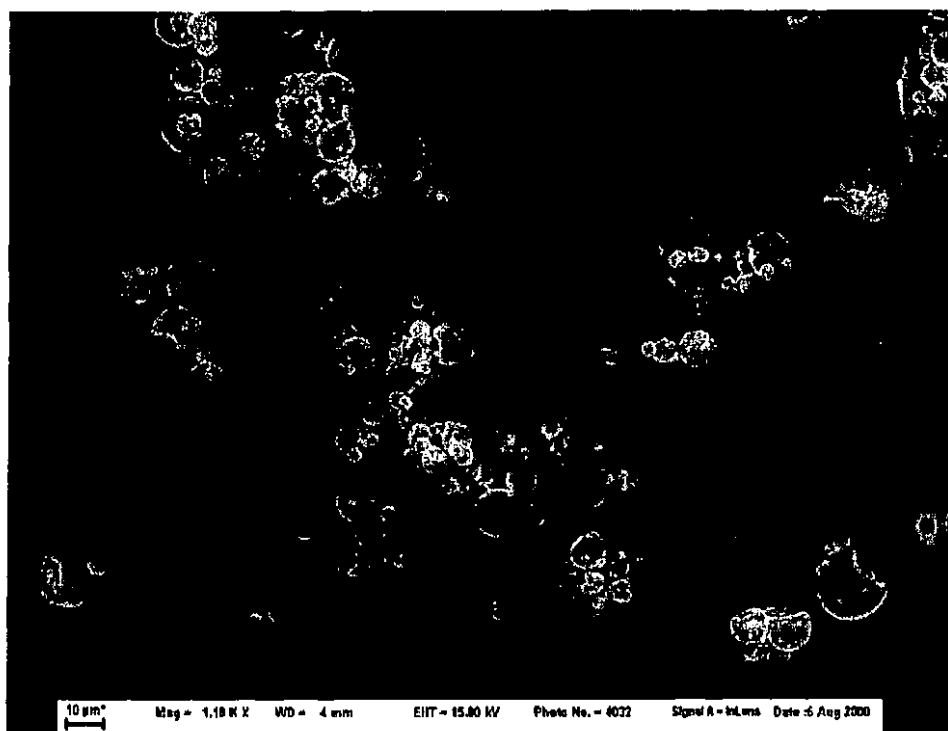
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:

Microspheres of Spray-Dried Plasma



20 microns scanning electron microscopy of spray-dried plasma

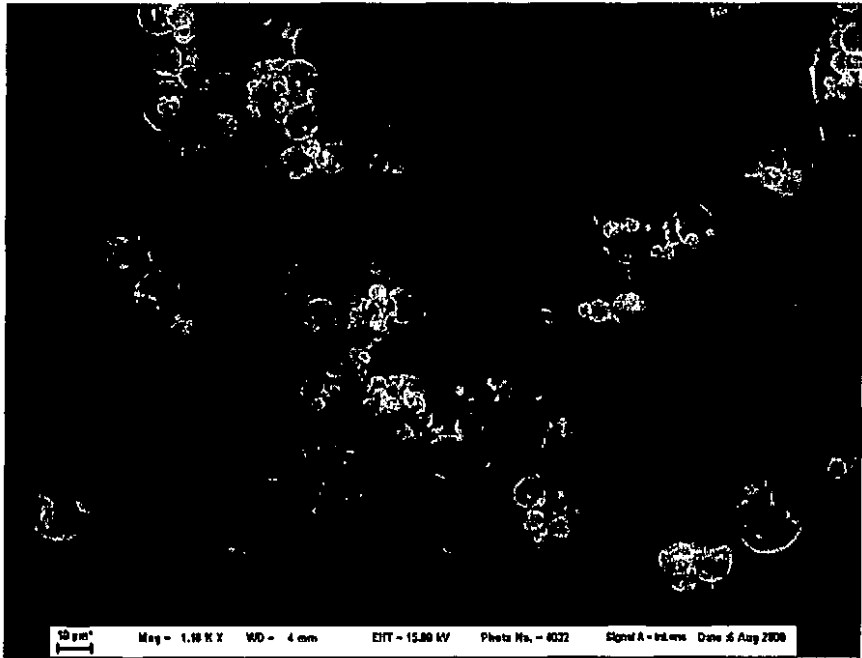
Figure 1

12 Solicito la concesión de la patente

Nombre: MAURICIO JARAMILLO CAMPUZANO

Firma:

C.C. 80.421.942 de Usaquén T.P. 74.555 C.S.Jra.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN ☐ Patente de Invención ☐ Patente modelo de utilidad ☒ PCT
(21) No. de solicitud:	(51) int. Cl: A61K 35/16 (2006.01), G01N 33/50 (2006.01)
(22) Fecha de solicitud:	(71) Solicitante(s): ENTEGRION, INC.
(30) Prioridad: (31) No. Prioridad: 61/212,321 (32) Fecha: 09/04/2009 (33) Pais: Estados Unidos	(72) Inventor(es): 1: Thomas H. FISCHER 2: Joseph A. DACORTA 3: Michael Lawrence GALIGER (74) Apoderado(s): MAURICIO JARAMILLO C.
(54) Título: PRODUCTOS SANGUÍNEOS DESHIDATADOS POR ASPERSIÓN Y METODOS PARA ELABORAR LOS MISMOS <i>Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT</i>	
(85) Fecha límite inicio Fase Nacional: 09/11/2011 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha: 09/04/2010 No. de solicitud PCT: PCT/US2010/030031	(87) Publicación internacional: Fecha: 14/10/2010 No. Publicación: WO2010/117976
Resumen reivindicación (es): La presente invención se dirige a un método para preparar productos sanguíneos deshidratados, que comprende las etapas de: (a) proporcionar un producto sanguíneo hidratado; (b) deshidratar por aspersión el producto sanguíneo hidratado para producir un producto sanguíneo deshidratado, así como productos sanguíneos deshidratados elaborados por el método. La presente invención se dirige a 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 del producto sanguíneo deshidratado para producir una composición terapéutica rehidratada; y (b) administrar la composición terapéutica rehidratada al paciente. La presente invención se dirige a un vendaje o auxiliar quirúrgico que comprende los productos sanguíneos deshidratados arriba descritos. Microspheres of Spray-Dried Plasma  20 microns scanning electron microscopy of spray-dried plasma Figure 1	



(43) International Publication Date
14 October 2010 (14.10.2010)

(10) International Publication Number
WO 2010/117976 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 35/16 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)

(74) Agent: GARABEDIAN, Todd, E.; Wiggin And Dana
LLP, One Century Tower, New Haven, CT 06508-1832
(US).

(21) International Application Number:
PCT/US2010/030031

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date:
6 April 2010 (06.04.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/212,321 9 April 2009 (09.04.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US): ENTE-
GRION, INC [US/US]; 79 TW Alexander Drive, 4401
Research Commons, Research Triangle Park, NC 27709
(US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): FISCHER,
Thomas, H. [US/US]; 3119 Wood Duck Lane, Hillsbor-
ough, NC 27278 (US). DACORTA, Joseph, A. [US/US];
6019 Old North Carolina Route 86, Chapel Hill, NC
27516 (US). ESKRIDGE, E., Stan [US/US]; 5312 Far-
rington Road, Chapel Hill, NC 27517 (US). BODE,
Arthur, P. [US/US]; 2700 Mulberry Lane, Arlington
Square, Greenville, NC 27858 (US).

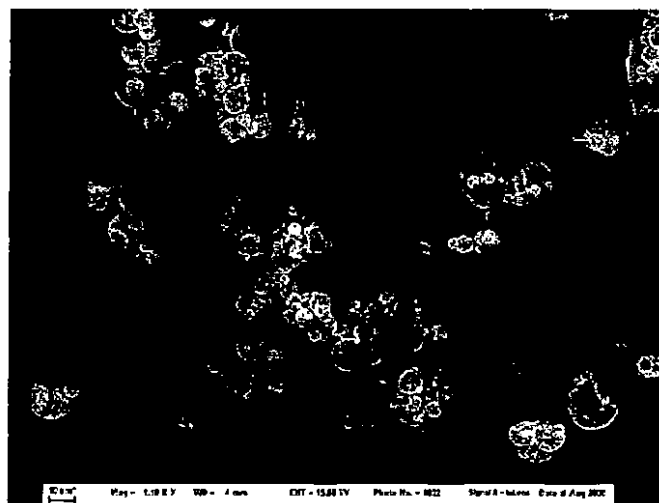
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: SPRAY-DRIED BLOOD PRODUCTS AND METHODS OF MAKING SAME

Microspheres of Spray-Dried Plasma



20 microns scanning electron microscopy of spray-dried plasma

Figure 1

(57) Abstract: The present invention is directed to a method of preparing dehydrated blood products, comprising the steps of: (a) providing a hydrated blood product; (b) spray-drying the hydrated blood product to produce a dehydrated blood product, as well as dehydrated blood products made by the method. The present invention is directed to a method of treating a patient suffering from a blood-related disorder, comprising the steps of: (a) rehydrating a therapeutic amount of the dehydrated blood products to produce a rehydrated therapeutic composition; and (b) administering the rehydrated therapeutic composition to the patient. The present invention is directed to a bandage or surgical aid comprising the dehydrated blood products described above. (Drawing Figure 1)

PRODUCTOS SANGUÍNEOS DESHIDATADOS POR ASPERSIÓN Y METODOS PARA ELABORAR LOS MISMOS

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5

1. Campo de la Invención

La presente invención se dirige a métodos para preparar productos sanguíneos deshidratados utilizando deshidratación por aspersión como una alternativa a la liofilización convencional (congelado y después deshidratado al vacío) y productos hechos por el método. Utilizando el método de la invención, son posibles las tasas de recuperación incrementadas de productos deshidratados. El producto final muestra al menos concentraciones de tres veces sobre el plasma original, así como tasas de reconstitución incrementadas cuando se mezcla con líquidos.

