

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 341**

51 Int. Cl.:

**A61M 1/34** (2006.01)

**A61K 35/14** (2015.01)

**A61K 38/48** (2006.01)

**A61M 1/02** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2019** **PCT/IL2019/050228**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2019** **WO19167048**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2019** **E 19714806 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2024** **EP 3746151**

54 Título: **Dispositivo extracorpóreo y matriz para la eliminación de proteínas fibrinolíticas de fluidos biológicos, métodos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**28.02.2018 US 201862636511 P**

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

**22.10.2024**

73 Titular/es:

**PLAS-FREE LTD. (100.0%)**  
**P.O. Box 1252**  
**1711102 Nazareth Illit, IL**

72 Inventor/es:

**HIJAZI, ABD ALRAUF y**  
**DVASHI, ZEEV**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 983 341 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**

Dispositivo extracorpóreo y matriz para la eliminación de proteínas fibrinolíticas de fluidos biológicos, métodos y usos de los mismos

**Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de la coagulación y la medicina transfusional. Más específicamente, la presente invención proporciona un dispositivo y una matriz específicos para deplecionar los agentes fibrinolíticos de los fluidos biológicos, los productos de fluidos biológicos resultantes que carecen de actividad fibrinolítica, los métodos y usos de los mismos.

**Antecedentes de la técnica**

A continuación se enumeran las referencias consideradas pertinentes como antecedentes de la materia tratada de la presente descripción.

Selighson U et al. Classification, Clinical Manifestations & Evaluation of Disorders of Hemostasis. In: Williams Hematology, 8ª ed, 2010, pág. 2322-2330.

Abdel-Wahab OI et al. Effect of fresh-frozen plasma transfusion on prothrombin time and bleeding in patients with mild coagulation abnormalities. Transfusion 2006; 46: 1279-1285.

Holland LL et al. Toward rational fresh frozen plasma transfusion: The effect of plasma transfusion on coagulation test results. Am J Clin Pathol 2006; 126: 133-139.

Meheux CJ et al. Efficacy of Intra-articular Platelet-Rich Plasma Injections in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review. Arthroscopy, 2016, 32, 495-505.

Pap G et al. Expression of stromelysin and urokinase type plasminogen activator protein in resection specimens and biopsies at different stages of osteoarthritis of the knee. Pathol. Res. Pract. 2000, 196: 219-226.

Patente estadounidense n.º 7,125,569.

Patente estadounidense n.º 3, 998,946.

Los documentos WO 02/095019 y US 2013/005947 describen una variedad de conjugados o cualquier composición que comprenda dicha variedad de conjugados, en donde cada conjugado comprende una partícula, al menos un enlazador y al menos un aminoácido, derivado del mismo o análogo del mismo, en donde la variedad de conjugados comprende al menos dos conjugados diferentes, y en donde dicho aminoácido, derivado del mismo o análogo del mismo es ácido tranexámico. Cabe destacar que, debido a que la partícula de los conjugados puede ser agarosa o Sepharose, que son ampliamente conocidas por tener diferentes tamaños de partícula, la variedad de conjugados comprende necesariamente al menos dos conjugados diferentes en virtud de los diferentes tamaños de partícula. También describe métodos de uso para deplecionar el fluido corporal de las proteínas fibrinolíticas.

ANGELA BACHI ET AL: ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 80, n.º 10, 1 de mayo de 2008, páginas 3557-3565, describe conjugados que comprenden una partícula, al menos un enlazador y al menos un aminoácido, derivado del mismo o análogo del mismo.

El documento US9138529 B2 describe un método para deplecionar de la sangre materiales no deseados (cantidades excesivas de calcio) que provocan la coagulación de la sangre (p. ej., como consecuencia de un trastorno hemostático) y retornar la sangre al sujeto.

GREGORI LUISA ET AL: TRANSFUSION, AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS, BETHESDA, MD, US, vol. 46, n.º 7, 1 de julio de 2006 (2006-07-01), páginas 1152-1161, describe que las sucesivas depleciones mediante columnas enlazadas en serie dan como resultado una depleción mejorada de la proteína en cuestión.

El reconocimiento de las referencias anteriores en la presente descripción no debe inferirse en el sentido de que éstas sean en modo alguno relevantes para la patentabilidad de la materia tratada de la presente descripción.

**Antecedentes de la invención**

La hemostasia normal es un sistema que mantiene un equilibrio muy delicado. Cuando funciona correctamente, la sangre se mantiene en un estado fluido en el sistema vascular, aunque se coagula rápidamente cuando existe la necesidad de sellar una herida. En la década de 1960, dos grupos propusieron un modelo de formación de coágulos que incluía una secuencia de pasos en los que, al activar un coagulante (coagulación), se activaba otro, dando lugar

finalmente a la formación de un coágulo. Cuando estos factores de coagulación, por activación secuencial, provocan la formación del coágulo, el sistema homólogo, denominado sistema fibrinolítico, se activa adicionalmente para convertirse en la causa de disolución (lisis) del coágulo. Este sistema fibrinolítico está compuesto por proteínas anticoagulantes (activador del plasminógeno, plasminógeno y plasmina), que tras su activación secuencial provocan la lisis del coágulo (Selighson U et al.).

El fallo de la función hemostática debido a una deficiencia en los factores de coagulación provoca una alteración (o ausencia) en la formación del coágulo. Del mismo modo, una actividad fibrinolítica excesiva provoca una disolución rápida e injustificada del coágulo formado. Por otro lado, la sobreestimulación de la cascada de la coagulación o la inhibición del sistema fibrinolítico podría provocar la formación de coágulos patológicos. Por lo tanto, el resultado del fallo de cada uno de estos sistemas podría conllevar una hemorragia o un aumento de la tendencia a la coagulación.

La terapia sustitutiva es eficaz en el tratamiento de los trastornos hemorrágicos, sin embargo, este tratamiento puede no ser suficiente. El plasma fresco congelado (PFC) se transfunde frecuentemente a pacientes con hemorragias o con prolongación de las pruebas de coagulación bajo el supuesto de que mejorará la hemostasia y corregirá y/o evitará las hemorragias. El efecto del PFC sobre parámetros de coagulación, como el tiempo de protrombina (TP) y el índice internacional normalizado (INR), se examinó en una auditoría prospectiva llevada a cabo en el Hospital General de Massachusetts (Abdel-Wahab OI et al.). Los datos mostraron que la transfusión de PFC en este contexto no consiguió corregir el TP en el 99 % de los pacientes y sólo en el 15 % de los pacientes el INR se corrigió al menos a la mitad de lo normal. De manera similar, Holland et al. informó que el PFC no era capaz de modificar el INR con el paso del tiempo. Su hipótesis es que la incapacidad del PFC para corregir el INR se debe a la dilución de los factores de coagulación presentes en el PFC infundido por el plasma del receptor. El PFC contiene todos los componentes (proteínas) de los sistemas de coagulación y fibrinolítico, por lo tanto en teoría es adecuado para el tratamiento de hemorragias en pacientes con deficiencias hereditarias o adquiridas de factores de coagulación. Además, se asume que este producto previene las hemorragias en sujetos con coagulopatía antes, durante y después de los procedimientos quirúrgicos. Sin embargo, debido a que estos productos derivados del plasma contienen, además de factores de coagulación, proteínas fibrinolíticas, tienen el potencial de inducir una lisis no deseada (disolución) del coágulo hemostático formado durante y después de la sustitución de los factores de coagulación del producto.

Por tanto, parece que hasta el momento sólo existen soluciones limitadas para el tratamiento de las hemorragias excesivas. Más de 192.000 pacientes fallecen cada año en los EE.UU. debido a pérdidas de sangre asociadas a traumatismos (según el Instituto Nacional de Traumatología). La pérdida masiva de sangre va aparejada a procedimientos como la cirugía traumatológica, el parto, la coagulación intravascular diseminada (CID), la hemorragia gastrointestinal, etc. Todos estos casos requieren una transfusión eficiente de plasma para detener la hemorragia. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la transfusión de plasma no consigue detener las hemorragias masivas, mientras que otros tratamientos muestran una eficacia reducida y un mayor riesgo de mortalidad. La mayoría de las opciones terapéuticas se centran en el fortalecimiento de la coagulación; sin embargo, estos tratamientos de hemorragias masivas ofrecen resultados insuficientes y, en algunos casos el fallecimiento del paciente. En cambio, existen diferentes tratamientos para la hiperfibrinólisis que también contribuyen a la aparición de hemorragias masivas. La hiperfibrinólisis aparece cuando la actividad fibrinolítica es potencialmente más rápida que la formación de fibrina, de modo que la integridad del coágulo se ve comprometida. En la actualidad, el 57 % de los pacientes de traumatología y el 60 % de los pacientes cirróticos presentan hiperfibrinólisis, por lo tanto el aumento de la coagulación es negativo para estos pacientes que no cuentan con tratamiento alternativos. La materia tratada de la presente descripción fue el desarrollo de un dispositivo extracorpóreo innovador que extrae y elimina de manera eficaz y específica las proteínas plasmáticas responsables de la hiperfibrinólisis. Utilizando el dispositivo médico del objeto en la presente descripción, el profesional médico puede mejorar el plasma transfundido y transformar la hemostasia de la hiperfibrinólisis en coagulación, evitando de este modo las hemorragias masivas.

La patente estadounidense n.º 3, 998.946 describe métodos para tratar el plasma sanguíneo o productos derivados con sílice coloidal pirógena para eliminar el fibrinógeno sin polimerización a fibrina, plasminógeno y plasmina y otros compuestos, aunque conservando el factor de coagulación II. Al carecer de fibrinógeno, el producto resultante no es capaz de favorecer la formación de coágulos y, por tanto, no puede utilizarse para el tratamiento de hemorragias y trastornos hemostáticos.

La patente estadounidense n.º 7, 125, 569, y sus correspondientes solicitudes y patentes describen métodos concretos que utilizan una resina muy concreta para la eliminación únicamente de plasmina(ógeno) de mezcla/s de proteínas. Los productos resultantes se produjeron a fin de preparar fibrinógeno libre de plasmina(ógeno) para su uso como pegamento biológico. Sin embargo, las mezclas resultantes siguen conteniendo activador tisular del plasminógeno (tPA) y, como tales, presentan una clara actividad fibrinolítica. Más concretamente, el tPA presente en el producto activó el plasminógeno en la zona tratada, provocando de esta forma la destrucción de la red de fibrina recién formada. El plasminógeno suele estar presente en la sangre en concentraciones elevadas (alrededor de 2 µM), por lo que cualquier pérdida de sangre durante cualquier intervención quirúrgica aumenta la concentración de plasminógeno en el área extravascular. Además, en caso de que dicho pegamento se utilice en los vasos sanguíneos lesionados durante la intervención quirúrgica, el tPA presente en el pegamento biológico puede entrar en contacto con el plasminógeno presente en la sangre y, de esta forma, activar la cascada fibrinolítica. Por lo tanto, los productos libres de plasminógeno descritos en la patente estadounidense n.º 7, 125, 569 sólo pueden utilizarse para aplicaciones tópicas

como pegamento biológico, y son irrelevantes para un uso sistémico en transfusión o para tratar hemorragias asociadas a terapia fibrinolítica o trombolítica.

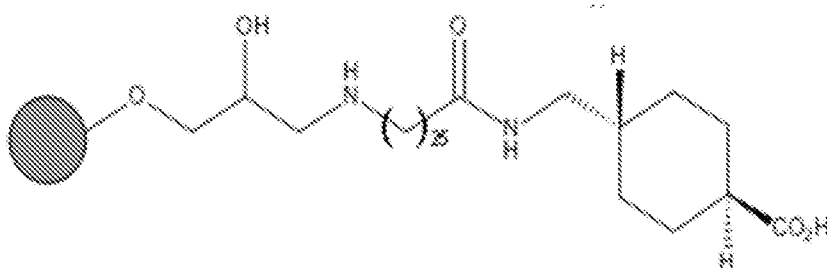
5 Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de un dispositivo y conjugados efectivos para deplecionar las proteínas fibrinolíticas de los líquidos corporales de los mamíferos, específicamente, de la sangre, el plasma y cualquier producto de este tipo.


### Resumen de la invención

10 La invención se define en las reivindicaciones.

### Aspectos de la descripción

15 Según el primer aspecto, la presente descripción proporciona una variedad de conjugados o cualquier composición que comprenda la variedad de conjugados, en donde cada conjugado comprende una partícula, al menos un enlace y al menos un ácido 4-(aminometil)-ciclo-hexano-carboxílico (ácido tranexámico) en donde el conjugado es:



20 en donde  representa una partícula y en donde la variedad de conjugados comprende al menos dos conjugados diferentes.

Es preferible que las partículas y/o los enlazadores de los al menos dos conjugados diferentes sean diferentes, y opcionalmente al menos uno de

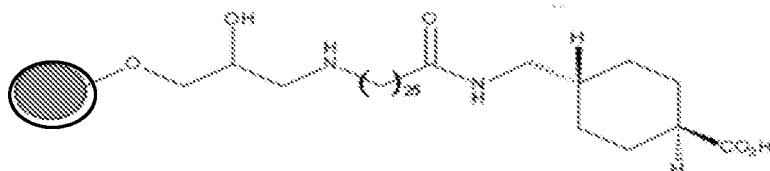
25 (a) en donde las partículas tienen un tamaño medio de partícula de entre aproximadamente 90  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 150  $\mu\text{m}$ ;

30 (b) en donde la relación entre la partícula y la cobertura de enlace de la superficie de la partícula es de aproximadamente 9 a 23  $\mu\text{mol}$  perlas /ml de medio escurrido;

35 (c) en donde la partícula es al menos una de perla de polisacárido, perlas de vidrio, perla de algodón, perla de plástico, perla de agarosa, perlas de sepharose, perla de nailon, perla de látex, perla magnética, perla paramagnética, perla super paramagnética, perla de almidón y similares, perla de silicio, perla de PTFE, perla de poliestireno, perla de arseniuro de galio, perla de oro o perla de plata, y

(f) en donde la partícula es una perla de agarosa o una perla de sepharose.

40 En otro aspecto, la materia tratada de la presente descripción comprende una partícula, al menos un enlace y al menos un aminoácido, derivado del mismo o análogo del mismo, dicho conjugado es



45 en donde  representa una partícula, opcionalmente

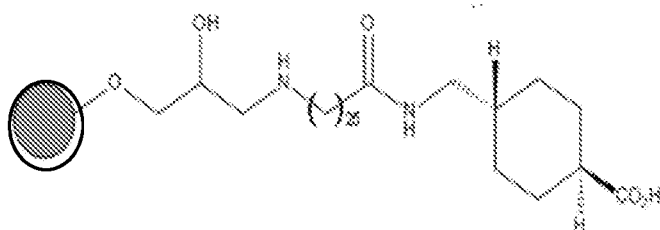
en donde la partícula es una perla de agarosa o una perla de sepharose y tiene un tamaño medio de partícula de entre aproximadamente 90  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 150  $\mu\text{m}$ .