15

2. Breve Descripción de la Técnica Relacionada

La deshidratación por aspersión es una tecnología en la cual una solución se atomiza en una corriente de gas fluyente para la rápida vaporización del solvente (e.g., deshidratación). El resultado es la formación de una escala de tiempo de sub-segundos de micropartículas compuestas del soluto residual. La deshidratación por aspersión se ha utilizado como un proceso industrial en las industrias de materiales⁴, alimentos⁵ y farmacéutica^{6,7} durante décadas. (e.g., ver Bergsoe⁸ para una revisión anterior). Más recientemente, la deshidratación por aspersión ha facilitado la preparación de terapéuticos de proteína como micropartículas para inhalación⁹, la formulación de microestructuras¹⁰⁻¹² avanzadas de vehículos-terapéuticos y las nuevas clases de micromateriales¹³⁻¹⁵. Se conoce bien el rol de la cinética, transición de fase, transferencia de masa, transferencia térmica y otros procesos físicos para determinar el tamaño final y la composición de la partícula (e.g., ver Vehring¹⁶ para una revisión reciente), y la investigación en deshidratación por aspersión es un área extremadamente activa en la investigación de la ciencia de materiales. Un hallazgo importante para este cuerpo de investigación es que en sistemas acuosos el calor de la vaporización

30

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 proteínicas.

5 Durante la II Guerra Mundial, se apreciaron los beneficios de la transfusión de la sangre entera, pero dificultades logísticas relacionadas con la recolección, transporte, caducidad y desigualdad de la tipificación para las reacciones de transfusión limitaron la utilización¹⁷ ampliamente difundida. Se desarrolló así el plasma deshidratado como una sustitución para la sangre entera¹⁸. Los servicios militares de transfusión americano, inglés y canadiense
10 utilizaron de manera extensa el plasma deshidratado¹ durante la II Guerra Mundial con un perfil de seguridad muy favorable. Los métodos para preparar el plasma deshidratado en la U.S Army-Navy ascendieron originalmente a volúmenes comerciales por la Sharp and Dohme, Inc. (y posteriormente por un consorcio industrial mayor) con tecnologías de liofilización análogas a los protocolos¹⁹ de
15 congelación y deshidratación actuales. El plasma deshidratado de la U.S Army-Navy se anticoaguló con citrato de sodio (p/v) al 0.67%, y después de 1942 se rehidrataron con ácido cítrico (p/v) al 0.1%. La rehidratación con ácido cítrico se encontró que dio como resultado un producto final de pH 7.4 – 7.6 para una conservación más favorable de la generación de trombina²⁰.

20 El plasma deshidratado de la U.S Army-Navy se colocó en uso ampliamente en civiles después de 1945, y se utilizó en las fases iniciales de la Guerra de Corea. Sin embargo, a pesar del incipiente desarrollo de los métodos²¹ de descontaminación microbiana por irradiación ultravioleta, la producción del plasma deshidratado se suspendió en 1953, siendo las razones expuestas,
25 contaminación por hepatitis. Sin embargo, el uso del plasma por los civiles, principalmente como plasma congelado en 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 utiliza para una variedad de indicaciones, siendo una de las más importantes, como un componente de mezclas de resucitación en
30 traumas con pérdida masiva de sangre. El plasma contiene componentes, tales como los factores de coagulación y el fibrinógeno, que se disminuyen

frecuentemente en las coagulopatías relacionadas con choque hemorrágico (e.g., ver Hardy et al.²³).

Varios hallazgos médicos señalan hacia la utilidad de un producto de plasma hiper-concentrado. La deseabilidad de la resucitación de bajo volumen, como se facilita por productos tales como el plasma hiper-concentrado, esta siendo aceptada de manera creciente debido a las observaciones iniciales de efectos adversos relacionados a la resucitación estándar²⁴⁻²⁵. Incidencias de la transfusión asociadas con la sobrecarga cardiaca y el síndrome de sufrimiento respiratorio agudo asociado a la sobrecarga de fluido, pueden evitarse con la resucitación de bajo volumen^{27,28}. Puede ser deseable la administración de volúmenes reducidos si la hemorragia progresiva está exacerbando las coagulopatías dilucionales (e.g., ver Stern para una revisión²⁹). El desarrollo de productos avanzados de resucitación, tales como vehículos de oxígeno a base de hemoglobina (HBOCs)³⁰, facilita la capacidad de lograr la oxigenación adecuada de tejidos sin la infusión de grandes volúmenes de fluidos. Sin embargo, la introducción de HBOCs se anticipa a crear una necesidad de productos de bajo volumen para sistemas hemostáticos de suplemento, tales como plasma concentrado.

Los productos sanguíneos deshidratados se conocen en la técnica, y la técnica predominante para lograr el producto deshidratado es la liofilización (congelación y después deshidratación al vacío). Por ejemplo, las Patentes de E.U. Nos. 4,287,087 y 4,145,185 de Brinkhous et al describe plaquetas de sangre deshidratada que se han fijado con un reactivo de reticulación tal como formaldehído. Las Patentes de E.U. Nos. 5,656,498; 5,651,966; 5,891,393; 5,902,608 y 5,993,804 describen productos sanguíneos deshidratados adicionales. Tales productos son útiles para propósitos terapéuticos, debido a que son estables, tienen larga vida en anaquel y pueden utilizarse potencialmente en forma de polvo para la interrupción de la hemorragia en pacientes que sufren de trauma severo. Sin embargo, tales productos deben elaborarse bajo estrictas condiciones estériles a fin de evitar la contaminación.

Con las prácticas de transfusión actuales, el plasma se proporciona

frecuentemente como un producto descongelado "congelado en fresco" de un solo donante. Sin embargo, ya que la refrigeración es difícil de proporcionar en aplicaciones militares en avance, países subdesarrollados y situaciones de medicina de rusticidad, este factor de forma puede ser logísticamente problemático. Así, la eliminación de la congelación (liofilización) a través de un producto de plasma deshidratado sería una ventaja significativa. Además, el producto de plasma deshidratado es significativamente más fácil de reducir en patógenos que en el plasma congelado en fresco. La presente invención se considera que es una respuesta a esa necesidad.

10 **SUMARIO DE LA INVENCION**

En una modalidad, la presente invención se dirige a un método para preparar productos sanguíneos deshidratados, que comprende las etapas de: (a) proporcionar un producto sanguíneo deshidratado; (b) deshidratar por aspersion el producto sanguíneo hidratado para producir un producto sanguíneo deshidratado, así como productos sanguíneos deshidratados elaborados por el método.

En otra modalidad, la presente invención se dirige a 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 del producto sanguíneo deshidratado para producir una composición terapéutica rehidratada; y (b) administrar la composición terapéutica rehidratada al paciente.

En otra modalidad, la presente invención se dirige a un vendaje o auxiliar quirúrgico que comprende los productos sanguíneos deshidratados descritos arriba.

En aún otra modalidad, la presente invención se dirige a un método para preparar plaquetas sanguíneas fijas deshidratadas, que comprende las etapas de: (a) proporcionar plaquetas sanguíneas fijas hidratadas; y (b) deshidratar por aspersion las plaquetas sanguíneas fijas hidratadas para producir plaquetas sanguíneas fijas deshidratadas así como plaquetas sanguíneas fijas deshidratadas elaboradas por el método.

En aún otra modalidad, la presente invención se dirige a 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 plaquetas sanguíneas fijas deshidratadas para producir una composición terapéutica rehidratada; y (b) administrar la composición terapéutica rehidratada al paciente.

En aún otra modalidad, la presente invención se dirige a un vendaje o auxiliar quirúrgico que comprende las plaquetas sanguíneas fijas deshidratadas descritas arriba.

En aún otra modalidad, la presente invención se dirige a plaquetas sanguíneas fijas deshidratadas por aspersion que tienen geometría alveolada esférica, en donde cuando dichas plaquetas sanguíneas fijas deshidratadas por aspersion se rehidratan para formar una composición de plaquetas sanguíneas fijas rehidratadas, la composición tiene un valor de una turbidez (A_{500}) menor que la de la composición liofilizada rehidratada comparable de las plaquetas sanguíneas fijas.

Estas y otras modalidades se volverán 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 deshidratado por aspersion de acuerdo con la presente invención;

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

La Figura 3 representa gráficas que muestran la productividad de la trayectoria de coagulación original con el plasma deshidratado por aspersion 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 deshidratado por aspersion producido de acuerdo con el método de la invención;

La Figura 5 es una gráfica que representa la turbidez y la tasa de rehidratación del plasma desecado por aspersion vs liofilizado en varias concentraciones;

La Figura 6 es una micrografía electrónica de las plaquetas sanguíneas derivadas de deshidratación por aspersion rehidratadas;

La Figura 7 es otra micrografía electrónica de las plaquetas sanguíneas derivadas de deshidratación por aspersión rehidratadas; y

La Figura 8 es una micrografía electrónica que ilustra la aglutinación de ristocetina de las plaquetas rehidratadas deshidratadas por aspersión.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Como se indica arriba, la presente invención se dirige a métodos para preparar productos sanguíneos deshidratados elaborados por el método. Los
10 productos sanguíneos hidratados útiles que pueden deshidratarse por el método de la invención incluye, pero no se limita a, sangre entera, plasma sanguíneo, plaquetas sanguíneas, células rojas sanguíneas, suero sanguíneo, plasma y combinaciones de estos. Un producto sanguíneo particularmente útil que es adecuado para el método de la presente invención son las plaquetas sanguíneas
15 que se han fijado con un agente fijador, tal como formaldehído o para formaldehído. Adicionalmente, los productos sanguíneos pueden modificarse con agentes de diagnóstico o terapéuticos adicionales, tales como, agentes formadores de imágenes, factores de concentración, fármacos mejoradores del desempeño, reactivos antimicrobianos y antivirales, soluciones de donador
20 universal y lo similar, así como una combinación de estos. Un ejemplo de un producto modificado útil es STASIX (plaquetas sanguíneas deshidratadas derivadas) disponibles de Entegrión, Inc. (Research Triangle Park, NC).

La técnica de deshidratación por aspersión se utiliza en el método de la invención como una alternativa para las técnicas de deshidratación
25 convencionales conocidas en la técnica, tal como la liofilización (congelación y después deshidratación al vacío). La deshidratación por aspersión es un método para transformar materiales en un estado fluido hacia una forma particulada deshidratada al asperjar una alimentación de un material hacia un medio de deshidratación por calor. La deshidratación por aspersión incluye la evaporación
30 de la humedad a partir de una alimentación atomizada al mezclar el rocío y el medio de deshidratación de manera controlada. El medio de deshidratación es

típicamente aire, aunque también pueden utilizarse otros gases tal como nitrógeno. La deshidratación procede hasta que se alcanza el contenido de humedad deseado en las partículas asperjadas y el producto entonces se separa del medio de deshidratación.

5 El proceso completo de deshidratación por aspersión consiste básicamente de una secuencia de cuatro procesos. La dispersión puede lograrse con una tobera de presión, una tobera de dos fluidos, un atomizador de disco giratorio o una tobera ultrasónica. La selección del tipo de atomizador depende de la naturaleza y cantidad de alimentación y las características deseadas del
10 producto deshidratado. Entre mayor en la energía para la dispersión, las gotas generadas son más pequeñas. La manera en que el rocío hace contacto con el aire deshidratado es un factor importante en el diseño de deshidratadores por aspersión, según esto se tiene mayor producción sobre las propiedades del producto deshidratado por la influencia del comportamiento de las gotas durante la
15 deshidratación. En una modalidad, el material se rocía en la misma dirección según el flujo del aire caliente a través del aparato. Las gotas se ponen en contacto con el gas deshidratado caliente cuando se encuentran con más humedad. En otra modalidad, el material se rocía en la dirección opuesta del flujo del gas caliente. El gas caliente fluye hacia arriba y el producto cae a través a
20 través del aire que incrementa el calor en la charola de recolección. La humedad residual se elimina, y el producto se vuelve muy caliente. Este método es adecuado sólo para productos térmicamente estables. En aún otra modalidad, las ventajas de ambos métodos de aspersión se combinan. El producto se rocía hacia arriba y sólo permanece en la zona caliente por un corto tiempo para
25 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 se encuentra sólo en la zona caliente por un corto tiempo, y existe menos probabilidad que se afecte por el calor.

En el método de deshidratación por aspersión, el aire se utiliza
30 principalmente como medio de deshidratación, pero pueden utilizarse otros gases tales como nitrógeno. La corriente de gas se calienta eléctricamente o en un

calentador y después el proceso sale a la atmósfera. Si el medio calentado se recicla y se reutiliza, típicamente se utiliza un gas inerte como el nitrógeno en lugar de aire. El uso de nitrógeno es ventajoso cuando se procesan solventes flamable, productos tóxicos o productos sensibles al oxígeno.

5 Durante el proceso de deshidratación por aspersion, tan pronto como las gotas del rocío se ponen en contacto con el gas de deshidratación, tiene lugar la evaporación de la película saturada de vapor, 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
10 masa da como resultado la deshidratación eficiente. La evaporación conduce a un enfriamiento de las gotas y así a una carga térmica pequeña. El diseño de la cámara de deshidratación y la tasa de flujo de aire proporciona un tiempo de residencia de las gotas en la cámara, de tal manera que el retiro de humedad deseado de las gotas se completa y el producto se retira del deshidratador antes
15 de que se pueda elevarse la temperatura del producto a la temperatura del aire a la salida del deshidratador. Por lo tanto existe una pequeña probabilidad de que el calor dañe al producto.

 Se utilizan dos sistemas para separar el producto del medio de deshidratación. Primero, la separación primaria del producto deshidratado tiene
20 lugar en la base de la cámara de deshidratación, y segundo, la recuperación total del producto deshidratado en el equipo de separación. En una modalidad, se utiliza una ciclona para recolectar el material. En base a fuerzas inerciales, las partículas se separan hacia la pared de la ciclona como tensión de paso descendente y se retiran. Otros sistemas tales como precipitadores
25 electrostáticos, filtros textiles (bolsas) o recolectores en húmedo tal como depuradores, pueden utilizarse para recolectar el producto seco.

 Como se utiliza en la presente invención, la deshidratación por aspersion ofrece ventajas sobre otros métodos de deshidratación tales como la liofilización (congelado y después deshidratado al vacío). El uso de la
30 deshidratación por aspersion produce un producto que es más consistente, menos grumoso y de mejor dispersión que los métodos de deshidratación por

congelación. Las partículas altamente dispersas producidas por deshidratación por aspersión también permiten una tasa rápida de rehidratación, lo cual es probablemente el resultado de una mayor área superficial disponible. En contraste, la naturaleza aglutinada de un producto deshidratado congelado, da como resultado tiempos de rehidratación sustancialmente mayores para los productos sanguíneos que los deshidratados en el método de la invención. Ya que muchas transfusiones y otros usos de los productos sanguíneos pueden ser altamente sensibles al tiempo, la mayor tasa de rehidratación puede ser una ventaja significativa en el campo de batalla o situaciones de tratamiento de emergencia. Como se explica en más detalle a continuación, las plaquetas sanguíneas fijas por deshidratación por aspersión de la invención pueden rehidratarse para formar una composición de plaquetas sanguíneas fijas rehidratadas, y la composición tiene un valor de turbiedad (A500) menor que una composición liofilizada rehidratada comparable de plaquetas sanguíneas fijas.

Los productos deshidratados por aspersión del método de la invención pueden utilizarse como tratamientos tópicos en el tratamiento de heridas. En una modalidad, los productos pueden utilizarse directamente sobre una herida para ayudar a la coagulación o puede aplicarse a un vendaje o auxiliar quirúrgico o cubrir para ayudar en el saneamiento de la herida. En una modalidad alternativa, las formas rehidratadas de los productos deshidratados por aspersión 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 reposo farmacológico), disfunción plaquetaria hemorrágica y víctimas de trauma que experimentan hemorragia severa.