En aun otro aspecto, la materia tratada de la presente descripción proporciona un dispositivo para deplecionar al menos una proteína fibrinolítica del(los) fluido(s) corporal(es) de mamífero, que comprende:

- una carcasa que tiene con al menos un puerto de entrada de fluido y al menos un puerto de salida de fluido;
- la carcasa que incluye al menos una cámara, dicha al menos una cámara define un volumen de control en comunicación fluida con al menos un puerto de entrada de fluido y el al menos un puerto de salida de fluido;
- dicho volumen de control aloja al menos uno de una variedad de conjugados o una composición que comprende la variedad de conjugados tal como se define en la materia tratada de la presente descripción y un conjugado tal como se define en la presente memoria anterior.

Según otro aspecto de la materia tratada en la presente descripción, se proporciona un dispositivo para deplecionar al menos una proteína fibrinolítica del (de los) fluido(s) corporal(es) de mamífero, que comprende:

- una carcasa que tiene al menos un puerto de entrada de fluido y al menos un puerto de salida de fluido;
- la carcasa que incluye al menos una cámara, dicha al menos una cámara define un volumen de control en comunicación fluida con al menos un puerto de entrada de fluido y el al menos un puerto de salida de fluido;
- dicho volumen de control aloja una variedad de grupos de partículas, incluyendo al menos un primer grupo de primeras partículas y un segundo grupo de segundas partículas;
- en donde dichas primeras partículas son dimensionalmente diferentes de dichas segundas partículas;
- en donde al menos una de dichas primeras partículas y dichas segundas partículas son partículas conjugadas, estando conjugadas con al menos uno del ácido 4-(aminometil)-ciclo-hexano-carboxílico (ácido tranexámico), y en donde dicho ácido (ácido tranexámico), y en donde dicho conjugado comprende al menos un enlace, en donde dicho conjugado es



en donde  representa una partícula.

En un caso descrito, que no forma parte de la invención, dichas primeras partículas y dichas segundas partículas son partículas conjugadas, estando cada partícula conjugada con aminoácido, un derivado del mismo o un análogo del mismo, en donde cada aminoácido o análogo del mismo es al menos uno de ácido 4-(aminometil)-ciclohexano-carboxílico (ácido tranexámico), ácido  $\epsilon$ -amino caproico y lisina, y dicho aminoácido derivado del mismo es ácido ciclohexanocarboxílico, ácido 4-metil-ciclohexanocarboxílico o cualquier combinación de los mismos.

Adicionalmente, y/o como alternativa, por ejemplo, dichas primeras partículas y dichas segundas partículas son partículas conjugadas con TXA, específicamente, partículas conjugadas con ácido ciclohexanocarboxílico, partículas conjugadas con ácido 4-metil-ciclohexanocarboxílico o cualquier combinación de los mismos. Aún adicionalmente, por ejemplo, dichas primeras partículas y dichas segundas partículas son partículas conjugadas de TXA.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término *partículas conjugadas* se refiere a partículas conjugadas con un aminoácido, un derivado del mismo o un análogo del mismo, a través de un enlace.

Adicionalmente, o alternativamente, por ejemplo, dichas partículas conjugadas se definen por la variedad de conjugados o composiciones definidas anteriormente.

Adicionalmente, o alternativamente, por ejemplo, dicha carcasa comprende un eje longitudinal, y comprende una parte del cuerpo principal, y un par de tapones de extremo, incluyendo un tapón de extremo de entrada que tiene al menos dicho puerto de entrada de fluido, y un tapón de extremo de salida que tiene al menos dicho puerto de salida de fluido.

Por ejemplo, dicho volumen de control se define por los respectivos miembros de barrera proporcionados en extremos longitudinales opuestos a la parte del cuerpo principal.

5 Por ejemplo, dichos miembros de barrera están configurados para impedir que dichas partículas salgan de dicho volumen de control.

10 Por ejemplo, dichos miembros de barrera están configurados para permitir simultáneamente el paso del (de los) fluido(s) corporal(es) de mamífero a través del volumen de control, o, dichos miembros de barrera están configurados para permitir simultáneamente el paso del (de los) fluido(s) corporal(es) de mamífero a través del volumen de control, en donde en el uso del dispositivo, el(los) fluido(s) corporal(es) de mamífero entran en el volumen de control a través del tapón de entrada y el puerto de entrada de fluido, y después de salir del volumen de control, fluyen a través del tapón de salida y el puerto de salida de fluido.

15 Adicionalmente, o alternativamente, por ejemplo, dichos miembros de barrera comprenden cada uno una variedad de aberturas para permitir el flujo del (de los) fluido(s) corporal(es) de mamífero a través de las aberturas, siendo las aberturas de un tamaño menor que dichas partículas.

20 En un aspecto adicional, la materia tratada en la presente descripción se refiere a una batería para uso en la depleción de al menos una proteína fibrinolítica a partir del (de los) fluido(s) corporal(es) de mamífero, que comprende una variedad de dispositivos, en donde cada dispositivo es como se define en la materia tratada en la presente descripción. Los dispositivos de la variedad de dispositivos están interconectados de forma que proporcionan comunicación fluida entre los respectivos volúmenes de control de dicha variedad de dispositivos, en donde

25 (a) al menos una parte de dicha variedad de dispositivos están interconectados en serie, en donde para cada par de dichos dispositivos interconectados en serie, el respectivo puerto de entrada de fluido de uno de dichos dispositivos de dicho par está conectado y en comunicación fluida con dicha salida de fluido respectiva puerto de otro de dichos dispositivos de dicho par;

30 (b) al menos una parte de dicha variedad de dispositivos están interconectados en paralelo, en donde para dichos dispositivos interconectados en paralelo, dichos puertos de entrada de fluido respectivos están interconectados y en comunicación fluida entre sí, y en donde dichos puertos de salida de fluido respectivos están interconectados y en comunicación fluida entre sí; o

35 (c) al menos una parte de dicha variedad de dispositivos están interconectados en paralelo, en donde para dichos dispositivos interconectados en paralelo, dichos puertos de entrada de fluido respectivos están conectados y en comunicación fluida con al menos un reservorio de plasma donante, y en donde dichos puertos de salida de fluido respectivos están conectados y en comunicación fluida con al menos un reservorio de plasma receptor.

40 Otro aspecto de la materia tratada en la presente descripción se refiere a un kit para deplecionar al menos una proteína fibrinolítica del (de los) fluido(s) corporal(es) de mamífero, que comprende:

- al menos un dispositivo según se define en la materia tratada en la presente descripción,
- un reservorio salino en comunicación fluida selectiva con dicho al menos un puerto de entrada;
- un reservorio de plasma receptor y un reservorio de residuos de lavado, en donde dicho reservorio de plasma receptor y dicho reservorio de residuos de lavado están en comunicación fluida selectiva y no concurrente con dicho al menos un puerto de salida de fluido.

50 En aun otro aspecto, la materia tratada en la presente descripción proporciona un sistema para deplecionar al menos una proteína fibrinolítica del (de los) fluido(s) corporal(es) de mamífero, que comprende:

- al menos un dispositivo según se define en la materia tratada en la presente descripción,
- un reservorio salino y un reservorio donante, en donde dicho reservorio salino y dicho reservorio donante están en comunicación selectiva y no concurrente de fluidos con dicho al menos un puerto de entrada de fluido;

60 un reservorio de plasma receptor y un reservorio de residuos de lavado, en donde dicho reservorio de plasma receptor y dicho reservorio de residuos de lavado están en comunicación fluida selectiva y no concurrente con dicho al menos un puerto de salida de fluido.

Por lo tanto, en aún otro aspecto, la materia tratada en la presente descripción se refiere a un método ex vivo o in vitro para deplecionar al menos una proteína fibrinolítica de fluidos corporales de mamíferos o cualquier producto de los mismos. Más concretamente, el método comprende los siguientes pasos de:

65

(i) someter dicho fluido(s) corporal(es) a un procedimiento concreto de depleción por afinidad para la al menos una(s) proteína(s) o fibrinolítica(s); y

(ii) recuperar el al menos un fluido corporal deplecionado en proteínas fibrinolíticas obtenido en la etapa (i).

Cabe destacar que el procedimiento de depleción por afinidad puede comprender el contacto del fluido corporal con una cantidad eficaz de una variedad de conjugados o de al menos una composición que comprenda la variedad de conjugados. Como alternativa, el fluido corporal puede aplicarse sobre un dispositivo, batería, kit o sistema que comprenda la variedad de conjugados o cualquier composición de los mismos. En algunas realizaciones, cada conjugado comprende al menos una partícula, al menos un enlace y al menos un ácido 4-(aminometil)-ciclo-hexano-carboxílico (ácido tranexámico). En algunas realizaciones específicas, la variedad de conjugados comprende al menos dos conjugados diferentes. Dicha variedad de conjugados o composición es, dichos conjugados, dicho dispositivo, dicha batería, dicho kit y dicho sistema definidos anteriormente en la presente memoria.

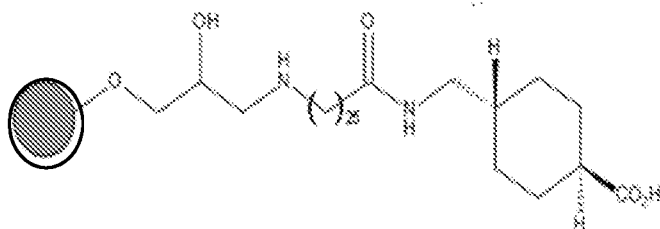
En otro aspecto, la materia tratada en la presente descripción proporciona una cantidad eficaz de una variedad de conjugados o una composición de los mismos comprendida dentro de un dispositivo extracorpóreo, o dentro de un dispositivo, batería, kit o sistema conectado a dicho dispositivo extracorpóreo, para su uso en un método para deplecionar al menos una proteína fibrinolítica del (de los) fluido(s) corporal(es) de un sujeto que lo necesite mediante un procedimiento extracorpóreo, comprendiendo el método los pasos de:

(i) transferir fluidos corporales de dicho sujeto a un aparato extracorpóreo;

(ii) someter dicho fluido corporal a un procedimiento de depleción por afinidad concreto para al menos una(s) proteína(s) fibrinolítica(s), en donde dicha depleción se realiza antes, durante o después de que la sangre se transfiera dentro y fuera de dicho aparato, obteniendo de esta forma un fluido corporal extracorpóreo deplecionado de dicho sujeto en al menos una proteína fibrinolítica; y

(iii) reintroducir o devolver dicho fluido corporal obtenido en el paso (ii) a dicho sujeto;

en donde dicho procedimiento de depleción por afinidad comprende poner en contacto dicho fluido corporal con dicha cantidad eficaz de una variedad de conjugados o una composición de los mismos comprendida dentro de dicho dispositivo extracorpóreo, o dentro de un dispositivo, batería, kit o sistema conectado a dicho dispositivo extracorpóreo, en donde cada conjugado comprende una partícula, al menos un enlace y al menos un aminoácido, derivado del mismo o análogo del mismo, en donde dicho conjugado es:



en donde  representa una partícula;

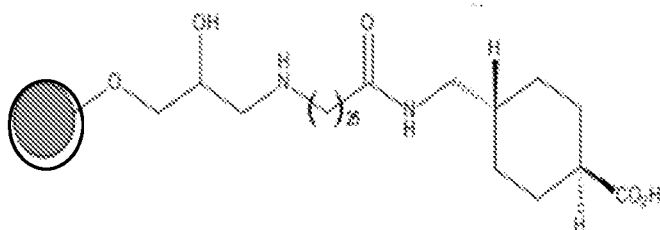
en donde dicha variedad de conjugados incluye al menos dos conjugados diferentes, y en donde dicho aminoácido, derivado del mismo o análogo del mismo es ácido 4-(aminometil)-ciclo-hexano-carboxílico (ácido tranexámico), en donde dicho fluido corporal es al menos uno de sangre total y plasma; opcionalmente, en donde dicha variedad de conjugados o composición, dichos conjugados, dicho dispositivo, dicha batería, dicho kit y dicho sistema son como los definidos anteriormente.

En aun otro aspecto, la materia tratada en la presente descripción proporciona un método para el tratamiento, prevención, profilaxis, mejora, inhibición de hemorragias, trastornos hemostáticos y cualquier hemorragia o condición patológica asociada a los mismos en un sujeto que lo necesite, en donde dicho producto se prepara mediante un método que comprende los siguientes pasos:

(i) someter el fluido(s) corporal(es) del sujeto mamífero a un procedimiento concreto de depleción por afinidad para al menos una(s) proteína(s) o fibrinolítica(s); y

(ii) recuperar el al menos un fluido corporal deplecionado en proteínas fibrinolíticas obtenido en la etapa (i).

en donde dicho procedimiento de depleción por afinidad comprende poner en contacto dicho fluido corporal con una cantidad eficaz de una variedad de conjugados o con una composición que comprende dicha variedad de conjugados, o aplicar dicho fluido corporal sobre un dispositivo, batería, kit o sistema que comprende dicha variedad de conjugados o composición, en donde cada conjugado comprende una partícula, al menos un enlace y al menos un aminoácido, derivado del mismo o análogo del mismo, en donde dicho conjugado es:



en donde  representa una partícula;

en donde dicha variedad de conjugados incluye al menos dos conjugados diferentes, y en donde dicho aminoácido, derivado del mismo o análogo del mismo es ácido 4-(aminometil)-ciclo-hexano-carboxílico (ácido tranexámico).

Se prefiere que la cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un producto sanguíneo y/o derivado de la sangre que posea una actividad fibrinolítica reducida para su uso en donde dicho trastorno hemostático sea un trastorno hemorrágico hereditario o adquirido, opcionalmente en donde:

(i) dicho trastorno hemostático hereditario es un trastorno resultante de al menos una deficiencia de al menos un factor de coagulación y una tendencia indefinida a la hemorragia, opcionalmente, en donde dicha deficiencia de al menos un factor de coagulación es una deficiencia de al menos uno de los factores XI, X, V, VII, II (protrombina) y I (fibrinógeno); o bien

(ii) dicho trastorno hemostático adquirido es al menos uno de los siguientes: hemorragia inducida por cirugía, hemorragia inducida por traumatismo, hemorragia gastrointestinal aguda, hemorragia asociada a quemaduras, accidente cerebrovascular hemorrágico, lesión pulmonar debida a enfisema y EPOC, hemorragia asociada al parto y hemorragias resultantes de la terapia fibrinolítica o trombolítica.

### Breve descripción de los dibujos

Para una mejor comprensión de la materia tratada que se describe en la presente memoria y para ejemplificar cómo puede llevarse a cabo en la práctica, se describirán las realizaciones a modo de ejemplo no limitativo únicamente, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

#### FIGURA 1: Conjugado 2

Representación esquemática de la reacción química necesaria para la preparación del Conjugado 2.

#### FIGURA 2: Curva patrón de plasminógeno (PLG)

Gráfico que representa una curva patrón para el cálculo de la concentración de PLG.

#### FIGURA 3: Crioprecipitado deplecionado en plasminógeno

Gráfico que representa la concentración de plasminógeno en el crioprecipitado no tratado frente al crioprecipitado filtrado con ClearPlasma.

#### FIGURA 4: Filtración de plasma mediante ClearPlasma con conjugado 1 ("TXA conjugado con perlas de agarosa al 4 %")

Diagrama esquemático que demuestra el flujo sanguíneo y la separación del plasma y los glóbulos rojos. Además, el esquema demuestra el uso de ClearPlasma para generar plasma deplecionado en plasminógeno con niveles reducidos de tPA.