EJEMPLOS

Diseño General y Métodos

Concentración de plasma deshidratado por aspersión. El plasma humano tratado con mezcla de solvente-detergente (Kedrion S.p.A., Barga, Italia)

y plasma porcino de un grupo de diez animales (donado por Francis Owen Blood Research Laboratory (Laboratorio de Investigación Sanguínea Francis Owen), Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill) pueden deshidratarse por aspersión a través un rango de parámetros de funcionamiento instrumental o deshidratación por congelación con un ciclo de liofilización estándar para obtener diferentes tamaños de micropartículas deshidratadas. Los productos se rehidratan entonces con volúmenes diferentes 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 y comparar para establecer el límite superior para concentración. A continuación, los detalles de los experimentos:

Deshidratación de plasma. Los plasmas porcino y humano pueden deshidratarse por aspersión en un deshidratador por aspersión de investigación Buchi B-270 a una tasa de flujo de 415 litros de N₂ por hora a 140°C, 130°C, 120°C, 110°C, y menores si puede obtenerse la deshidratación. Las series se realizaron preferentemente tres veces a cada temperatura y con cada tipo de plasma (i.e., porcino y humano). El producto final puede analizarse para el contenido de humedad y las micropartículas representarse en imagen con el microscopio electrónico 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 masa de "liofilizado de control". Como se muestra en las Figuras acompañantes, el material deshidratado por aspersión se observa para que sea un polvo fino, y aparezca como microesferas bajo el microscopio, mientras el material liofilizado forma una masa.

Rehidratación del plasma. Los lotes control de deshidratación por aspersión y liofilización (cada uno por triplicado) se rehidratan con el volumen apropiado de agua estéril con glicina por 1x, 2x, 3x, 4x y posiblemente hiperconcentraciones mayores del plasma. La rehidratación puede ser con soluciones de glicina a pH = 2.4 para un producto, con un pH = 7.4 de la rehidratación final como sigue: 1x- 20mM de glicina, 2x- 40 mM de glicina, 3x- 60mM de glicina, 4x- 80mM de glicina, etc.

Análisis físico y químico. El siguiente análisis puede realizarse con

5 cada muestra por triplicado de plasma de inicio (pre-deshidratado por aspersión), cada lote de material deshidratado por aspersión y el plasma control liofilizado. Pueden hacerse comparaciones con la *Wilcoxon Signed Rank Test* (*Prueba de Wilcoxon de Rangos Señalados*), y se valorarán direccionalmente utilizando *Sign test* (*Contraste de los Signos*).

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

La viscosidad puede valorarse con un viscosímetro de bola.

10 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 midieron con el análisis ELISA.

Cambio de la trayectoria de coagulación - Se midieron los tiempos de protrombina y los tiempos de protrombina parcial activada con plasmas concentrados después de la dilución de las soluciones hiper-concentradas a 1x.

La coagulación final se examinó con el microscopio electrónico de barrido para valorar el grosor y densidad de las fibras.

Una solución concentrada preferentemente tendrá la reología apropiada para la práctica de transfusión estándar en la cual los niveles del factor de coagulación y las actividades estarán dentro de los rangos de variación intra- e inter-individual normales. Esta solución puede utilizarse para las infusiones "más concentradas" en estudios porcinos descritos arriba.

La evaluación de seguridad de productos de plasma concentrado en cerdos. La meta de estos estudios es identificar una dosis máxima tolerada para preparaciones de plasma hiper-concentrado en cerdos heridos. Los animales se someten a daños hepáticos por pérdida de sangre y la inducción de choque hemorrágico compensado. Los animales se infunden entonces con preparaciones porcinas de plasma hiper-concentrado hasta que se nota una respuesta hemodinámica adversa. A la terminación del 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 Hiper-concentrado. Se anestesiaron cerdos de 40 a 50 kg (obtenidos de la colonia de crías de la División de Laboratorio de Medicina Animal (UNC)).

- 5 Análisis de los procesos hemodinámico y vasoactivo. Se colocaron varios detectores para seguir los procesos hemodinámico y vasoactivo: se insertó un catéter de termo dilución de arteria pulmonar a través de la vena yugular externa en una arteria pulmonar; se colocaron catéteres de punta de micromanómetro a través de los vasos femorales izquierdos hacia el atrio derecho
- 10 y la aorta torácica; se insertó un catéter de calibre .22 en la arteria femoral izquierda y se conectó a la bomba de retiro. Se midieron los patrones de flujo de sangre al colocar sondas de flujo Doppler en las arterias cefálica y mesentérica; este procedimiento puede soportarse por el corte de la arteria carótida y la laparotomía.
- 15 inducción de choque e infusión de plasma hiper-concentrado. Puede inducirse el choque hemorrágico al retirar 40% del volumen total sanguíneo a través de un periodo de una hora. Después del retiro de la sangre y la verificación del choque hemorrágico (presión sanguínea arterial promedio <40 mm Hg, (cambio en el patrón de flujo sanguíneo cefálico y esplénico), los animales se
- 20 infunden con dosis múltiples de 1x de plasma deshidratado por aspersion o plasma deshidratado por aspersion hiper-concentrado en un nivel intermedio y alto de concentración (para determinarse como se describe arriba). Cada infusión es preferentemente un volumen equivalente a 1/10 del volumen sanguíneo del animal y se realiza preferentemente a través de un periodo de tres minutos con una
- 25 bomba de jeringa Harvard. Pueden medirse los parámetros hemodinámico y otros fisiológicos, y las infusiones pueden detenerse cuando dos bolos sucesivos den como resultado el empeoramiento de la estabilidad hemodinámica. Los animales
- se sacrifican entonces para la autopsia y los análisis histológicos. El número de animales y lo productos infundidos utilizados en este Ejemplo se muestran en la
- 30 Tabla 1.

Producto Infundido	Número de animales
Plasma 1x	3
Concentración intermedia (e.g., 2x)	3
Concentración alta (e.g., 4x)	3
Total de Animales	9

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

Análisis de datos. Las comparaciones entre los grupos de plasma se hacen con la *Prueba de Wilcoxon de Rangos Señalados* y se valoran direccionalmente utilizando el *Contraste de los Signos*.

10 Ejemplo 1: Deshidratación por Aspersión de Plasma y Conservación de las actividades de la Proteína de Coagulación

La siguientes series de experimentos demuestran que el plasma puede deshidratarse por aspersión para obtener micropartículas deshidratada, y después rehidratarlas al volumen original del plasma con los niveles del factor de
15 coagulación y los parámetros de coagulación originales naturales. El plasma de la mezcla de solvente-detergente se sometió a deshidratación por aspersión 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 se
20 deshidratan por aspersión otras proteínas, indicando que la cubierta superficial de la proteína se forma como resultado de las cinéticas iniciales del retiro de agua y concentración (e.g., ver Vehring¹⁶). Sin embargo, esta geometría es característica sobre el plasma liofilizado que despliega una textura superficial rugosa.

A la rehidratación con glicina 20 mM, pH = 2.4 para la compensación
25 de la pérdida de protones durante el proceso de deshidratación para la concentración original de proteínas, los niveles del factor de coagulación se

encontraron ser esencialmente los mismos que en el plasma original antes de la deshidratación por aspersión como se muestra en la Figura 2. La deshidratación por aspersión también tuvo un efecto significativo sobre las cinéticas de la coagulación plasmática (Figura 3). Existió una tendencia estadística (que no fue significativa en este análisis) hacia la productividad molecular de proteína de coagulación mejorada después de la deshidratación por aspersión, un efecto que pudiera relacionarse a las diferencias en los estados de asociación de las proteínas en las muestras de plasma. Los filamentos de fibrina después de la polimerización del plasma deshidratado por aspersión tuvo morfología normal (Figura 4).

En contraste a 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 en concentraciones super-fisiológicas se consumen con el tiempo y dan 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 deshidratación por aspersión o liofilización, después se rehidrató a la concentración final natural (1x), 2x, 3x o 4x. Los tiempos de rehidratación, en base a los tiempos para que ocurra la dilución macroscópica, fueron dramáticamente más rápidos con el material deshidratado por aspersión debido al área superficial masiva de la formulación microscópica, y dieron como resultado una suspensión significativamente menos turbia como se muestra por los menores valores A_{500} en la Figura 5.

En adición al plasma arriba descrito, otros productos sanguíneos pueden deshidratarse y rehidratarse de acuerdo con la descripción anterior. Virtualmente cualquier producto sanguíneo tratado o no tratado puede utilizarse en el método de la invención. Los ejemplos de productos sanguíneos incluyen sangre entera, plasma sanguíneo, plaquetas sanguíneas, células sanguíneas rojas, suero sanguíneo, así combinaciones de éstos. Los productos sanguíneos pueden utilizarse en el método de la invención en su estado que se presenta de

manera natural, o puede modificarse en cualquier forma. Los ejemplos de modificaciones de estos productos sanguíneos incluyen la fijación con un agente de fijación tal como formaldehído o paraformaldehído como se describe en las Patentes de E.U. Nos. 5,651,966; 5,891,393; 5,902,608; y 5,993,804; además de los agentes formadores de imagen, factores de concentración, fármacos mejoradores del desempeño, reactivos antimicrobianos y antivirales y soluciones de donante universal. Un ejemplo de un producto útil modificado es STASIX (plaquetas sanguíneas deshidratadas derivadas) disponibles de Entegriion, Inc. (Research Triangle Park, NC). El siguiente es un protocolo general para rehidratación de partículas STASIX deshidratadas por aspersión.

Ejemplo 2: Rehidratación de Plaquetas Sanguíneas Derivadas Deshidratadas por Aspersión

El objetivo de este ejemplo es rehidratar plaquetas sanguíneas derivadas deshidratadas por aspersión (vendidas bajo el nombre comercial STASIX y disponibles de Entegriion, Inc., NC) de manera que la concentración de todos los componentes (partículas de plaqueta, sales de regulador, agentes de volumen (albúmina de suero humano)) son los mismos como en la suspensión que estuvieron en el deshidratador por aspersión.

Esto se logró en tres etapas.

Primero, se obtuvo un "valor de referencia A_{280} " para el medio de volumen utilizado para la suspensión de pre-deshidratación por aspersión. Este es un valor A_{280} nm para la pre-deshidratación por aspersión después que las plaquetas se agitaron, reflejando la concentración de la proteína sobrenadante, que el agente de volumen de albúmina de suero humano mayor. Segundo, se realizó una prueba de rehidratación con el polvo post-deshidratado por aspersión a 10% (p/v), después se midió la densidad óptica a 280 nm (A_{280}) del agente de volumen (albúmina de suero humano). Tercero, se compararon los valores del sobrenadante de la pre-deshidratación por aspersión A_{280} y el 10% de sobrenadante A_{280} (relacionadas) para determinar cuán lejos fue la aproximación del 10% de rehidratación. Esta relación se utilizó entonces para calcular el porcentaje del peso exacto del polvo deshidratado que se necesita para igualar la

concentración de proteína del agente de volumen de la suspensión del pre-deshidratado por aspersión.

El contero de plaquetas de las partículas post-rehidratadas se mide entonces de dos maneras. Primero con un contador de células Hiska y segundo al
5 medir la turbidez óptica. Estos valores y los volúmenes de rehidratación relacionados, forman el punto de inicio para todos lo análisis de caracterización de partícula.

Procedimiento

1. Medir la densidad óptica del pre-deshidratado por aspersión
10 para obtener el valor A_{280} de referencia.

a) Descongelar la muestra líquida del pre-deshidratado por aspersión y revolver las partículas por centrifugación en una microfuga de mesa a una calibración de cinco durante dos minutos. Retener el sobrenadante.

b) Diluir 1/10 del sobrenadante en salina de citrato por triplicado y
15 se miden los valores A_{280} con el espectrómetro de nanogotas.

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

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

b) Agitar las partículas como arriba y retener el sobrenadante.

c) Diluir 1/10 de cada sobrenadante de muestra rehidratada en salina con citrato por triplicado y medir los valores A_{280} .

25 3. Calcular el porcentaje de peso de la rehidratación para acoplar el valor del deshidratado por aspersión como sigue:

a) Dividir los valores A_{280} a partir del sobrenadante deshidratado por aspersión entre el factor de dilución (1/10) y promediar los tres valores para obtener la referencia teórica de A_{280} o $A_{280, ref}$.

30 b) Dividir los valores A_{280} a partir del 10% del sobrenadante de la rehidratación entre el factor de dilución /1/10) y promediar los tres valores para

obtener el valor teórico A_{280} no diluido, referido como $A_{280, 10\%}$.

- c) Relacionar los valores $A_{280, 10\%}$ a $A_{280, ref}$ de acuerdo con la Ecuación 1 para obtener la masa de rehidratación adecuada (p/v) del polvo del deshidratado por aspersión de manera que la muestra rehidratada tendrá el mismo
- 5 valor A_{280} que el valor de referencia A_{280} .

Ecuación 1

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

*el porcentaje de peso puede estar en unidades de mg/ml, e.g., 8.9% (p/v) es equivalente a 89 mg/ml.

10 Medición del conteo de partículas de STASIX

- a) Diluir el 10% de la suspensión de rehidratación (no realizar la agitación celular) 1/10 con salina con citrato por triplicado.
- b) Medir la turbidez a A_{280} de cada muestra.
- c) Medir el conteo celular directo con el analizador hematológico

15 Hiska.

- d) Cálculo y factor de la pérdida de rendimiento.

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

20 Ejemplo 3: Estudio de Toxicidad en Hallazgos Intravenosos - Rango De Una Sola Dosis

Se diseñó un estudio para valorar la toxicidad de las plaquetas sanguíneas derivadas deshidratadas por aspersión (Stasix deshidratadas por aspersión como se describe arriba, después rehidratadas) cuando se administra a

25 través de infusión intravenosa (durante aproximadamente 5 minutos) a monos como una dosis única. Se observó un subgrupo recuperado de los animales durante 7 días.

Se utilizaron cinco grupos de animales - Grupo 1 - vehículo control (amortiguador); Grupo 2 - dosis terapéutica 1X de STASIX; Grupo 3 - dosis

30 terapéutica 5X de STASIX; Grupo 4 - dosis terapéutica 10X de STASIX; 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, i.e., un adicional de 30,000 partículas de plaqueta por microlitro de sangre.

No se observaron efectos adversos ya sea sintomáticos o micro-
5 patológicos en ninguno de los monos utilizados en el experimento. Ya que 2 monos machos y 2 monos hebras todos toleraron una dosis terapéutica 1X de STASIX infundida a través de 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 una graduación clínica en humanos, la dosis de STASIX pudiera
10 infundirse a una tasa de tiempo más lenta de 20 minutos.

La necropsia de los 14 monos del estudio que comprende los 5 grupos de dosis se condujo en ya sea en el Día 2 o el Día 8 después de la infusión, y no mostró evidencia del desarrollo de microtrombos ni en el corazón ni en el hígado. En resumen, en un estudio detallado en animales conducido por el
15 principal laboratorio de investigación exterior, bajo todas las regulaciones de uso y manejo de animales apropiadas, se mostró STASIX para desplegar efectos no dañinos en niveles ya sea macroscópicos o microscópicos a dosis 10 veces superiores a la dosis terapéutica humana propuesta.

Ejemplo 4: Deshidratación por Aspersión de Plaquetas Estabilizadas en Aldehído

20 En este ejemplo se examina la utilidad de la deshidratación por aspersión como una alternativa a la liofilización para la deshidratación de plaquetas estabilizadas en aldehído. Las plaquetas de aféresis humana se estabilizaron utilizando el procedimiento de Read et al., descrito en la Patente de E.U. No. 5,651,966, la cual se incorpora en la presente mediante la referencia en
25 su totalidad.

La deshidratación por aspersión (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 5% (p/v) de albúmina de suero humano como se describió arriba, da como resultado un polvo fino que, al examen, consiste de partículas
30 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 deshidratadas con deshidratación por aspersión y después se rehidrataron a los volúmenes de pre-deshidratación originales. El rendimiento (post-rehidratación/pre-deshidratación por aspersión) de las plaquetas contables fue 5 96.8% +/- 7.0% (desviación estándar) de estas diecisiete series.

La Figura 8 representa las plaquetas deshidratadas por aspersión 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 amortiguador de control (Panel A). Se 10 observaron agregados grandes con la adición de ristocetina, indicando que las funciones de recepción del factor 1B - von Willebrand de la glicoproteína se conservan por deshidratación por aspersión.

Los monos cynomolgus (1 o 2/sexo/grupo) recibieron una sola dosis de infusión intravenosa de 5 minutos de las plaquetas deshidratadas por aspersión a dosis de 2.1×10^9 , 1.05×10^{10} o 2.1×10^{10} de plaquetas/kg. Los animales de control 15 (2/sexo) recibieron vehículo (5.375 mM de citrato de sodio y 2 mM de cisteína en salina fisiológica) y un grupo adicional recibió 500 mg/kg de albúmina de suero humano (HSA). El volumen de dosis fue 2 ml/kg/min para todos los grupos. Se observaron los animales durante 1 o 7 días post-dosis. Un día después de la 20 administración, 1 animal/sexo/grupo se sometió a eutanasia y necropsia. Un animal por sexo de los grupos control (2.1×10^{10} plaquetas/kg) se mantuvo 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. 25

La administración de todas las dosis de plaquetas deshidratadas por aspersión (hasta 2.1×10^{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 30 dosis altas (2.1×10^{10} plaquetas/kg) (la hembra) en 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 (1.05×10^{10} o 2.1×10^{10} plaquetas/kg) y hembras tratadas con HSA en el día 2 y hembras de dosis alta (sólo los grupos de necropsia) en el día 8 que se correlacionaron con las observaciones microscópicas de decoloración oscura 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: Deshidratación por aspersión de plasma y pruebas en cerdos