#### FIGURA 5: El uso de ClearPlasma reduce la pérdida de sangre en lesiones hepáticas en cerdos



Histograma que muestra la cantidad de sangre perdida durante los 30 minutos posteriores a la laceración hepática. Las estadísticas se calcularon mediante la prueba t de Student (distribución de dos colas con igual varianza). Los datos se expresan como Media  $\pm$  desviación estándar. Los valores de  $P < 0,05$  se consideraron significativos.

**5 FIGURA 6A-6L: ClearPlasma con conjugado 1 (“TXA conjugado con perlas de agarosa superflow al 4 %”) suprime la actividad fibrinolítica.**

Los cerdos se sometieron a una plasmáfesis, el plasma se trató con ClearPlasma o no se trató. La coagulación y la fibrinólisis de la sangre total de los cerdos resultantes se evaluaron mediante TEG.

10

**Figura 6A:** Coagulación de la sangre obtenida de los cerdos de control antes de la anestesia.

**Figura 6B:** Sangre de los cerdos de control con 0,083  $\mu$ M Wt-tPA antes de la anestesia.

15 **Figura 6C:** Sangre de los cerdos de control tras la anestesia.

**Figura 6D:** Sangre de los cerdos de control con 0,083  $\mu$ M Wt-tPA tras la anestesia.

20 **Figura 6E:** Sangre de los cerdos de control antes de la plasmáfesis y la depleción del plasminógeno.

**Figura 6F:** Sangre de los cerdos antes de la plasmáfesis y la depleción del plasminógeno con 0,083  $\mu$ M Wt-tPA

**Figura 6G:** Sangre de cerdos antes de la plasmáfesis.

25 **Figura 6H:** Sangre de cerdos antes de la plasmáfesis con 0,083  $\mu$ M Wt-tPA

**Figura 6I:** Sangre de los cerdos de control tras la plasmáfesis y la depleción del plasminógeno.

30 **Figura 6J:** Sangre de los cerdos de control tras la plasmáfesis y la depleción del plasminógeno con 0,083  $\mu$ M Wt-tPA

**Figura 6K:** Sangre de los cerdos tras la plasmáfesis de control.

35 **Figura 6L:** Sangre de los cerdos tras la plasmáfesis con 0,083  $\mu$ M Wt-tPA

**FIGURA 7A-7F: Análisis TEG - ClearPlasma suprime la actividad fibrinolítica del plasma humano**

La coagulación y la fibrinólisis del flujo de plasma fresco congelado y fluido a través de ClearPlasma (denominado PEP) se compararon con la coagulación y la fibrinólisis del plasma no tratado (denominado PFC) mediante tromboelastografía (TEG).

40

**Figura 7A:** El PFC demuestra la formación de coágulos sin tratamiento adicional.

**Figura 7B:** La adición de activador tisular del plasminógeno (tPA-1,85nM) provoca la descomposición del coágulo.

45

**Figura 7C:** Superposición de las Figura 7A y 7B.

**Figura 7D:** El plasma deplecionado en plasminógeno (PEP) demuestra la formación de coágulos sin tratamiento adicional.

50

**Figura 7E:** La adición de activador tisular del plasminógeno (tPA-1,85nM) no provoca la descomposición del coágulo.

**Figura 7F:** Superposición de las Figura 7D y 7E.

55 Los datos muestran un experimento representativo (a partir de tres experimentos independientes).

**FIGURA 8: Tiempo de hemorragia tras el corte de la cola en ratones**

El gráfico muestra el tiempo de hemorragia de diferentes ratones (numerados del 1 al 8) tras el corte de la cola tratados con ClearPlasma, plasma o solución salina.

60

**FIGURA 9: Resultados del tamaño del pellet de cada ratón (a las 24 horas)**

El gráfico muestra el tamaño del pellet de diferentes ratones (numerados del 1 al 8) tras el corte de la cola tratados con ClearPlasma, plasma o solución salina.

65

**FIGURA 10: Prueba de hemorragia tras el corte de la cola en ratones**

Resultados del tamaño del pellet: el pellet de células sanguíneas de la prueba de hemorragia se centrifugó y se aspiró el sobrenadante. A continuación, se midió el tamaño del pellet con una regla. El análisis estadístico de la medición del tamaño del pellet se realizó mediante un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido de las pruebas post hoc LSD/SCHLIF (p<0,05 se consideró significativo).

**FIGURA 11A-11B: ClearPlasma reduce los niveles de plasminógeno y proteína tPA en cerdos**

Las hembras de cerdo se sometieron a plasmáfesis con el sistema Haemonetics mcs+ bajo anestesia. Ambos procedimientos se llevaron a cabo de forma similar (cantidad de sangre filtrada, anticoagulante tratado, tiempo y cantidad de plasma recogido).

**Figura 11A:** Gráfico que representa la depleción de plasminógeno en muestras de plasma de cerdos filtradas con ClearPlasma (denominadas PEP) en comparación con el plasma de control sin filtrar.

**Figura 11B:** Gráfico que representa la depleción de tPA en muestras de plasma de cerdos filtradas con ClearPlasma (denominadas PEP) en comparación con el plasma de control sin filtrar.

Resultados representativos de cuatro experimentos independientes.

**FIGURA 12 El dispositivo**

muestra en sección transversal lateral un dispositivo según un primer ejemplo de la materia tratada en la presente descripción.

**Figura 12A:** muestra en vista isométrica explosionada el dispositivo según una variación alternativa del ejemplo de la Figura 12.

**Figura 12B:** muestra en vista lateral de detalle transversal una parte del dispositivo según una variación alternativa del ejemplo de la Figura 12.

**FIGURA 13A-13D: El dispositivo**

**Figura 13A:** muestra en vista superior una parte del cuerpo principal del dispositivo según el ejemplo de la Figura 12.

**Figura 13B:** muestra en vista lateral la parte del cuerpo principal del dispositivo según el ejemplo de la Figura 13A.

**Figura 13C:** muestra en vista lateral transversal la parte del cuerpo principal del dispositivo según el ejemplo de la Figura 13B, tomada a lo largo de A-A.

**Figura 13D:** muestra en vista lateral de detalle transversal una parte del dispositivo según el ejemplo de la Figura 13C en "G".

**FIGURA 14A-14D: El tapón del extremo del dispositivo**

**Figura 14A:** muestra en vista superior un tapón del extremo del dispositivo según el ejemplo de la Figura 12.

**Figura 14B:** muestra en vista lateral el tapón del extremo del dispositivo según el ejemplo de la Figura 14A.

**Figura 14C:** muestra en vista lateral transversal el tapón del extremo del dispositivo según el ejemplo de la Figura 14B, tomada a lo largo de A-A.

**Figura 14D:** muestra en vista lateral de detalle transversal una parte del dispositivo según el ejemplo de la Figura 14C en "G".

**FIGURA 15 El sistema**

Ilustra de forma esquemática un sistema según un ejemplo de la materia tratada en la presente descripción, con el sistema en configuración de lavado.

**FIGURA 16 El sistema**

Ilustra de forma esquemática el sistema según el ejemplo de la Figura 15, con el sistema en configuración de tratamiento.

**FIGURA 17 El kit**

Ilustra de forma esquemática un kit correspondiente al sistema según el ejemplo de la Figura 15.

**5 FIGURA 18 El sistema**

Ilustra de forma esquemática un sistema según otro ejemplo de la materia tratada en la presente descripción, el sistema que incluye una batería de dispositivos.

**10 FIGURA 19 El sistema**

Ilustra de forma esquemática un sistema según otro ejemplo de la materia tratada en la presente descripción, el sistema que incluye una batería de dispositivos.

**15 Descripción detallada de la invención y aspectos adicionales de la descripción**

En la presente descripción, los aspectos y las realizaciones se presentan como aspectos y realizaciones de la invención únicamente en la medida en que estén comprendidos en el ámbito de las reivindicaciones. El resto de las materias en términos de aspectos y realizaciones, que no entren dentro del ámbito de las reivindicaciones, pertenecen a otros aspectos de la descripción, que no forman parte de la invención.

La presente descripción proporciona, según su aspecto más amplio, una variedad de conjugados o una composición que comprende la variedad de conjugados, cada conjugado cuenta con una Fórmula general (I)

**25 X-Y-Z (I)**

en donde:

**X** es una fracción de soporte sólido, por ejemplo una partícula;

**Y** es una fracción químicamente reactiva que enlaza las fracciones X y Z;

**Z** es una fracción que comprende al menos un aminoácido, un derivado del mismo o un análogo del mismo; y

en donde “-” designa una interacción/asociación, por ejemplo un enlace químico que contiene opcionalmente uno o varios átomos intermedios que sirven como espaciadores o como elementos que dirigen la fracción.

El término *aminoácido*, tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un compuesto (p. ej., un compuesto orgánico) que contiene grupos aminos (-NH<sub>2</sub>) y carboxilos y comprende cualquier derivado del mismo o cualquier análogo del mismo, tal como se detalla en la presente memoria. El término “*fracción*” en el contexto de la descripción puede referirse a un átomo, un grupo de átomos y cualquier fragmento funcional de una molécula que tenga la función que se indica en la presente memoria. La fracción también puede adoptar la forma de un elemento físico, como una cápsula, esferas, nanopartículas, liposomas, etc. de al menos un material (es decir, de un solo átomo o de múltiples átomos) que funcione como se indica en la presente memoria.

“*Análogo de aminoácido*” es un compuesto que posee la misma estructura química (también denominado en la presente memoria como análogo estructural) que el aminoácido natural, es decir, un grupo carboxilo y un grupo amino, o un grupo R. Como ejemplos podemos citar la homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metilsulfonio. En aun algunas realizaciones adicionales, el término *análogo de aminoácido* también incluye análogos funcionales, en concreto, moléculas que desempeñan la misma función biológica. Un ejemplo no limitativo de dicho análogo funcional de un aminoácido, por ejemplo, la lisina, es el ácido tranexámico (TXA) que sirve como análogo funcional de la lisina, actuando de esta forma como agente antifibrinolítico mediante la unión reversible de cuatro a cinco sitios receptores de lisina en el plasminógeno.

Un “*derivado de aminoácido*”, tal y como se utiliza en la presente memoria, es un compuesto que comprende al menos un fragmento (parte, porción) de un aminoácido o cualquier análogo (estructural y/o funcional) del mismo, por ejemplo, que carece al menos del grupo amino. En un ejemplo específico, el derivado de aminoácido comprende un fragmento de ácido ciclohexanocarboxílico de un aminoácido o análogo del mismo, es decir, carente del grupo amino.

El aminoácido, derivado del mismo o análogo del mismo puede ser, según algunas realizaciones, al menos uno de ácido 4-(aminometil)-ciclohexano-carboxílico (ácido tranexámico), ácido  $\epsilon$ -amino caproico, lisina, ácido ciclohexanocarboxílico, ácido 4-metil-ciclohexanocarboxílico o cualquier combinación de los mismos.

Según al primer aspecto, la presente descripción proporciona una variedad de conjugados o una composición que comprenda la variedad de conjugados, cada conjugado comprende una partícula, al menos un enlace y al menos un ácido, un derivado del mismo o un análogo del mismo. En algunas realizaciones, la variedad de conjugados comprende

al menos dos conjugados diferentes. Además, en algunas realizaciones, el aminoácido, un derivado del mismo o un análogo del mismo puede ser al menos uno de ácido 4-(aminometil)-ciclohexano-carboxílico (ácido tranexámico), ácido  $\epsilon$ -amino caproico, lisina, ácido ciclohexanocarboxílico y ácido 4-metil-ciclohexanocarboxílico o cualquier combinación de los mismos. Además, en algunas realizaciones, el aminoácido, un derivado del mismo o un análogo del mismo puede ser al menos uno de ácido 4-(aminometil)-ciclohexano-carboxílico (ácido tranexámico), ácido  $\epsilon$ -amino caproico y lisina, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el aminoácido, un derivado del mismo o un análogo del mismo puede ser ácido tranexámico (TXA).

Un *conjugado*, tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un compuesto construido a partir de varios elementos (componentes), incluyendo al menos una partícula, al menos un enlace y al menos un aminoácido, un derivado del mismo o un análogo del mismo, todos ellos asociados al mismo. Cabe señalar que, si bien la solicitud se refiere a “al menos una partícula”, cualquier soporte sólido aplicable a la variedad de conjugados reivindicada queda englobado en la presente memoria.

Una cualquiera de los conjugados de la materia tratada en la presente descripción o cualquiera de sus composiciones también pueden atribuirse a la composición de la materia en términos más generales, una “composición de materia” al igual que un “conjugado”, ambos utilizados de forma intercambiable, se refiere a la asociación de al menos una partícula, al menos un enlace y al menos un aminoácido, derivado del mismo o análogo del mismo, que como se detalla a continuación produce propiedades que pueden atribuirse a la composición de materia (o conjugado) como un todo y no a una cualquiera de los componentes del conjugado en su estado separado.

En algunas realizaciones, cualquiera de los conjugados de la materia tratada en la presente descripción comprende una asociación de la al menos una partícula con la al menos una fracción químicamente reactiva que es un enlace y la asociación del al menos un enlace con al menos un aminoácido, derivado del mismo o un análogo del mismo de tal forma que el enlace se coloca entre la partícula y el aminoácido, derivado del mismo o un análogo del mismo y, por lo tanto, se asocia en un extremo (en un brazo) a la partícula y en el otro extremo (en un segundo brazo distinto) al aminoácido, derivado del mismo o un análogo del mismo.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término “*asociación*” o cualquier variación lingüística del mismo se refiere a la fuerza química o física que mantiene unidas dos entidades (p. ej., la partícula y el enlace). Dicha fuerza puede ser cualquier tipo de interacción de unión química o física conocida por un experto en la técnica.

Los ejemplos no limitativos de dichas interacciones de asociación son el enlace covalente, el enlace iónico, el enlace de coordinación, la complejación, el enlace de hidrógeno, el enlace de van der Waals, las interacciones de hidrofobicidad-hidrofiliidad, etc. De esta forma, la asociación/conjugación del enlace con la al menos una partícula y del enlace con el aminoácido puede realizarse mediante cualquier enlace químico, incluyendo los enlaces covalentes, interacción electrostática, interacción ácido-base, interacción de van der Waals, etc. Como se aprecia, la asociación de la partícula y el enlace y la asociación del enlace con el aminoácido, un derivado del mismo o un análogo del mismo puede ser la misma o puede ser diferente, como se detalla más adelante.

Por ejemplo, y tal como se detalla a continuación, para un derivado de aminoácido que sea ácido ciclohexanocarboxílico o ácido 4-metil-ciclohexanocarboxílico (es decir, que carezca al menos del grupo  $\text{NH}_2$  (grupo amino) de un análogo de aminoácido), el enlace puede comprender un grupo amino (solo o unido a un grupo metileno, es decir, siendo  $-\text{NH}_2$ - $\text{CH}_2$ -, “-” es un enlace covalente). En un ejemplo alternativo, para un aminoácido o análogo del mismo (es decir, que comprende el grupo  $\text{NH}_2$  (grupo amino) de un aminoácido), el enlace puede no comprender un grupo amino (solo o unido a un grupo metileno, es decir, siendo  $-\text{NH}_2$ - $\text{CH}_2$ -, “-” es un enlace covalente).

Como se ha indicado anteriormente, la variedad de conjugados puede proporcionarla la materia tratada en la presente descripción en una composición. La composición tal como se utiliza en la presente memoria comprende una variedad de conjugados que incluyen al menos dos conjugados diferentes. Los conjugados diferentes deben entenderse como diferentes en al menos un parámetro. Más concretamente, diferentes variaciones de conjugados en al menos un parámetro o propiedad de al menos uno de los componentes del conjugado, p. ej., partícula, enlace, aminoácido, un derivado del mismo o un análogo del mismo a veces en al menos dos de los componentes del conjugado y a veces en al menos tres de los componentes del conjugado. De esta forma, los al menos dos conjugados diferentes de la variedad de conjugados o composiciones de los mismos, pueden comprender partículas diferentes y/o enlaces diferentes y/o aminoácidos diferentes, un derivado del mismo o un análogo del mismo. En otras palabras, los conjugados citados en la presente memoria “conjugados diferentes” comprenden los componentes del conjugado, p. ej., partícula, enlace, aminoácido, de forma que al menos uno, al menos dos o los tres componentes no sean idénticos (p. ej., son diferentes).

En algunas realizaciones, los al menos dos conjugados diferentes comprenden partículas diferentes.

En algunas realizaciones, los al menos dos conjugados diferentes comprenden enlaces diferentes.

En algunas realizaciones, los al menos dos conjugados diferentes comprenden diferentes aminoácidos, derivados de los mismos o análogos de los mismos.

En algunas realizaciones, los al menos dos conjugados diferentes comprenden partículas idénticas, enlaces idénticos y aminoácidos diferentes, derivados de los mismos o análogos de los mismos.

- 5 En algunas otras realizaciones, los al menos dos conjugados diferentes comprenden partículas idénticas, enlaces diferentes y aminoácidos idénticos, derivados de los mismos o análogos de los mismos.

En algunas otras realizaciones, los al menos dos conjugados diferentes pueden comprender partículas diferentes, enlaces idénticos y aminoácidos idénticos, derivados de los mismos o análogos de los mismos.

- 10 En algunas realizaciones, los al menos dos conjugados diferentes comprenden partículas diferentes y enlaces diferentes. En algunas realizaciones, los al menos dos conjugados diferentes comprenden partículas diferentes, enlaces diferentes y aminoácidos idénticos, derivados de los mismos o análogos de los mismos.

- 15 En algunas realizaciones, los al menos dos conjugados diferentes comprenden partículas diferentes y diferentes aminoácidos, derivados de los mismos o análogos de los mismos. En algunas realizaciones, los al menos dos conjugados diferentes comprenden partículas diferentes, aminoácidos diferentes, derivados de los mismos o análogos de los mismos, y enlaces idénticos.

- 20 En algunas realizaciones, los al menos dos conjugados diferentes comprenden enlaces diferentes y aminoácidos diferentes, derivados de los mismos o análogos de los mismos. En algunas realizaciones, los al menos dos conjugados diferentes comprenden enlaces diferentes, aminoácidos diferentes, derivados de los mismos o análogos de los mismos, y partículas idénticas.

- 25 En algunas realizaciones, los al menos dos conjugados diferentes comprenden partículas diferentes, enlaces diferentes y aminoácidos diferentes, derivados de los mismos o análogos de los mismos.

El término *enlace diferente* debe entenderse en el sentido de que la diferencia puede estar en las propiedades del enlace, como la fórmula química del enlace.

- 30 Como ya se ha mencionado anteriormente, la variedad de conjugados o cualesquiera composiciones de los mismos según la materia tratada en la presente descripción puede comprender al menos dos conjugados diferentes, al menos tres conjugados diferentes, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos diez conjugados diferentes, al menos 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más conjugados diferentes.

- Además, al hacerse referencia a conjugados diferentes, debe entenderse que la diferencia puede estar en al menos un rasgo (características, parámetros) del conjugado o de cualquier componente del mismo (p. ej., partícula, enlace y aminoácido), por ejemplo, su tamaño, composición química, forma, estructura, densidad, conductividad, solubilidad, material, etc. Por ejemplo, al menos una de las partículas, enlaces o aminoácidos que difieren en al menos uno de los tamaños y/o composiciones diferentes y/o formas diferentes y/o estructura diferente se consideran partículas diferentes.

- 45 Sorprendentemente se constató que una variedad de conjugados que comprenden al menos dos conjugados diferentes o una composición que comprende al menos dos conjugados diferentes tal y como se describe en la presente memoria es eficaz en la depleción de proteínas fibrinolíticas como el plasminógeno, la plasmina y/o el tPA de fluidos corporales, específicamente, sangre, plasma y cualquier producto sanguíneo.

- 50 En algunas realizaciones, la variedad de conjugados comprende partículas que tienen un tamaño medio de partícula de entre aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  o menos, a aproximadamente 500  $\mu\text{m}$  o más. Concretamente,  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 110  $\mu\text{m}$ , 120  $\mu\text{m}$ , 130  $\mu\text{m}$ , 140  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$ , 160  $\mu\text{m}$ , 170  $\mu\text{m}$ , 180  $\mu\text{m}$ , 190  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ , 350  $\mu\text{m}$ , 400  $\mu\text{m}$ , 450  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$  o más. En algunas realizaciones específicas, la variedad de conjugados comprende partículas que tienen un tamaño medio de partícula de al menos 70  $\mu\text{m}$  o menos, a veces de al menos 80  $\mu\text{m}$ , a veces de al menos 90  $\mu\text{m}$ , a veces de al menos 100  $\mu\text{m}$ , a veces de al menos 110  $\mu\text{m}$ , a veces de al menos 120  $\mu\text{m}$ , a veces de al menos 130  $\mu\text{m}$ , a veces de al menos 140  $\mu\text{m}$ , a veces de al menos 150  $\mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, la variedad de conjugados tiene un tamaño medio de partícula de entre 90  $\mu\text{m}$  aprox. y 150  $\mu\text{m}$  aprox. o más.

- 60 El término “*tamaño medio*” o “*diámetro medio*” o “*tamaño promedio*” se refiere a la media aritmética de los diámetros medidos, en donde los diámetros oscilan un  $\pm 25\%$  de la media. El tamaño promedio de las partículas puede medirse por cualquier método conocido por la técnica.

- 65 En algunas realizaciones, la variedad de conjugados comprende al menos dos conjugados diferentes. Cabe señalar que, sin estar limitado por la teoría, el uso de dos o más tamaños diferentes de partículas (p. ej., perlas) tiene la ventaja de maximizar el área de superficie, por lo que el fluido corporal, p. ej., plasma, corre en su mayoría en la superficie de

las perlas, con poco espacio muerto. Cuantas más perlas de diferentes tamaños haya, menos espacio libre habrá en el lecho de resina.

Por otro lado, si la resina se envasó herméticamente y el plasma no puede fluir, el flujo será menor.

Más concretamente, los inventores descubrieron sorprendentemente que la mezcla de partículas de distinto tamaño puede mejorar la micro fluidez y exponer más plasma al conjugado (resina) manteniendo el mismo flujo. Además, la mezcla de conjugados de al menos dos tamaños de partícula puede reducir la cantidad de perlas, minimizando de esta forma los costes del conjugado utilizado. En algunas realizaciones, los conjugados de la materia tratada en la presente descripción pueden formar una resina que comprende un conjugado utilizando al menos dos grupos de partículas que tienen diferente tamaño. En algunas realizaciones particulares, las partículas pueden estar presentes en una proporción de entre aproximadamente 0,001:1 y aproximadamente 1:10000, más concretamente, entre aproximadamente 0,01:1 a 1:10000. En aun alguna realización adicional, la proporción puede ser 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500, 1:600, 1:700, 1:800, 1:900, 1:1000. Más específicamente, las partículas de la variedad de conjugados o composiciones de los mismos según la materia tratada en la presente descripción pueden ser de al menos dos tamaños diferentes presentados en algunas realizaciones en una proporción de entre aproximadamente 1:1 a 1:10, específicamente, 1:4. En algunas realizaciones, la variedad de conjugados de la materia tratada en la presente descripción, también denominada en la presente memoria resina de la materia tratada en la presente descripción, puede comprender una mezcla de diferentes conjugados de partículas que tienen un tamaño medio de aproximadamente 90 µm o menos, y partículas que tienen un tamaño medio de 150 µm o más. En aun realizaciones adicionales, la variedad de conjugados o composiciones de la materia tratada en la presente descripción puede comprender conjugados de partículas con un tamaño medio de 90 µm y partículas con un tamaño medio de 150 µm en una proporción de 4:1.

El término partículas, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una porción de materia que tiene una superficie que puede unirse a compuestos químicos o biológicos, moléculas pequeñas o grandes que pueden unirse mediante enlaces covalentes o no covalentes. La partícula puede comprender un material poroso. Las partículas pueden ser “*esféricas*” (se refiere generalmente a una geometría sustancialmente (casi) redonda) o “*no esféricas*”, por ejemplo, (“*alargadas*” en forma y tiene un eje largo y corto definido). Ejemplos no limitativos de partículas incluyen perlas como al menos una de las siguientes: perla de polisacárido, perla de vidrio, perla de algodón, perla de plástico, perla de nailon, perla de látex, perla magnética, perla paramagnética, perla superparamagnética, perla de almidón y similares, perla de silicio, perla de PTFE, perla de poliestireno, perla de arseniuro de galio, perla de oro o perla de plata. En algunas realizaciones, la partícula es una perla que comprende perlas de agarosa, opcionalmente con diferente grado de reticulación en diferentes % de material (agarosa).

Como tales, las perlas de agarosa incluyen perlas que comprenden agarosa con un grado variable de reticulación, por ejemplo, las perlas denominadas perlas de sepharose. En algunas realizaciones, la perla comprende perlas de agarosa. En algunas realizaciones, la perla comprende perlas de sepharose. En algunas realizaciones, la variedad de conjugados comprende una combinación de partículas que comprenden perlas de agarosa y perlas de sepharose. Según la presente descripción, cabe señalar que las partículas que comprenden perlas de agarosa y perlas de sepharose se consideran como dos conjugados diferentes que tienen partículas diferentes.

**Sepharose** es el nombre comercial de una forma reticulada de agarosa, un polímero polisacárido extraído de las algas marinas. Su nombre comercial deriva de **Separation-Pharmacia-Agarose**. Sepharose es una marca registrada de GE Healthcare (anteriormente: Pharmacia, Pharmacia LKB Biotechnology, Pharmacia Biotech, Amersham Pharmacia Biotech y Amersham Biosciences). Existen distintos grados y químicas de sepharose.

Como se describe en la presente memoria, la variedad de conjugados puede comprender al menos dos conjugados diferentes, que opcionalmente tienen partículas con propiedades diferentes, como tamaño diferente, forma diferente, composición diferente y material diferente. En algunas realizaciones, la variedad de conjugados puede comprender perlas de agarosa con un tamaño medio de aproximadamente 90 µm. En algunas realizaciones, la variedad de conjugados puede comprender perlas de agarosa con un tamaño medio de aproximadamente 150 µm. En algunas realizaciones, la variedad de conjugados puede comprender perlas de Sepharose con un tamaño medio de aproximadamente 90 µm. En algunas realizaciones, la variedad de conjugados puede comprender perlas de Sepharose con un tamaño medio de aproximadamente 150 µm. Según la presente descripción, debe tenerse en cuenta que las partículas que son o bien perlas de sepharose con un tamaño medio de aproximadamente 90 µm o perlas de sepharose con un tamaño medio de aproximadamente 150 µm se consideran como dos conjugados diferentes que tienen partículas diferentes.

La partícula y, en concreto, la perla descrita en la presente memoria puede estar asociada a una fracción químicamente reactiva, denominada en la presente memoria como enlace. El enlace, tal y como se utiliza en la presente memoria, puede ser cualquier entidad química compuesta por cualquier conjunto de átomos, incluyendo cadenas oligoméricas y poliméricas de cualquier longitud, que, según algunas realizaciones, es capaz de unirse en un extremo a la partícula y en el otro extremo al menos a un aminoácido, un derivado del mismo o un análogo del mismo. Además, los inventores descubrieron que la cobertura de enlace de la superficie de la partícula puede oscilar entre unos 9 y unos 23 µmol

perlas /ml de medio escurrido. Más específicamente, cabe destacar que en algunas realizaciones, el medio escurrido se refiere en la presente memoria a perlas secas.

Tal y como se describe en la presente memoria, el enlace es capaz de unirse en un extremo a la partícula y en un segundo extremo al aminoácido, derivado del mismo o análogo del mismo, por lo que el enlace posee un extremo funcional en ambos lados. En otras palabras, el enlace puede ser bifuncional. En algunas realizaciones, el enlace es un reticulante bifuncional y la partícula es una perla que se une al reticulante bifuncional. En la presente memoria, el término “reticulante” se refiere a un reactivo que contiene dos o más extremos reactivos capaces de unirse químicamente a grupos funcionales específicos (por ejemplo, aminas primarias, carboxilos, sulfhidrilos, etc.) en aminoácidos, péptidos, proteínas u otras moléculas.

En algunas realizaciones, el enlace (o reticulante) puede ser un enlace bifuncional o comprender una parte/fragmento de un enlace bifuncional.

Tal y como se aprecia, el enlace puede tener una longitud diferente en función de los distintos requisitos experimentales. La longitud se refiere a la envergadura molecular de un reticulante, es decir, la distancia entre los componentes conjugados, p. ej., la partícula y el aminoácido. En algunas realizaciones, el reticulante es escindible (es decir, si el enlace puede invertirse o romperse cuando se desee, por ejemplo, EDC). En algunas realizaciones, el reticulante es un reticulante de longitud cero. En algunas realizaciones, el reticulante causa la conjugación directa sin formar parte del enlace covalente reticulado final.

El reticulante puede ser un reticulante homobifuncional o heterobifuncional. Los reticulantes homobifuncionales son reactivos que cuentan con el mismo tipo de grupo reactivo en ambos extremos. Los reticulantes amínicos (es decir, que unen grupos reactivos amínicos) pueden elegirse, por ejemplo, entre el glutaraldehído, los bis (imidoésteres) o los bis (succinimidilésteres) (también conocidos como ésteres NHS). Según algunas realizaciones, los reticulantes homobifuncionales como, por ejemplo, pero no exclusivamente, el dimetil pimelimidato (DMP) o el glutaraldehído pueden unirse a grupos NH<sub>2</sub> (grupos primarios) de la perla magnética y a grupos NH<sub>2</sub> del ácido tranexámico. Los reticulantes sulfhidrílicos pueden elegirse, por ejemplo, entre las maleimidas o los piridilditioles.

En algunas realizaciones, el enlace es un reticulante heterobifuncional. Los reticulantes heterobifuncionales son reactivos que tienen un tipo diferente de grupo reactivo en cada extremo, por ejemplo, pero no limitado a amina-sulfhidrilo o amina-carboxilo.

Los reticulantes amina-sulfhidrilo pueden tener ésteres NHS y maleimidas en cada extremo, o ésteres NHS y piridilditioles en cada extremo. Algunos ejemplos de reticulantes heterobifuncionales que pueden unir grupos amina y sulfhidrilo son el N-succinimidil 3-[2-piridilditio]-propionato (SPDP), el succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) o el succinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (SMPB).