El plasma separado de la sangre fresca de cerdo se almacenó ya sea como plasma congelado en fresco (FFP) o se conservó como plasma deshidratado congelado (FDP) o plasma deshidratado por aspersión (SDP preparado como se detalló en los ejemplos anteriores). Para la prueba in Vitro: Se reconstituyó SDP en agua destilada la cual fue ya sea igual (1xSDP) o un tercio (3xSDP) del volumen original de FFP. El análisis incluyó las mediciones del tiempo de protrombina (PT), el tiempo de tromboplastina parcial (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 trató con FFP o 3xSDP (n=4-5/grupo). Los perfiles de coagulación (PT, PTT, tromboelastografía) se

midieron en línea basal (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 de la deshidratación por aspersión. 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 deshidratarse por aspersión 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).
- 5 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**, S51-50 (2006).
3. Erber, W.N. & Perry, D.J. Plasma and plasma products in the treatment of massive haemorrhage. *Best Pract Res Clin Haematol*
10 **19**, 97-112 (2006).
4. Smith, M.W. Spray-drying synthetic detergents. *Manufacturin 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).
- 15 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.
20 *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).
- 25 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/beta-Cyclodextrin Solid Complexes Prepared in Aqueous Solution Followed by Spray-drying or by Physical Mixture. *AAPS PharmSciTech* (2009).
- 30

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 characterization of alendronate-loaded chitosan microparticles obtained through the spray drying technique. *Medicinal chemistry (Sharigah (United Arab Emirates))* **5**, 191-196 (2009).
13. Iskandar, F. et al. Production of morphology-controllable porous hyaluronic acid particles using a spray-drying method. *Acta biomaterialia* (2008).
14. Sen, D. et al. Evaporation Driven Self-Assembly of a Colloidal Dispersion during Spray Drying: Volume Fraction Dependent Morphological Transition. *Langmuir* (2009).
15. Zhang, X. et al. Preparation of a dispersible PEGlate 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 not 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).

- 5
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).
- 10
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).
- 15
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).
- 20
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).
- 25
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**, 833-890 (1997).
- 30
33. Manning, J.E. et al. 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).
- 5 34. Manning, J.E. et al. 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).
- 10 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. *United States Patent*, 6,369,048 (2002).
- 15 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).
- 20 40. Horowitz, B.a.C., S. Removal of antibodies from blood-derived compositions while retaining coagulation factors. *United States Patent*, **5,541,294** (1996).
- 25 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).
42. MacLennan, S. & Williamson, L.M. Risks of fresh frozen plasma and platelets. *The Journal of trauma* **60**, S46-50 (2006).
- 30 43. Solheim, B.G. Universal pathogen-reduced plasma in elective open-heart surgery and liver resection. *Clin Med Res* **4**, 209-217 (2006).

44. Noddeland, H. et al. 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.
5 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 thrombocytopathia. *Seminars in thrombosis and hemostasis* **26**, 373-377 (2000).
10
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).
15
49. Freeman, W.D. et al. 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).
20
51. Talkad, A., Mathews, M., Honings, D., Jahnel, J. & Wang, D. Reversal of warfarin-induced anticoagulation with factor VIIa to rt-PA in acute stroke. *Neurology* **64**, 1480-1481 (2005).
25

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar productos sanguíneos deshidratados, que comprende las etapas de:

- 5 a) proporcionar un producto sanguíneo hidratado;
- b) deshidratar por aspersion dicho producto sanguíneo hidratado para producir un producto sanguíneo deshidratado.

2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho producto sanguíneo hidratado se selecciona del grupo que consiste de sangre entera,
10 plasma sanguíneo, plaquetas sanguíneas, células rojas sanguíneas, suero sanguíneo, plasma y combinaciones de éstos.

3. El método de la reivindicación 1, en donde dicho producto sanguíneo hidratado se modifica física o químicamente.

4. El método de la reivindicación 3, en donde dicha modificación
15 es fijación química.

5. El método de la reivindicación 3, en donde dicha modificación comprende reactivos de diagnóstico o terapéuticos adicionales.

6. El método de la reivindicación 5, en donde dichos reactivos de diagnóstico o terapéuticos se seleccionan del grupo que consiste de agentes
20 formadores de imagen, factores de concentración, fármacos mejoradores del desempeño, reactivos antimicrobianos y antivirales, soluciones de donador universal y combinaciones de los mismos.

7. Los productos sanguíneos deshidratados elaborados por el método de la reivindicación 1.

25 8. 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 los productos sanguíneos deshidratados de la reivindicación 7 para producir una composición terapéutica rehidratada; y

30 (b) administrar dicha composición terapéutica rehidratada a dicho paciente.

9. Un vendaje o auxiliar quirúrgico que comprende los productos sanguíneos deshidratados de la reivindicación 7.

10. Un método para preparar plaquetas sanguíneas fijas deshidratadas, que comprende las etapas de:

- 5 (a) proporcionar plaquetas sanguíneas fijas hidratadas; y
(b) deshidratar por aspersion dichas plaquetas sanguíneas fijas hidratadas para producir plaquetas sanguíneas fijas deshidratadas.

11. El método de la reivindicación 10, en donde dichas plaquetas sanguíneas fijas hidratadas comprenden reactivos de diagnóstico o terapéuticos

- 10 12. El método de la reivindicación 11, en donde dichos reactivos de diagnóstico o terapéuticos se seleccionan del grupo que consiste de agentes formadores de imagen, factores de concentración, fármacos mejoradores del desempeño, reactivos antimicrobianos y antivirales, soluciones de donador universal y combinaciones de los mismos.

- 15 13. Las plaquetas sanguíneas fijas deshidratadas elaboradas por el método de la reivindicación 10.

14. Un método para tratar a un paciente que sufre de un trastorno relacionado con la sangre, que comprende las etapas de:

- 20 (a) rehidratar una cantidad terapéutica de las plaquetas sanguíneas fijas deshidratadas de la reivindicación 13 para producir una composición terapéutica rehidratada; y
(b) administrar dicha composición terapéutica rehidratada a dicho paciente.

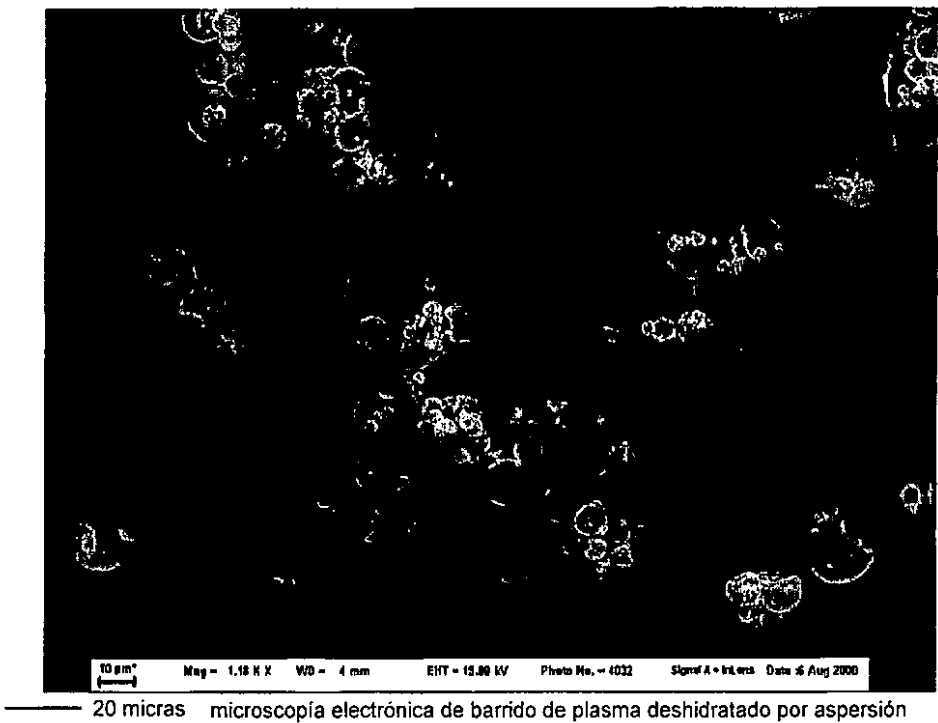
- 25 15. Un vendaje o auxiliar quirúrgico que comprende las plaquetas sanguíneas fijas deshidratadas de la reivindicación 13.

16. Las plaquetas sanguíneas fijas deshidratadas por aspersion que tienen geometría alveolada esférica, en donde cuando dichas plaquetas sanguíneas fijas deshidratadas por aspersion se rehidratan para formar una composición de plaquetas sanguíneas fijas rehidratadas, dicha composición tiene
30 un valor de una turbidez (A_{500}) menor que la de la composición liofilizada rehidratada comparable de las plaquetas sanguíneas fijas.

RESUMEN

La presente invención se dirige a un método para preparar productos sanguíneos deshidratados, que comprende las etapas de: (a) proporcionar un
5 producto sanguíneo hidratado; (b) deshidratar por aspersión el producto sanguíneo hidratado para producir un producto sanguíneo deshidratado, así como productos sanguíneos deshidratados elaborados por el método. La presente invención se dirige a un método para tratar a un paciente que sufre de un trastorno relacionado con la sangre, que comprende las etapas de: (a) rehidratar una
10 cantidad terapéutica del producto sanguíneo deshidratado para producir una composición terapéutica rehidratada; y (b) administrar la composición terapéutica rehidratada al paciente. La presente invención se dirige a un vendaje o auxiliar quirúrgico que comprende los productos sanguíneos deshidratados arriba descritos.

Microesferas de Plasma Deshidratado por Aspersión



20 micras microscopía electrónica de barrido de plasma deshidratado por aspersión

Figura 1

La Deshidratación por Aspersión Afecta de Manera Mínima el Perfil de la Proteína de Coagulación

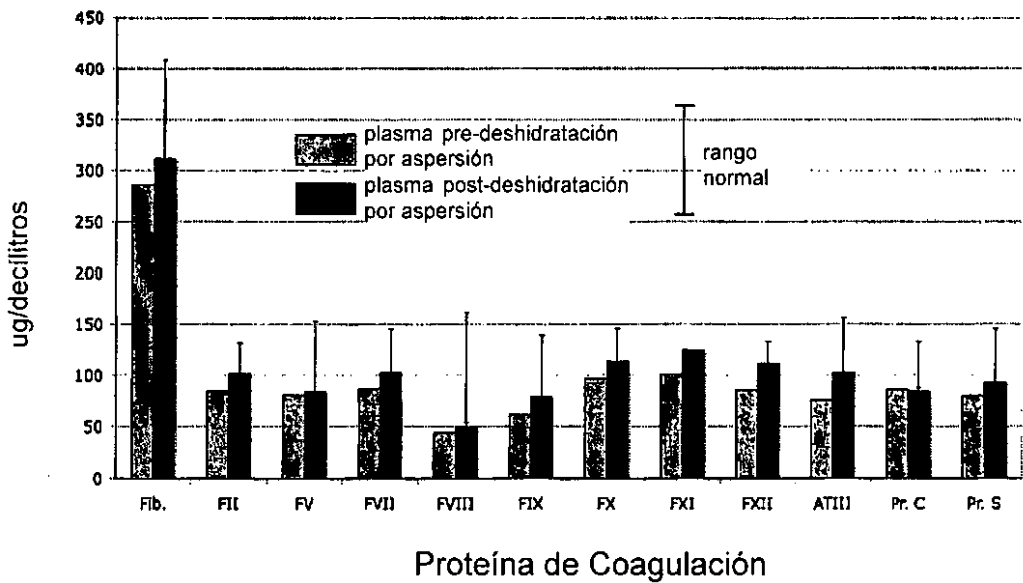


Figura 2

Cambio de la Trayectoria de Coagulación Original con el Plasma Deshidratado por Aspersión

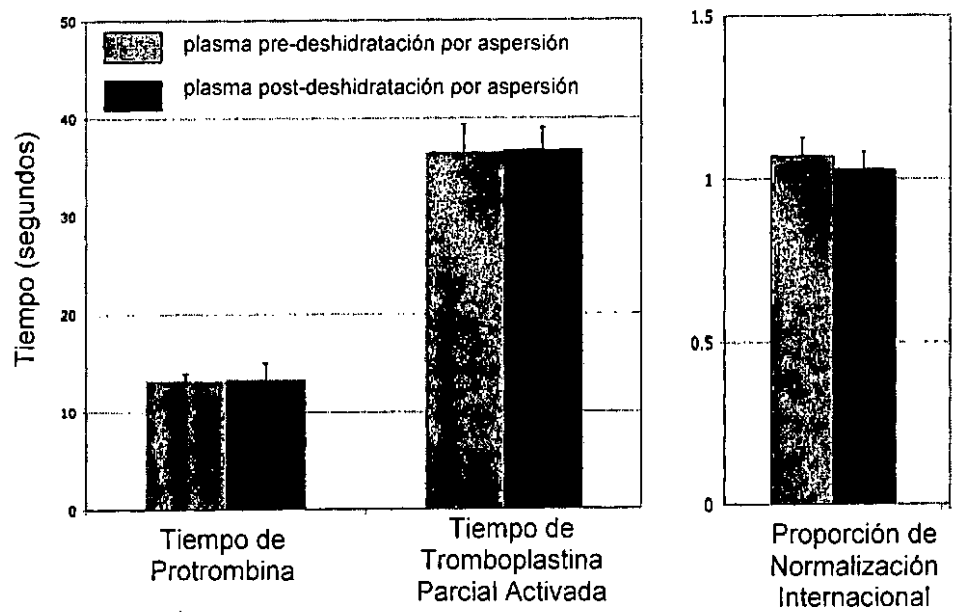
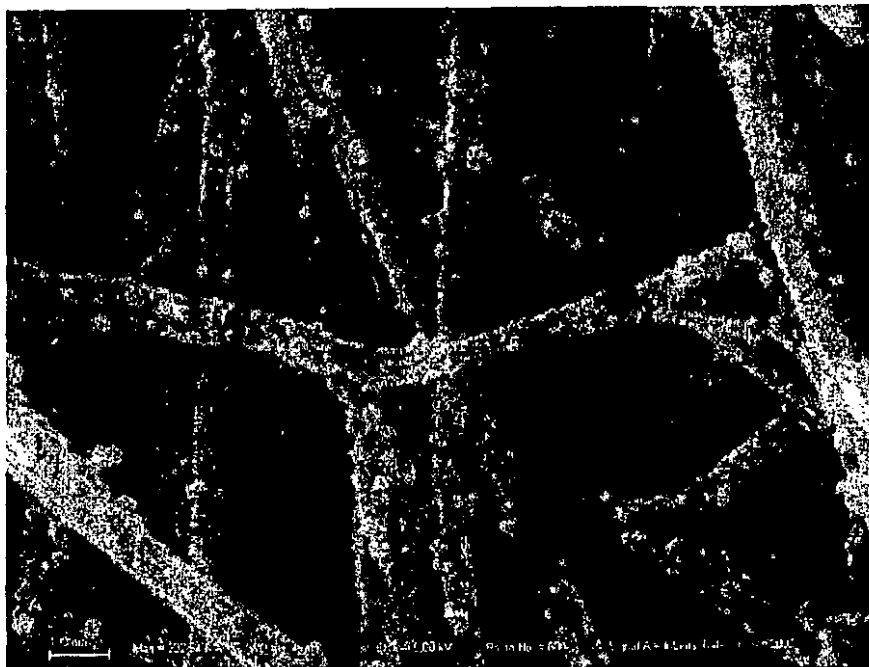