Los reticulantes amina-carboxilo pueden contener carbodiimida. Dicho reticulante carbodiimida activa los grupos carboxilo para la reacción espontánea con aminas primarias. Estos reticulantes pueden conjugar grupos carboxilo (glutamato, aspartato, C-termini) con aminas primarias (lisina, N-termini) y N-hidroxisuccinimida (NHS). Algunos ejemplos de reticulantes heterobifuncionales que pueden unir grupos amina y carboxilo seleccionados son, aunque sin limitarse a, dicitlohexilcarbodiimida (DCC) y (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida clorhidrato (EDC) 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, clorhidrato (EDAC). Dichos reticulantes se utilizan para la conjugación de grupos carboxilo (glutamato, aspartato, C-termini) con aminas primarias (lisina, N-termini) y N-hidroxisuccinimida (NHS) para la activación estable de los carboxilatos para la conjugación con las aminas.

En algunas realizaciones, el enlace es un sistema aromático. Los ejemplos no limitados, incluyen ácido benzoico o ácido benzoico sustituido, cloruro de bencenosulfonilo, benzaldehído, clorometilbenceno.

En algunas realizaciones concretas, el enlace utilizado es hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC).

Como ya se ha detallado anteriormente, para conjugados que comprenden derivados de aminoácidos, por ejemplo ácido ciclohexanocarboxílico o ácido 4-metil-ciclohexanocarboxílico (es decir, que carecen del grupo NH<sub>2</sub> (grupo amino) de un aminoácido), el enlace puede comprender un grupo amino (solo o unido a un grupo metileno, es decir, siendo -NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, “-” es un enlace covalente). Por lo tanto, cabe señalar que en algunas realizaciones, el enlace descrito en la presente memoria puede comprender al menos un grupo amino adicional o un grupo amino unido a un grupo metileno. Por lo tanto, según a dichas realizaciones, el extremo del enlace que se une a los derivados de aminoácidos es un grupo amino del enlace o un grupo metileno del enlace. En otras palabras, la asociación entre un extremo del enlace y el derivado de aminoácido incluye un enlace covalente del anillo de ciclohexano y un grupo amino o un grupo metileno. Dicha asociación puede realizarse por cualquier método sintético conocido por un versado en la técnica.

En algunas realizaciones, la perla puede estar asociada al enlace a través de un espaciador o recubrimiento presente en la perla. Como tal, la perla se activa inicialmente (“perlas activadas”) mediante la asociación a un

espaciador/recubrimiento y posteriormente reacciona con un enlace. Cabe señalar que, en algunas ocasiones, puede que no sea necesario ningún enlace en aquellos casos en los que el espaciador/recubrimiento se une directamente al menos a un aminoácido. A veces, la perla no posee un grupo funcional capaz de unirse al enlace, y puede utilizarse un espaciador o recubrimiento.

5 Las perlas activadas se obtienen recubriéndolas previamente con un material adecuado que posea una fracción activa que permita la unión a las perlas y al enlace y/o al aminoácido. En otras palabras, las perlas se recubren previamente para incluir grupos reactivos que permitan una unión covalente al enlace o al aminoácido.

10 En algunas realizaciones, las perlas pueden activarse, por ejemplo, mediante un recubrimiento previo con cualquier material de recubrimiento. Algunos ejemplos no limitantes de dicho material incluyen: aminoácidos, proteínas, epoxi, tosilo, ácido carboxílico, alcohol polivinílico carboxilado. Cuando se hace referencia a “*pre-recubrimiento*” debe entenderse como un paso preliminar que resulta en el recubrimiento de las perlas con un material activo que a su vez permite la unión covalente de las perlas con el ácido tranexámico (es decir, directamente) o a través de al menos un enlace.

15 En algunas realizaciones, las perlas se recubren previamente con un aminoácido, un péptido o cualquier derivado del mismo. Las perlas magnéticas precubiertas pueden comprender, por ejemplo, como grupos activos, una amina primaria (-NH<sub>2</sub>), un carboxilo (-COOH), un sulfhidrilo (-SH) o un carbonilo (-CHO). En algunas realizaciones, las perlas están recubiertas previamente para incluir una fracción que puede reaccionar con grupos amino primarios o secundarios. En otras realizaciones, las perlas magnéticas están recubiertas de polilisina.

20 El término “enlace” engloba cualquier espaciador o pre-recubrimiento presente en las perlas.

En algunas realizaciones, el enlace comprende o es una cadena de átomos, por ejemplo una cadena lineal. En algunas realizaciones, el enlace comprende al menos 1 átomo, al menos 4 átomos, a veces 5 átomos, a veces 10 átomos, a veces 20 átomos, a veces 30 átomos, a veces 40 átomos. En algunas realizaciones, el enlace es o comprende una cadena lineal de 1 a 40 átomos. En algunas realizaciones, el enlace es o comprende una cadena lineal de 1 átomo. En algunas realizaciones, el enlace es una cadena lineal que comprende 5 átomos. En algunas realizaciones, el enlace es una cadena lineal que comprende 15 átomos.

30 En algunas realizaciones, el enlace es una cadena lineal que comprende 31 átomos. En algunas realizaciones, el enlace es un fragmento del éster 26-(2-hidroxi-3-metoxi-propilamino)-hexacosanoico del ácido 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il. En algunas realizaciones, el enlace es un fragmento del éster metílico del ácido 4-Oxo-pentanoico. En algunas realizaciones, el enlace es metileno.

35 Como se describe en la presente memoria, para un derivado de aminoácido, el enlace comprende en un extremo (el extremo reactivo con el anillo de ciclohexano) un grupo amino o un grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-).

Como puede apreciarse, tras la asociación del enlace con el aminoácido, un derivado del mismo o análogo del mismo, el enlace se modifica debido a la asociación y, en algunas realizaciones, comprende un fragmento del enlace.

40 Las propiedades del enlace dependen de la naturaleza de los átomos que lo componen. Se observó que los enlaces comprenden al menos un átomo que tiene al menos un par solitario de electrones, como oxígeno, nitrógeno o azufre. En algunas realizaciones, el enlace comprende al menos un átomo de oxígeno.

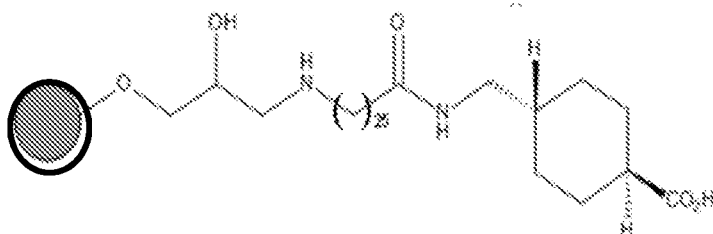
45 En algunas otras realizaciones, la asociación entre el enlace y el al menos un aminoácido, derivado del mismo o análogo del mismo puede ser una unión covalente. En algunas realizaciones adicionales, la asociación entre el enlace y el al menos un aminoácido puede ser a través de la unión de un átomo de nitrógeno (N) del aminoácido y un átomo de carbono (C) del enlace. Como puede apreciarse, tras la asociación y formación de un enlace químico, el grupo amino (-NH<sub>2</sub>-) pierde un átomo de hidrógeno, para convertirse en -NH-. En algunas realizaciones, la asociación covalente se realiza mediante enlaces de amina, imina o amida. En algunas realizaciones, el aminoácido es ácido tranexámico (TXA). Tal y como se detalla en la presente memoria, en algunas realizaciones, el derivado de aminoácido es ácido ciclohexanocarboxílico y la asociación/interacción del ácido ciclohexanocarboxílico con el enlace se realiza a través del anillo de ciclohexano y el grupo metileno del enlace. Como se detalla más adelante en el **Ejemplo 1.1**, en al menos parte de la variedad de conjugados, las perlas pueden estar recubiertas previamente con éster 26-(2-hidroxi-3-metoxi-propilamino)-hexacosanoico del ácido 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il. De esta forma, las perlas de agarosa asociadas con el éster 26-(2-hidroxi-3-metoxi-propilamino)-ácido 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il-hexacosanoico se someten a asociación con al menos un aminoácido o análogo del mismo. El enlace en el conjugado es un fragmento del éster del ácido 26-(2-hidroxi-3-metoxi-propilamino)-hexacosanoico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il y concretamente, 26-(2-hidroxi-3-metoxi-propilamino)-hexacosanal. Como puede apreciarse, debido a la asociación entre el éster 26-(2-hidroxi-3-metoxi-propilamino)-hexacosanoico del ácido 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il y el aminoácido o análogo del mismo, el enlace es un fragmento del éster 26-(2-hidroxi-3-metoxi-propilamino)-hexacosanoico del ácido 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il y específicamente 26-(2-hidroxi-3-metoxi-propilamino)-hexacosanal.


65 Como se detalla más adelante en el **Ejemplo 1.2**, en al menos una parte de la variedad de conjugados, las perlas pueden recubrirse previamente con un hidróxido y hacerse reaccionar con anhídrido succínico y piridina, seguido de una reacción con N-hidroxisuccinamida (NHS) y EDC. De esta forma, las perlas de agarosa asociadas al éster metílico



del ácido 4-(2,5-Dioxo-pirrolidin-1-il)-4-oxo-butírico se someten a la asociación con al menos un aminoácido o un análogo del mismo. El enlace en el conjugado es un fragmento de éster metílico del ácido 4-(2,5-Dioxo-pirrolidin-1-il)-4-oxo-butírico y concretamente éster metílico del ácido 4-Oxo-butírico.

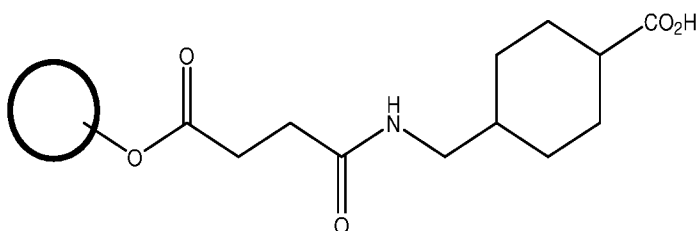
- 5 En algunas realizaciones, el conjugado comprende perlas de agarosa con un tamaño medio de 90  $\mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, el enlace comprende 26-(2-hidroxi-3-metoxi-propilamino)-hexacosanal. En algunas realizaciones, el conjugado puede tener la estructura (denominada en la presente memoria como "conjugado 1"):




- 10 en donde  representa una partícula, por ejemplo una perla de agarosa, concretamente una perla de agarosa al 4 % con un tamaño medio de 90  $\mu\text{m}$ .

- 15 En algunas realizaciones, el aminoácido es TXA, las partículas son perlas de agarosa que tienen un tamaño medio de 90  $\mu\text{m}$  y el enlace comprende 26-(2-hidroxi-3-metoxi-propilamino)-hexacosanal y el conjugado tiene la estructura denominada en la presente memoria como conjugado 1. En algunas realizaciones, en donde el derivado de aminoácido es el ácido ciclohexanocarboxílico, las partículas son perlas de agarosa con un tamaño medio de 90  $\mu\text{m}$  y el enlace comprende metilamida de ácido 26-(2-hidroxi-3-metoxi-propilamino)-hexacosanoico y el conjugado tiene la estructura indicada en la presente memoria como conjugado 1.

- 20 En algunas realizaciones, el conjugado de la materia tratada en la presente descripción comprende perlas de sepharose con un tamaño medio de 150  $\mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, el enlace comprende éster metílico del ácido 4-oxobutírico. En algunas realizaciones, el conjugado puede tener la estructura (denominada en la presente memoria como "conjugado 2"):

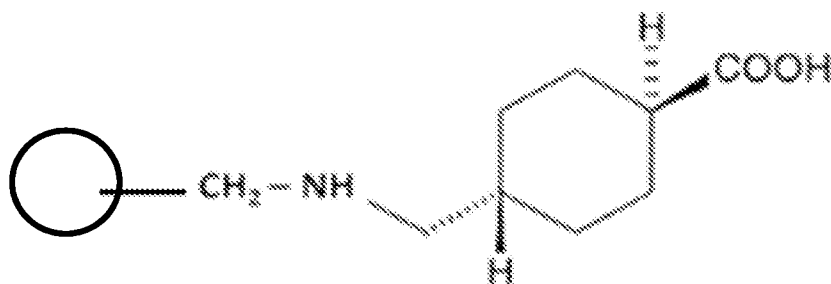



- 25 en donde  representa una partícula, por ejemplo una perla de sepharose con un tamaño medio de 150  $\mu\text{m}$ .

- 30 En algunas realizaciones, el aminoácido es TXA, las partículas son perlas de sepharose que tienen un tamaño medio de 150  $\mu\text{m}$  y el enlace comprende éster metílico del ácido 4-Oxo-butírico y el conjugado tienen la estructura mencionada en la presente memoria como conjugado 2.

- 35 En algunas realizaciones en donde el derivado de aminoácido es el ácido ciclohexanocarboxílico, las partículas son perlas de sepharose con un tamaño medio de 150  $\mu\text{m}$  y el enlace comprende el éster metílico del ácido N-metil-succinámico y el conjugado tiene la estructura mencionada en la presente memoria como conjugado 2.

- 40 En algunas realizaciones, el conjugado comprende perlas de agarosa con un tamaño medio de 150  $\mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, el enlace comprende metileno. En algunas realizaciones, el conjugado puede tener la estructura (denominada en la presente memoria como "conjugado 3"):

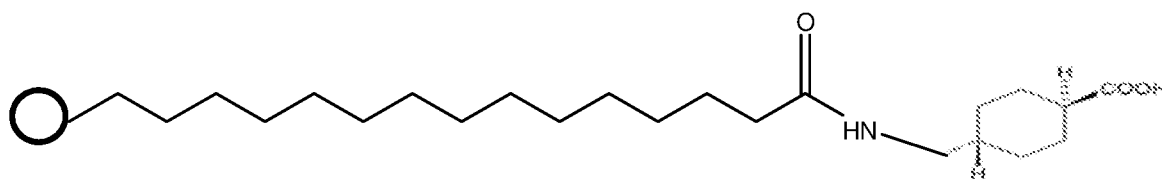


en donde  representa una partícula, por ejemplo una perla de agarosa con un tamaño medio de 150  $\mu\text{m}$ .

5 En algunas realizaciones, el aminoácido es TXA, las partículas son perlas de agarosa con un tamaño medio de 150  $\mu\text{m}$  y el enlace comprende dimetilamina y el conjugado tiene la estructura mencionada en la presente memoria como conjugado 3.

10 En algunas realizaciones en donde el derivado de aminoácido es ácido ciclohexanocarboxílico, las partículas son perlas de agarosa con un tamaño medio de 150  $\mu\text{m}$  y el enlace comprende dimetilamina y el conjugado tiene la estructura mencionada en la presente memoria como conjugado 3.

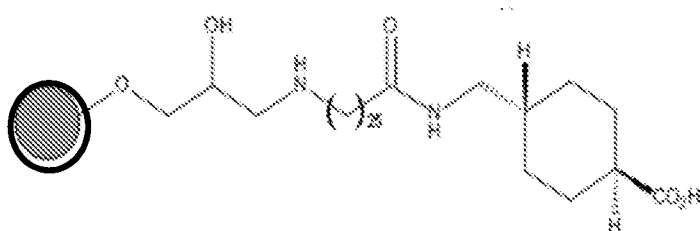
15 En algunas realizaciones, el conjugado comprende perlas de agarosa. En algunas realizaciones, el enlace comprende una cadena de carbono de 15 átomos. En algunas realizaciones, el enlace es hexadecanal. En algunas realizaciones, el conjugado puede tener la estructura (conjugado 4):



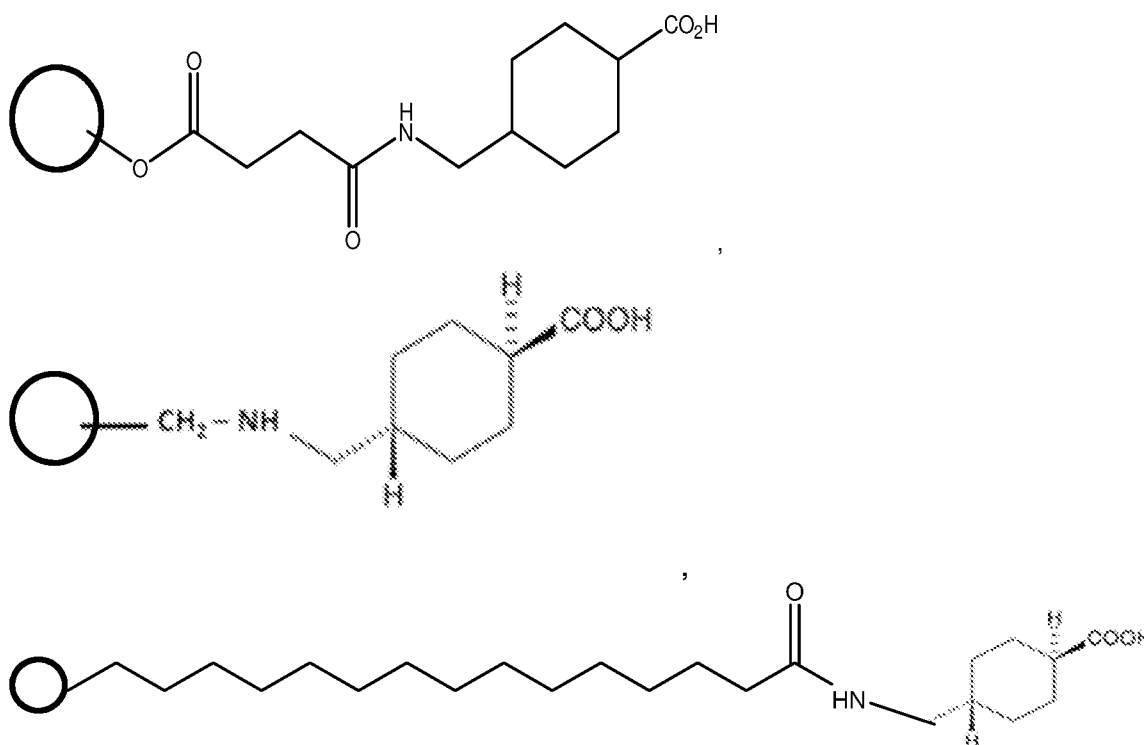
20 en donde  representa una partícula.

En algunas realizaciones, el conjugado comprende perlas de agarosa. En algunas realizaciones, el enlace comprende una cadena de carbono de 15 átomos. En algunas realizaciones, el enlace es metilamida de ácido hexadecanoico. En algunas realizaciones, el conjugado puede tener la estructura (conjugado 4):

25 Según algunos aspectos adicionales, la presente descripción proporciona al menos un conjugado que comprende al menos una partícula, al menos un enlace y al menos un aminoácido, derivado del mismo o análogo del mismo. En algunas realizaciones, los conjugados de la materia tratada en la presente descripción puede ser cualquiera de los siguientes conjugados o cualquier combinación de los mismos. Más concretamente, al menos uno de:



30



5 en donde  representa una partícula.

En algunas realizaciones, la partícula es una perla de agarosa o una perla de sepharose. En algunas otras realizaciones, la partícula tiene un tamaño medio de partícula de entre aprox. 10  $\mu\text{m}$  o menos y aprox. 500  $\mu\text{m}$  o más, específicamente, como se ha definido anteriormente. Más concretamente entre 90  $\mu\text{m}$  aprox. y 150  $\mu\text{m}$  aprox. En algunas realizaciones, los conjugados de la materia tratada en la presente descripción pueden unir al menos una proteína fibrinolítica, más específicamente, dicha proteína fibrinolítica puede ser activador tisular del plasminógeno (tPA) y opcionalmente, plasminógeno.

Según a las Figuras 12 a 19, un dispositivo para tratar fluidos corporales de mamíferos, en especial plasma sanguíneo o sangre total, según un primer ejemplo de la materia tratada en la presente descripción, se designa generalmente con el número de referencia 100, y comprende una carcasa 300, y una variedad de grupos de partículas, en concreto, perlas, que incluye al menos un primer grupo 110 de primeras partículas o perlas 210 y un segundo grupo 120 de segundas partículas o perlas 220.

Si bien el dispositivo según este y otros ejemplos se utiliza en especial con plasma sanguíneo humano (también utilizado indistintamente en la presente memoria como “plasma humano”) y/o sangre humana total (también utilizada indistintamente en la presente memoria como “sangre humana”), y/o cualquier producto de los mismos, también puede utilizarse para tratar otro plasma sanguíneo de mamíferos pero no humano o sangre total de mamíferos pero no humana, o de hecho al menos algunos tipos de plasma sanguíneo animal o sangre total animal, por ejemplo, que incluye al menos algunos tipos de plasma sanguíneo no mamífero o sangre total no mamífera.

Como se aclarará en la presente memoria, el dispositivo está ajustado para depleciones al menos una proteína fibrinolítica (por ejemplo tPA y/o Plasminógeno) de fluidos corporales de mamíferos (por ejemplo plasma humano y/o sangre total humana y/o otro plasma de mamífero y/o otra sangre total de mamífero), como un ejemplo de tratamiento de fluidos corporales de mamíferos.

La carcasa 300 define un eje longitudinal AA, y comprende una parte de cuerpo principal 350, y un par de tapones de extremo, incluyendo un tapón de extremo de entrada 310 que tiene un puerto de entrada de fluido 330, y un tapón de extremo de salida 320 que tiene un puerto de salida de fluido 340. En variaciones alternativas de este ejemplo, la carcasa puede incluir más de una parte del cuerpo principal, y/o más de un puerto de entrada, y/o uno o más de un puerto de entrada para cada parte del cuerpo, y/o más de un puerto de salida, y/o uno o más de un puerto de salida para cada parte del cuerpo.

Cada uno de los tapones de entrada 310 y de salida 320 tiene una base 360 generalmente frusto-cónica, con una superficie frusto-cónica interior 370 y una superficie frusto-cónica exterior 380 respectivamente. En este y al menos algunos otros ejemplos, las superficies frusto-cónicas interiores 370 y las superficies frusto-cónicas exteriores 380

están muy pulidas. En variaciones alternativas de este ejemplo, las superficies frusto-cónicas interiores 370 y/o las superficies frusto-cónicas exteriores 380 no están pulidas.

Por ejemplo, el puerto de entrada de fluido 330 y el puerto de salida de fluido 340 sobresalen cada uno de la respectiva base frusto-cónica 360, y cada uno de ellos puede equiparse con una parte de conector adecuado 335 sin fugas. Por ejemplo, dicha parte del conector sin fugas 335 puede tener la forma de cierres Luer para facilitar la conexión de conductos (por ejemplo, tubos de grado médico) al mismo. Como alternativa, el puerto de entrada de fluido 330, y el puerto de salida de fluido 340, pueden estar equipados con cualquier otro tipo de parte de conector sin fugas 335 para facilitar la conexión de los conductos (por ejemplo, tubos de grado médico) a los mismos.

En al menos este ejemplo, y refiriéndose también a las Figuras 14A a 14D, cada base frusto-cónica 360 tiene un área de sección transversal (ortogonal al eje longitudinal AA) que aumenta desde el respectivo extremo pequeño 312, 322, hasta el respectivo extremo grande 314, 324, de la misma. En al menos este ejemplo, cada base frusto-cónica 360 incluye una variedad de miembros secundarios 301, que radial y axialmente se proyectan hacia el interior desde la superficie interior del respectivo tapón del extremo de entrada 310 o del tapón de salida 320. Sin embargo, en al menos algunas variaciones alternativas de este ejemplo y en otros ejemplos, los miembros secundarios pueden omitirse.

Sin estar limitado por la teoría, los miembros secundarios 301 pueden mejorar la rigidez general del dispositivo 100, y/o pueden ayudar a alinear el flujo de los fluidos corporales no tratados dentro y fuera del dispositivo 100, en especial, dentro de la cámara 400 generalmente a lo largo del eje longitudinal AA.

Además, sin estar limitados por la teoría, los miembros secundarios 301 pueden ayudar a sujetar o mantener de otro modo los miembros de barrera 352, 354 en su lugar en los extremos longitudinales E1, E2, respectivamente, y más concretamente para sujetar los miembros de barrera 352, 354 en la carcasa 300, entre el respectivo tapón del extremo de entrada 310 o del tapón del extremo de salida 320 y la parte del cuerpo principal 350, como se aclarará más adelante.

Los miembros secundarios 301 tienen cada uno un extremo libre 306 orientado hacia los respectivos miembros de barrera 352, 354 en el dispositivo ensamblado 100. Como puede observarse mejor en las Figuras 14B y 14C, los extremos libres 306 se proyectan fuera de la superficie frusto-cónica interior 370 respectiva en una dirección longitudinal paralela al eje longitudinal AA más allá del extremo grande 314, 324 respectivo.

En al menos este ejemplo, el puerto de entrada de fluido 330 está unido al extremo pequeño 312 del tapón de entrada 310, y el puerto de salida de fluido 340 está unido al extremo pequeño 322 del tapón de salida 320. En variaciones alternativas del presente ejemplo, el puerto de entrada de fluido 330 puede estar conectado en cualquier otra ubicación adecuada al tapón de entrada 310, y/o el puerto de salida de fluido 340 puede estar conectado en cualquier otra ubicación adecuada al tapón de salida 320.

En este ejemplo, y refiriéndose también a las Figuras 13A a 13D, la parte de cuerpo principal 350 comprende una pared 355 generalmente cilíndrica (es decir, que tiene una sección transversal circular transversal al eje longitudinal AA del dispositivo), y que tiene extremos 356, 358 longitudinalmente opuestos.

En este ejemplo, la carcasa 300, y en especial la parte 350 del cuerpo principal, incluyendo la pared cilíndrica 355, es relativamente rígida. Por relativamente rígida se entiende que la parte del cuerpo principal 350 mantiene su forma sin deformación significativa (por ejemplo, sin deformación visible a simple vista por un observador inexperto) bajo su propio peso o durante el funcionamiento del dispositivo al alojar la variedad de grupos de partículas, así como un flujo de plasma u otros fluidos a través del dispositivo.

En variaciones alternativas de este ejemplo, la parte del cuerpo principal puede ser semiflexible o totalmente flexible (por ejemplo, en forma de bolsa flexible), y/o la parte del cuerpo principal puede tener una sección transversal no cilíndrica, por ejemplo, elíptica, poligonal, etcétera.

En este y otros ejemplos, la sección transversal de la parte del cuerpo principal 350 es generalmente uniforme a lo largo del eje longitudinal AA del dispositivo. En variaciones alternativas de este ejemplo, la sección transversal de la parte del cuerpo principal 350 puede en cambio no ser uniforme a lo largo del eje longitudinal AA del dispositivo - por ejemplo, la forma de la sección transversal puede cambiar y/o el tamaño de la sección transversal puede cambiar a lo largo del eje longitudinal AA. Por ejemplo, la parte del cuerpo principal puede tener una forma frusto-cónica, con la sección transversal circular de la parte del cuerpo principal aumentando de tamaño, o como alternativa disminuyendo de tamaño, a lo largo del eje longitudinal AA; por ejemplo, dicha forma frusto-cónica puede ser casi cilíndrica, teniendo un ángulo medio de aproximadamente 0,5° o aproximadamente 1°, por ejemplo (véase la Figura 13C).

La carcasa 300, en especial, la parte 350 del cuerpo principal, el tapón 310 del extremo de entrada y el tapón 320 del extremo de salida, pueden estar fabricadas de cualquier material adecuado compatible desde el punto de vista médico. Por ejemplo, dichos materiales pueden incluir plástico de grado médico, por ejemplo cualquiera de los siguientes: PC

(Makrolon 2458), policarbonato Apec@1745, suministrado por Covestro, EE.UU.; polipropileno; polisulfona; poliéter éter cetona (PEEK).

Al menos en este ejemplo, la carcasa 300, en especial la parte 350 del cuerpo principal, el tapón de entrada 310 y el tapón de salida 320 son transparentes, es decir, están fabricadas con materiales transparentes. Sin embargo, en variaciones alternativas de este ejemplo, la carcasa 300, en especial, la parte del cuerpo principal 350 y/o el tapón del extremo de entrada 310 y/o el tapón del extremo de salida 320 no son transparentes, por ejemplo, son translúcidos u opacos, o cualquier combinación de partes transparentes, translúcidas u opacas.

La carcasa 300, en concreto, la parte 350 del cuerpo principal, comprende una cámara interna 400 que define un volumen de control V. En este ejemplo, el volumen de control V está definido por una periferia transversal exterior P de la misma, definida por la superficie interior de la parte 350 del cuerpo principal, que en este ejemplo es una superficie interior cilíndrica, y los extremos longitudinales E1 y E2 en extremos longitudinales opuestos de la parte 350 del cuerpo principal.

Los extremos longitudinales E1 y E2 del volumen de control V están definidos por los correspondientes miembros de barrera 352, 354, respectivamente, provistos en extremos longitudinales opuestos de la parte de cuerpo principal 350. Como se aclarará en la presente memoria, los miembros de barrera 352, 354 están configurados para impedir que las primeras partículas 210 y las segundas partículas 220 salgan de la parte del cuerpo principal 350, en especial, que salgan del volumen de control V, en especial, a través del tapón del extremo de entrada 310 y el puerto de entrada de fluido 330, o a través del tapón del extremo de salida y el puerto de salida de fluido 340. Los miembros de barrera 352, 354 también están ajustados para permitir simultáneamente el paso de fluidos, en especial líquidos, más concretamente plasma sanguíneo, y aún más concretamente plasma humano, a través de la parte del cuerpo principal 350, en especial, a través del volumen de control V, en especial, el/los fluido/s corporal/es de mamífero entra/n en el volumen de control V a través del tapón de entrada 310 y el puerto de entrada de fluido 330, y posteriormente a la salida del volumen de control V, fluye/n a través del tapón de salida y el puerto de salida de fluido 340.