Figura 3

Ultraestructura de Fibrina de Plasma Deshidratado por aspersión



— 100 nanómetros Electro-micrograma de barrido de Coagulo de Fibrina

Figura 4

Turbidez de Plasma Deshidratado por Aspersión vs Liofilizado

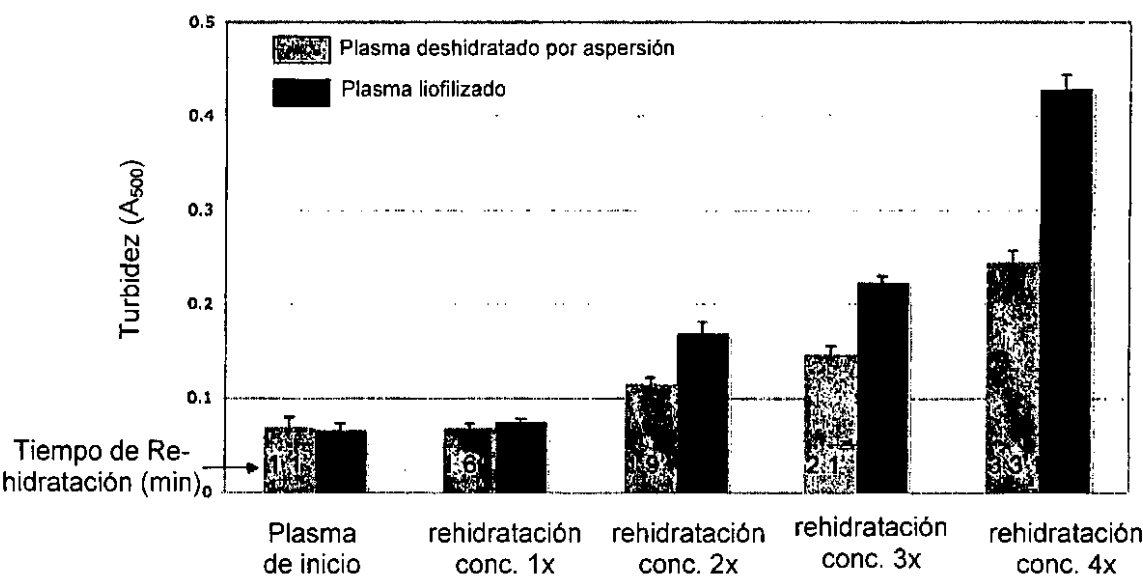


Figura 5

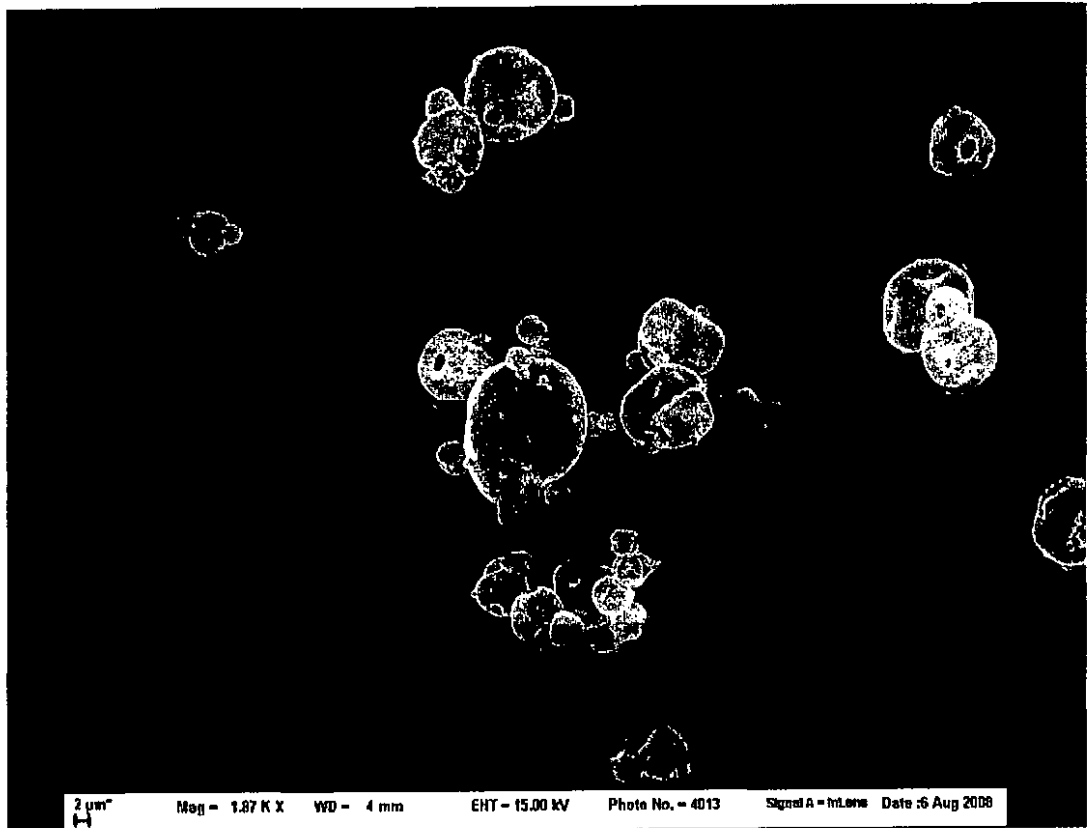


Figura 6

Figura 7

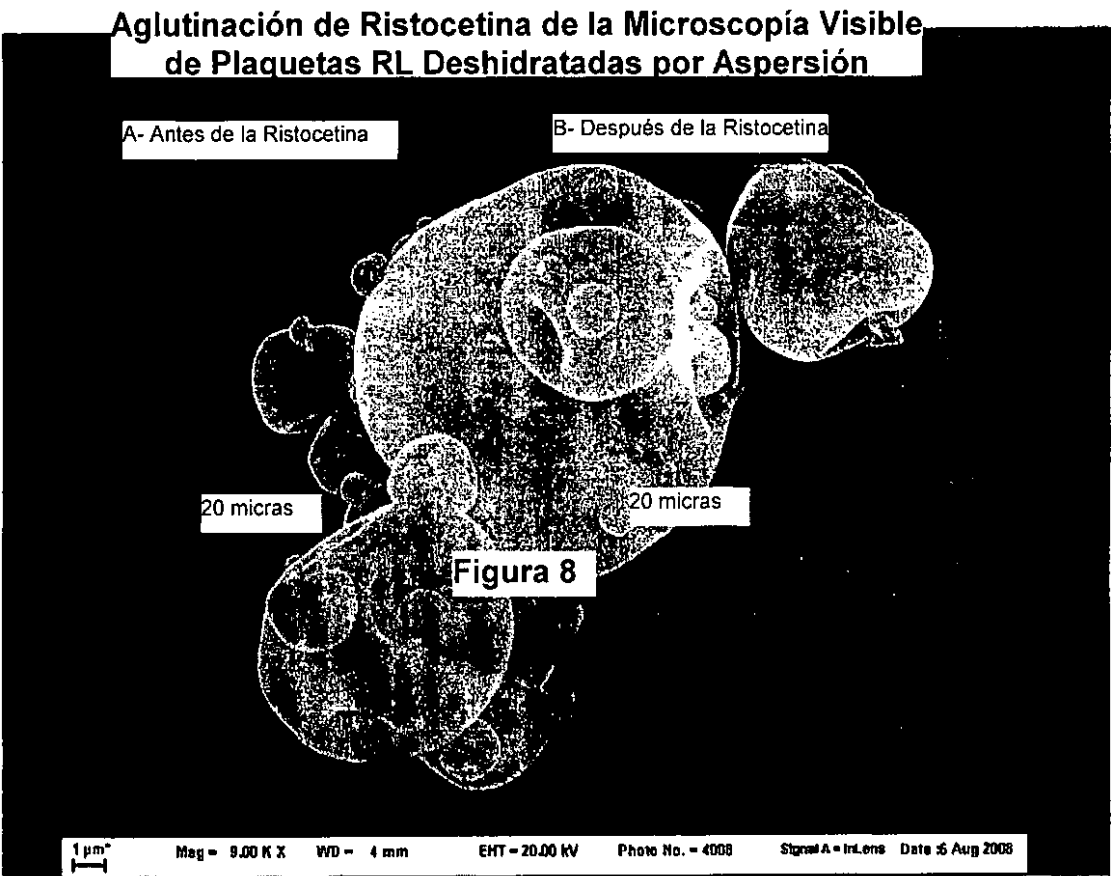


Figure 7

Ristocetin Agglutination of Spray-Dried RL Platelets Visible Microscopy

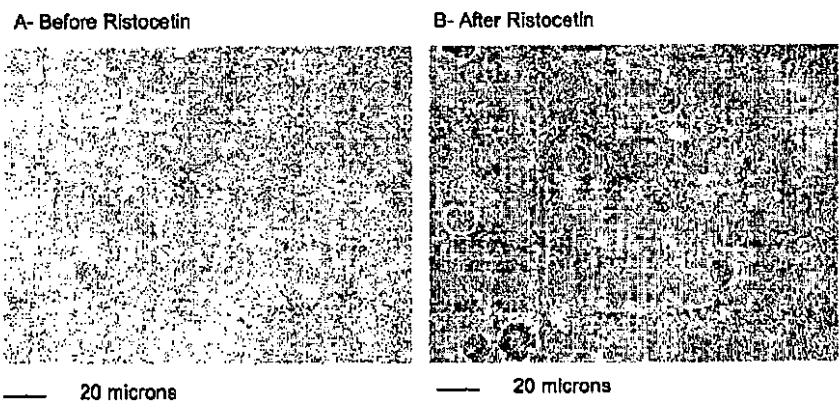


Figure 8

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-

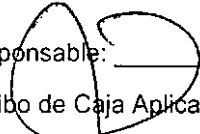
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 107573
		Bogotá D.C., Noviembre 02 de 2011 - 14:43:51

RECIBIDO DE : GOMEZ PINZON ASEMARCAS S.A.	NI 830.121.797
---	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	192556954	01/11/2011	11.945.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00
			=====	

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-151086-00000-0000
Fecha: 2011-11-08 16:23:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 40

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

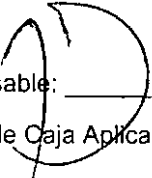
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 107568
		Bogotá D.C., Noviembre 02 de 2011 - 14:43:51

RECIBIDO DE : GOMEZ PINZON ASEMARCAS S.A. NI 830.121.797

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	192556954	01/11/2011	11.945.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NUEVAS CREACIONES	162.000.00	162.000.00
			\$162.000.00

SON: **CIENTO SESENTA Y DOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-151086- 00000-0000
Fecha: 2011-11-08 16:23:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 40

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE

☐

Indicación que se solicita una patente.

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒

Indicación que se solicita una PCT

☒

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☒

Dibujos de ser estos pertinentes

☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