Al menos en este ejemplo, los miembros de barrera 352, 354 son similares o idénticos entre sí, y están en forma de discos filtrantes 352A, 354A, respectivamente, teniendo cada uno una superficie ascendente respectiva y una superficie descendente respectiva separadas por el espesor de los respectivos discos filtrantes 352A, 354A. Los miembros de barrera 352, 354, en especial los discos filtrantes 352A, 354A, comprenden una variedad de poros u otras aberturas para permitir el paso de fluidos, en especial, líquidos, más concretamente fluidos corporales, y aún más concretamente plasma humano o sangre total humana (o como alternativa, cualquier plasma o sangre total de mamífero o no mamífero), a través de los poros, siendo los poros de un tamaño inferior al menor de (a) el tamaño medio o mediano de las primeras partículas 210 o (b) el tamaño medio o mediano de las segundas partículas 220. Por ejemplo, en ejemplos donde las partículas de la más pequeña de las primeras partículas 210 o de las segundas partículas 220 tiene un diámetro efectivo (medio o mediano) de aproximadamente 90 µm (por ejemplo las partículas más grandes que tienen un diámetro efectivo (medio o mediano) de aproximadamente 150 µm), los poros tienen un diámetro efectivo (medio o mediano) de menos de 90 µm, por ejemplo cualquiera de: 80 µm; 70 µm; 60 µm; 50 µm; 40 µm, o inferior a 40 µm. En dicho ejemplo de diámetros de partículas, los poros pueden tener un diámetro efectivo (medio o mediano) dentro del intervalo de 45 µm a 50 µm, por ejemplo, o alternativamente los poros pueden tener un diámetro efectivo (medio o mediano) dentro de cualquiera de los siguientes intervalos: 20 µm a 80 µm; 30 µm a 70 µm; 40 µm a 55 µm; 40 µm a 50 µm; 40 µm a 60 µm; 40 µm a 70 µm; 40 µm a 80 µm.

Una característica de al menos algunos ejemplos en los que los miembros de barrera 352, 354 están en forma de discos de filtro 352A, 354A es que los discos de filtro 352A, 354A pueden fabricarse con celeridad.

Otra característica de al menos algunos ejemplos del dispositivo es que el flujo a través del dispositivo 100 puede controlarse. Por ejemplo, la elección de una gran cantidad de partículas (es decir, de primeras partículas 210 y segundas partículas 220) en el volumen de control V tenderá a reducir la tasa de flujo volumétrico de los fluidos corporales a través del dispositivo 100, mientras que la elección de reducir la cantidad de partículas en el volumen de control V reducirá la capacidad y eficacia de las partículas para deplecionar las proteínas fibrinolíticas de los fluidos corporales. De esta forma, eficazmente, la tasa de flujo volumétrico del dispositivo puede depender de la relación entre la cantidad de partículas (es decir, de primeras partículas 210 y segundas partículas 220) en el volumen de control V y el volumen de fluidos corporales que pueden acomodarse en el volumen de control V cuando esta cantidad de partículas se acomoda en el volumen de control V.

En variaciones alternativas de este y otros ejemplos, los miembros de barrera pueden incluir, por ejemplo, filtros que comprenden fibras o sustratos plásticos en los que el ligando está conjugado a las fibras o sustratos plásticos, en los que el ligando está conjugado, o por ejemplo membranas adecuadas, por ejemplo membranas unidireccionales que permiten el flujo aunque de fluidos corporales en una dirección pero no en la dirección opuesta a través de la membrana.

En este y otros ejemplos, los discos filtrantes 352A, 354A pueden incluir cualquiera de los Filtros Tejidos Spectra Mesh® (por ejemplo Nylon, PEEK, Polipropileno, Poliéster, Acero Inoxidable) proporcionados por Spectrum, USA, o los filtros de malla de Nylon MS®, proporcionados por Yair Technologies, Israel.

Al menos en este ejemplo, los miembros de barrera 352, 354, en especial, los discos filtrantes 352A, 354A, se ajustan con respecto a la carcasa 300, en especial, con respecto a la parte de cuerpo principal 350, y opcionalmente también con respecto al tapón del extremo de entrada 310 y el tapón del extremo de salida 320, de tal forma que se mantiene la integridad del volumen de control V. En otras palabras, la conexión entre los miembros de barrera 352, 354, en especial, los discos de filtro 352A, 354A, y la carcasa 300, en especial, la parte del cuerpo principal 350, es tal que minimiza o evita cualquier fuga de las primeras partículas 210 o de las segundas partículas 220 a través de esta conexión, al tiempo que maximiza el área expuesta de los miembros de barrera 352, 354, en especial, los discos de filtro 352A, 354A con respecto a los fluidos corporales que pasan a través del dispositivo 100. Además, los miembros de barrera 352, 354, en especial los discos de filtro 352A, 354A, están ajustados con respecto a la carcasa 300, en especial con respecto a la parte del cuerpo principal 350, y opcionalmente también con respecto al tapón del extremo de entrada 310 y el tapón del extremo de salida 320, de tal forma que las respectivas superficies ascendentes análogas de los dos miembros de barrera 352, 354, en especial los dos discos de filtro 352A, 354A, están orientadas en la dirección ascendente, mientras que las superficies respectivas descendentes de los mismos están orientadas en la dirección descendente.

Al menos en este ejemplo, y refiriéndose especialmente a las Figuras 13D y 14D, cada uno de los extremos 356, 358 de la parte de cuerpo principal 350 comprende un resalte anular elevado 359 desplazado radialmente desde un borde interior 344 (véanse las Figuras 12B, 13C por ejemplo) de los respectivos extremos 356, 358, que definen un respectivo saliente interior 357 y saliente exterior 353. Cada uno de los miembros de barrera 352, 354, en especial, los discos de filtro 352A, 354A, tiene un diámetro exterior mayor que el del borde interior 344 respectivo pero menor que el diámetro interior del resalte anular 359 respectivo, y por lo tanto se asienta sobre el saliente interior 357 respectivo. El respectivo tapón del extremo de entrada 310 y el tapón del extremo de salida 320 tienen cada uno, en el respectivo extremo grande 314, 324 de la base frusto-cónica 360, un respectivo borde anular 351 que fija herméticamente el respectivo tapón del extremo de entrada 310 y el tapón del extremo de salida 320 a los extremos 356, 358, respectivamente. Por ejemplo, los respectivos bordes anulares 351 pueden estar pegados, soldados por calor, soldados por ultrasonidos o fijados de otro modo de forma estanca a los respectivos salientes exteriores 353.

En este ejemplo, el reborde anular 359 de cada uno de los extremos respectivos 356, 358 comprende un labio saliente 359A que tiene una sección transversal generalmente triangular, con el vértice del triángulo orientado hacia fuera de los respectivos extremos 356, 358, la sección transversal generalmente triangular convergiendo hacia el vértice en una dirección generalmente paralela al eje longitudinal AA alejándose de la parte de cuerpo principal 350. Los respectivos bordes anulares 351 comprenden cada uno un rebaje anular 351A que está en registro con el labio saliente 359A cuando el tapón del extremo de entrada 310, la parte del cuerpo principal 350 y el tapón del extremo de salida 320 están coalineadas con respecto al eje longitudinal AA.

Cabe señalar que los miembros secundarios 301 tienen una dimensión D (Figura 14C) paralela al eje longitudinal AA, de tal forma que cuando el respectivo tapón del extremo de entrada 310 o el tapón del extremo de salida 320 se fijan herméticamente a la parte de cuerpo principal 350, los respectivos miembros de barrera 352, 354, en especial, los discos de filtro 352A, 354A, se aseguran con respecto a la carcasa 300, estando en relación de tope y opcionalmente de sujeción entre los respectivos miembros secundarios 301 y el respectivo saliente interior 357.

Durante el proceso de soldadura térmica o ultrasónica, por ejemplo, los respectivos labios 359A se deforman en conexión de sellado con el respectivo rebaje anular 351A, fijando de esta manera de forma sellada el respectivo tapón del extremo de entrada 310 o el tapón del extremo de salida 320 a la parte del cuerpo principal 350.

En una variación alternativa del ejemplo de las Figuras 13A a 14D, y refiriéndonos a la Figura 12B como uno de dichos ejemplos, el reborde anular 359 de cada uno de los respectivos extremos 356, 358 tiene una superficie inclinada 359B (en lugar del labio saliente 359A) generalmente paralela a la superficie frusto-cónica interior 370. Por otra parte, en este ejemplo los respectivos bordes anulares 351 comprenden cada uno (en lugar del rebaje anular 351A), un labio saliente 351B que está en registro con el saliente exterior 353 cuando el tapón del extremo de entrada 310, la parte del cuerpo principal 350 y el tapón del extremo de salida 320 están coalineadas con respecto al eje longitudinal AA. El labio saliente 351B cuenta con una sección transversal generalmente triangular, con el vértice del triángulo orientado hacia los respectivos extremos 356, 358, convergiendo la sección transversal generalmente triangular hacia el vértice en una dirección paralela al eje longitudinal AA, es decir, hacia la parte del cuerpo principal 350. Durante el proceso de soldadura por calor o ultrasonidos, los labios 351B respectivos se deforman en conexión de sellado con el saliente exterior anular 353 respectivo.

A modo de ejemplo no limitativo, las Figuras 13A a 13D proporcionan datos dimensionales (en mm) para diversas secciones de la parte del cuerpo 350 (con una tolerancia de, por ejemplo,  $\pm 0,05$ ), según una realización de este ejemplo. En implementaciones alternativas si este ejemplo, los datos dimensionales pueden cambiarse pro-rata, por ejemplo todas las dimensiones anotadas pueden ser aumentadas o disminuidas en la misma proporción, por ejemplo pueden ser aumentadas en un 50 %, 100 %, 150 %, 200 % y así sucesivamente, o disminuidas en un 10 %, 25 %, 50 % y así sucesivamente.

Además, a modo de ejemplo no limitativo, las Figuras 14A a 14D proporcionan datos dimensionales (en mm) para varias partes del tapón de entrada 310 (con una tolerancia de, por ejemplo,  $\pm 0,05$ ), según una realización de este ejemplo, y datos dimensionales similares se aplican al tapón de salida 320, *mutatis mutandis*. En implementaciones alternativas si este ejemplo, los datos dimensionales pueden cambiarse pro-rata, por ejemplo todas las dimensiones anotadas pueden ser aumentadas o disminuidas en la misma proporción, por ejemplo pueden ser aumentadas en un 50 %, 100 %, 150 %, 200 % y así sucesivamente, o disminuidas en un 10 %, 25 %, 50 % y así sucesivamente.

Cabe señalar que, en relación con el ejemplo de las Figuras 12 y 13A a 14D, la parte del cuerpo 350 tiene una dimensión longitudinal (paralela al eje longitudinal AA) que es aproximadamente del mismo tamaño que el diámetro interior de la parte del cuerpo 350. En variaciones alternativas de este ejemplo, y refiriéndose por ejemplo a la Figura 12A, la dimensión longitudinal puede ser mayor que el diámetro interior de la parte del cuerpo 350. En otras variaciones alternativas de este ejemplo, la dimensión longitudinal puede ser menor que el diámetro interior de la parte del cuerpo 350.

En variaciones alternativas de este ejemplo, la carcasa 300 puede estar formada íntegramente, y se puede proporcionar una ranura transversal en cada uno de los extremos longitudinales E1 y E2 para permitir que los respectivos miembros de barrera 352, 354, en especial, los discos filtrantes 352A, 354A, se inserten transversalmente y se sellen con respecto a la carcasa 300.

Al menos en este ejemplo, la carcasa 300, en especial, la parte del cuerpo principal 350, comprende un puerto de entrada de partículas 390 en la pared cilíndrica 355, y está configurado para permitir que el volumen de control V se llene a través del puerto de entrada de partículas 390 con la mencionada variedad de grupos de partículas, incluyendo al menos el primer grupo 110 de primeras partículas 210 y el segundo grupo 120 de segundas partículas 220. El puerto de entrada de partículas 390 comprende un tapón de sellado 392, para sellar de forma reversible o permanente el puerto de entrada de partículas 390 después de que el volumen de control V se llene con la variedad de grupos de partículas antes mencionada. Por ejemplo, dicho tapón de sellado 392 tiene una porción de vástago cónica muy pulida 393 que hace tope con una pared interior cónica complementaria 394 del puerto de entrada de partículas 390, y una parte de cabezal 395 que se acopla deformablemente a una brida anular 399 proporcionada en la boca del puerto de entrada de partículas 390.

Como alternativa, el puerto de entrada de partículas 390 puede sellarse de forma reversible o permanente de otra forma, una vez que el volumen de control V se llene con la variedad de grupos de partículas antes mencionada.

El dispositivo 100 se monta colocando en primer lugar los miembros de barrera 352, 354, en especial, los discos de filtro 352A, 354A, en registro con respecto a los extremos 356, 358 de la carcasa 300, y a continuación fijando herméticamente el tapón del extremo de entrada 310 y el tapón del extremo de salida 320 a la parte de cuerpo principal 350, uniendo de este modo los miembros de barrera 352, 354, en especial, los discos de filtro 352A, 354A, con respecto a la carcasa 300. La integridad del conjunto puede comprobarse acoplando el puerto de entrada de partículas 390 a una fuente de presión (por ejemplo, ajustada a una presión manométrica de 1 bar) mientras se sellan de forma reversible el puerto de entrada 330 y el puerto de salida 340, y comprobando si hay fugas, por ejemplo, sumergiendo la carcasa 300 en un líquido como agua, por ejemplo, y detectando cualquier fuga observando las burbujas que escapan de la carcasa 300. Por ejemplo, puede considerarse que la carcasa 300 está suficientemente sellada si se observa una fuga de hasta una burbuja cada 30 segundos escapando de la carcasa 300.

En al menos algunas aplicaciones de los ejemplos anteriores del dispositivo 100, el dispositivo 100 está precargado con la variedad de grupos de partículas antes de ser suministrado al usuario final. En dichos casos, puede utilizarse un conservante para la mencionada variedad de grupos de partículas. Por ejemplo, dicho conservante puede ser una solución de etanol al 20 %.

En otras aplicaciones alternativas de los ejemplos anteriores del dispositivo 100, el usuario final puede llenar el dispositivo 100 con la variedad de grupos de partículas antes mencionada. Al menos en este ejemplo, el tamaño del volumen de control V se encuentra entre 20 ml y unos 35 ml.

En variaciones alternativas de este ejemplo y en otros ejemplos, el tamaño del volumen de control V puede ser distinto, por ejemplo inferior a 35 ml o superior a 35 ml. Por ejemplo, el tamaño del dispositivo, y por tanto del volumen de control V, puede escalarse, por ejemplo mediante un factor de escala lineal. Por ejemplo, el factor de escala lineal puede encontrarse en cualquiera de los siguientes valores: 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, o mayor de 50. Como alternativa, por ejemplo, el factor lineal puede ser tal que el volumen de control V sea de un tamaño “n” veces mayor que el del presente ejemplo, en donde n es cualquier de los siguientes valores: 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150 o mayor de 150; correspondiente o como alternativa, el volumen de control V puede escalarse a 70 ml, 100 ml, 150 ml, 175 ml, 200 ml, 250 ml, 500 ml, 1 litro, 1,5 litros, 2 litros, 2,5 litros, 3 litros, 4 litros, 5 litros o mayor de 5 litros.

En este ejemplo, las primeras partículas 210 y/o las segundas partículas 220 pueden ser partículas conjugadas (denominadas en la presente memoria “conjugado”), y cada una puede incluir opcionalmente cualquiera de las partículas conjugadas, o composiciones de las mismas que pueden comprender al menos dos o más conjugados diferentes, tal como se divulga en la presente memoria.

En al menos algunas variaciones alternativas de estos ejemplos, únicamente un grupo del primer grupo 110 y del segundo grupo 120 incluye partículas conjugadas, mientras que el otro grupo del primer grupo 110 y del segundo grupo 120 incluye partículas no conjugadas. En otras variaciones alternativas de estos ejemplos, el primer grupo 110 y el segundo grupo 120 incluyen ambos las mismas partículas conjugadas, y por lo tanto, en efecto, sólo un único grupo combinado de partículas conjugadas.

Al menos en este ejemplo, las primeras partículas 210 y/o las segundas partículas 220 son partículas conjugadas, en las que las primeras partículas tienen dimensiones diferentes de las segundas partículas. En concreto, las primeras partículas conjugadas 210 y las segundas partículas conjugadas 220 tienen dimensiones diferentes de las segundas partículas. En al menos algunos ejemplos de este tipo, las primeras partículas conjugadas tienen un tamaño medio que es diferente del tamaño medio de las segundas partículas. En algunas otras realizaciones, las primeras partículas, concretamente los conjugados, pueden ser químicamente diferentes de los segundos conjugados.

Sin estar limitados por la teoría, los inventores consideran que la inclusión de al menos dos grupos de partículas, en los que las primeras partículas conjugadas tienen un tamaño medio que es diferente del tamaño medio de las segundas partículas, puede dar lugar a la creación de separaciones entre las partículas que proporciona una disposición que es sustancialmente menos compacta que en una disposición análoga con todas las partículas del mismo tamaño o de un tamaño similar. A su vez, esta característica de compacidad reducida permite una mayor zona expuesta para cada una de las partículas que en disposiciones análogas con partículas del mismo tamaño o de tamaño similar. A su vez, esta mayor superficie expuesta permite una mayor interacción entre las partículas conjugadas y los fluidos corporales (cuando dichos fluidos corporales fluyen a través del dispositivo 100), aumentando de esta forma la eficacia de las partículas para eliminar al menos una proteína fibrinolítica del fluido corporal. En consecuencia, una cantidad global relativamente menor de primeras partículas conjugadas y segundas partículas conjugadas que son dimensionalmente diferentes puede ser tan eficaz como una cantidad global relativamente mayor de primeras partículas conjugadas y segundas partículas conjugadas que son dimensionalmente similares, en términos de agotar al menos una proteína fibrinolítica del fluido corporal, lo que puede tener efectos económicos.

Una forma de calcular cuánto plasminógeno puede absorberse utilizando un solo grupo de partículas conjugadas es la siguiente:

Cálculo de capacidad de la resina

- Comenzando con la unidad estándar de Plasma Fresco Congelado -

o Cada unidad cuenta con 250 mL de plasma

o La concentración de Plasminógeno en plasma es de 160 µg/mL

o Por lo tanto, la cantidad total de plasminógeno en una unidad de PFC es de 40 mg.

o La masa molecular del plasminógeno es de 92kDa

o 1 unidad Dalton se considera numéricamente equivalente a 1 g/mol a efectos de cálculo.

o 92000 Da es por tanto 92000 g/mol o 92000 µg/µmol o 92 mg/µmol

o Al calcular el número de moles de los 40 mg en una unidad de PFC -  
 $40 \text{ mg} \div 92 \text{ mg}/\mu\text{mol} = 0,435 \mu\text{mol}$

- Sepharose 4 Fast Flow con el enlace de 25 átomos que actúan en 16-23 µmol perlas/mL de resina escurrida puede reducir 1,317 gramos de plasminógeno esto es 33 veces más que en una unidad de plasma.

En referencia a las Figuras 15 y 16, un sistema para deplecionar al menos una proteína fibrinolítica del (de los) fluido(s) corporal(es) de mamífero, generalmente designado con el número de referencia 1000, según un ejemplo de la materia tratada en la presente descripción comprende el dispositivo 100, un reservorio salino 1100, un reservorio donante 1200, un reservorio receptor de plasma 1300 y un reservorio de residuos de lavado 1400.

El reservorio salino 1100 y el reservorio donante 1200 están en comunicación de fluidos selectiva y no concurrente con el puerto de entrada de fluidos 330 a través de la primera válvula de tres vías 70.

El reservorio de plasma receptor 1300 y el reservorio de residuos de lavado 1400 están en comunicación de fluido selectiva y no concurrente con el puerto de salida de fluido 340 a través de la segunda válvula de tres vías 90.



Los conductos 82, 84 conectan el reservorio de suero salino 1100 y el reservorio donante 1200, respectivamente, a los puertos respectivos 72, 74 de la primera válvula de tres vías 70, y otro conducto 76 conecta el tercer puerto 76 de la primera válvula de tres vías 70 al puerto de entrada 330 del dispositivo 100.

5 Los conductos 62, 64 conectan el reservorio de plasma aceptor 1300 y el reservorio de residuos de lavado 1400, respectivamente, a los puertos respectivos 92, 94 de la segunda válvula de tres vías 90, y otro conducto 66 conecta el tercer puerto 96 de la segunda válvula de tres vías 90 al puerto de salida 340 del dispositivo 100.

10 Al menos en este ejemplo, el dispositivo 100 es tal y como se describe en los ejemplos de la presente memoria, o las variaciones alternativas de dichos ejemplos. En cualquier caso, el volumen de control V aloja la mencionada variedad de grupos de partículas, incluyendo al menos el primer grupo de primeras partículas y el segundo grupo de segundas partículas.

15 El reservorio de suero salino 1100 puede incluir cualquier reservorio adecuado que contenga una cantidad adecuada de suero salino, siendo dicha cantidad normalmente varias veces el tamaño del volumen de control V. En este ejemplo el reservorio de suero salino 1100 tiene la forma de una jeringa, aunque en variaciones alternativas de este ejemplo el reservorio de suero salino 1100 puede adoptar otras formas, por ejemplo una bolsa no rígida que puede presionarse para hacer que la solución salina salga de la bolsa a través del conducto 82.

20 El reservorio donante 1200 puede incluir una bolsa u otro reservorio que contenga los fluidos corporales de mamífero a tratar por el dispositivo 100. Por ejemplo, el reservorio donante 1200 puede contener plasma humano y/o sangre total humana y/u otro plasma de mamífero y/u otra sangre total de mamífero. Como alternativa, el reservorio donante 1200 puede comprender en su lugar un donante vivo, por ejemplo, un ser humano que posea un catéter sanguíneo insertado en sus vasos sanguíneos de forma que permita que la sangre fluya a través del catéter (conectado a o parte del conducto 84) al dispositivo 100 directamente, o indirectamente a través de un dispositivo adecuado de separación de productos sanguíneos que separe el plasma de la sangre total antes de la entrega al dispositivo 100.

30 El reservorio de plasma receptor 1300 puede incluir una bolsa u otro reservorio para recibir el fluido corporal de mamífero tratado, después de ser tratado por el dispositivo 100. Por ejemplo, el reservorio de plasma 1300 puede contener plasma humano y/o sangre total humana y/u otro plasma de mamífero y/u otra sangre total de mamífero que haya sido total o parcialmente desprovista de al menos una proteína fibrinolítica. Como alternativa, el reservorio de plasma receptor 1300 puede comprender en su lugar un paciente vivo, por ejemplo un ser humano que posea un catéter sanguíneo insertado en sus vasos sanguíneos de forma que permita que el fluido corporal de mamífero tratado fluya a través del catéter (conectado a o parte del conducto 62) desde el dispositivo 100.

35 El reservorio de residuos de lavado 1400 puede incluir una bolsa u otro reservorio capaz de contener la solución salina tras pasar a través del dispositivo desde el reservorio de solución salina 1100.

40 En referencia a la Figura 17, cabe señalar que el dispositivo 100, tal como se divulga en la presente memoria, junto con el reservorio de solución salina 1100, el reservorio de plasma aceptor 1300 y el reservorio de residuos de lavado 1400, puede proporcionarse como un kit 800. El kit 800 también puede incluir la primera válvula de tres vías 70, así como el conducto 82 conectado al reservorio de suero salino 1100 y a la primera válvula de tres vías 70 a través del puerto 72, y el conducto 86 conectado a la primera válvula de tres vías 70 y al puerto de entrada 330 del dispositivo 100. El kit 800 también puede incluir la segunda válvula de tres vías 90, así como los conductos 62, 64 conectados al reservorio de plasma receptor 1300 y al reservorio de residuos de lavado 1400, respectivamente, y a la segunda válvula de tres vías 90 a través de los respectivos puertos 92, 94, y el conducto 66 conectado al tercer puerto 96 de la segunda válvula de tres vías 90 y al puerto de salida 340 del dispositivo 100. El kit 800 puede incluir además un conducto 84 conectado a la primera válvula de tres vías 70 a través del puerto 74, en donde otro extremo del conducto 84 puede conectarse al reservorio donante 1200.

50 El sistema 1000 puede utilizarse, por ejemplo, de la siguiente forma.

El kit 800 se saca de su envase estéril y se inspeccionan sus distintos componentes para garantizar la integridad de todos ellos.

55 En referencia a la Figura 15, en la configuración de lavado hay que garantizar que la primera válvula de tres vías 70 esté configurada de forma que permita la comunicación de fluidos entre los puertos 72 y 76 mientras bloquea el puerto 74, y la segunda válvula de tres vías 90 esté configurada de forma que permita la comunicación de fluidos entre los puertos 94 y 96, al tiempo que bloquea el puerto 92. A continuación, se ceba el dispositivo 100 (se lava con suero salino) para que el suero salino fluya desde el reservorio de suero salino 1100 a través del dispositivo 100 a través de la primera válvula de tres vías 70 y hacia el reservorio de residuos de lavado 1400 a través de la segunda válvula de tres vías 90.

65 El reservorio donante 1200 puede conectarse al kit 800 para suministrar al sistema 1000. En los ejemplos donde el reservorio donante tiene forma de bolsa u otro reservorio que contiene los fluidos corporales del mamífero que van a ser tratados por el dispositivo 100, el reservorio donante 1200 puede conectarse al conducto 84. Entonces, el

reservorio donante 1200 puede colgarse de un poste intravenoso IV, por ejemplo, o puede conectarse a una bomba peristáltica, para permitir que los fluidos corporales de mamífero a tratar por el dispositivo 100, fluyan selectivamente hacia el mismo, tal y como se aclarará más adelante.

- 5 En ejemplos donde el reservorio donante 1200 es un donante vivo, por ejemplo un ser humano, se inserta un catéter sanguíneo en un vaso sanguíneo del donante vivo, y el catéter se conecta al conducto 84 o forma parte de él.

10 En referencia a la Figura 16, y tras completar la configuración de lavado y de cebar el dispositivo 100 con solución salina (utilizando la configuración de la Figura 15), se establece la configuración de tratamiento. En la configuración de tratamiento hay que garantizar que la primera válvula de tres vías 70 esté configurada de forma que permita la comunicación de fluidos entre los puertos 74 y 76 mientras bloquea el puerto 72, y la segunda válvula de tres vías 90 esté configurada de forma que permita la comunicación de fluidos entre los puertos 92 y 96, al tiempo que bloquea el puerto 94. A continuación, se tratan los fluidos corporales de mamíferos no tratados, en especial, mediante la depleción de al menos una proteína fibrinolítica de los fluidos corporales de mamíferos, haciendo que los fluidos corporales de mamíferos no tratados fluyan desde el reservorio donante 1200 y a través del dispositivo 100, a través de la primera válvula de tres vías 70, y dentro del reservorio de plasma receptor 1300, a través de la segunda válvula de tres vías 90.

20 Según a la Figura 18, otro ejemplo de un sistema para deplecionar al menos una proteína fibrinolítica del (de los) fluido(s) corporal(es) de mamífero, designado generalmente con el número de referencia 2000, según la materia tratada en la presente descripción, comprende una batería 2500 que comprende una variedad de dispositivos 100. En la ilustración de la Figura 18, la batería 2500 comprende cuatro dispositivos 100, y en variaciones alternativas de este ejemplo la batería 2500 puede comprender en cambio dos, tres o más de cuatro dispositivos 100, *mutatis mutandis*.

25 El sistema 2500 también comprende un reservorio de suero salino 1100, un reservorio donante 1200, un reservorio de plasma receptor 1300 y un reservorio de residuos de lavado 1400, así como una primera válvula de tres vías 70 y una segunda válvula de tres vías 90, tal y como se describe en la presente memoria para el sistema 1000 ilustrado en las Figuras 15 y 16, *mutatis mutandis*. En este ejemplo, la batería 2500 comprende una variedad de dispositivos 100 interconectados de forma que permitan la comunicación de los fluidos entre los respectivos volúmenes de control V de la variedad de dispositivos 100.

30 Al menos en este ejemplo, cada dispositivo 100 (de la batería 2500) es tal y como se describe en los ejemplos de la presente memoria, o las variaciones alternativas de dichos ejemplos. En cualquier caso, el volumen de control V de cada dispositivo 100 de la batería 2500 contiene una variedad de grupos de partículas, incluyendo al menos el primer grupo de primeras partículas y el segundo grupo de segundas partículas.

35 En al menos este ejemplo, la variedad de dispositivos 100 de la batería 2500 están interconectados en serie, en el que para cada par de los dispositivos 100 interconectados en serie (adyacentemente), el respectivo puerto de entrada de fluido 330 de un dispositivo 100 del par está conectado y en comunicación fluida con el respectivo puerto de salida de fluido 340 del otro dispositivo 100 del par. El dispositivo 100 más ascendente (también designado como dispositivo 100A en la Figura 18) de la batería 2500 está conectado al reservorio de suero salino 1100 y al reservorio donante 1200 a través de la primera válvula de tres vías 70, de forma similar al dispositivo 100 del sistema 1000 ilustrado en las Figuras 15 y 16, *mutatis mutandis*. El dispositivo 100 más descendente (también designado como dispositivo 100B en la Figura 18) de la batería 2500 está conectado al reservorio de plasma receptor 1300 y al reservorio de residuos de lavado 1400 a través de la segunda válvula de tres vías 90, de forma similar al dispositivo 100 del sistema 1000 ilustrado en las Figuras 15 y 16, *mutatis mutandis*.

40 En este ejemplo, el reservorio de suero salino 1100 contiene suero salino suficiente para lavar y cebar todos los dispositivos 100 de la batería 2500.

45 Cabe señalar que la batería 2500 de los dispositivos 100, tal como se divulga en la presente memoria, junto con el reservorio de suero salino 1100, el reservorio de plasma receptor 1300 y el reservorio de residuos de lavado 1400 (y con la exclusión del respectivo reservorio de donante 1200), puede proporcionarse como un kit 2800. El kit 2800 también puede incluir la primera válvula de tres vías 70, así como el conducto 82 conectado al reservorio de suero salino 1100 y a la primera válvula de tres vías 70 a través del puerto 72, y el conducto 86 conectado a la primera válvula de tres vías 70 y al puerto de entrada 330 del dispositivo más ascendente 100A. El kit 2800 también puede incluir la segunda válvula de tres vías 90, así como los conductos 62, 64 conectados al reservorio de plasma receptor 1300 y al reservorio de residuos de lavado 1400, respectivamente, y a la segunda válvula de tres vías 90 a través de los respectivos puertos 92, 94, y el conducto 66 conectado al tercer puerto 96 de la segunda válvula de tres vías 90 y al puerto de salida 340 del dispositivo más descendente 100B. El kit 2800 puede incluir además un conducto 84 conectado a la primera válvula de tres vías 70 a través del puerto 74, en el que otro extremo del conducto 84 puede conectarse al reservorio donante 1200.

50 El sistema 2000 puede utilizarse de forma similar al sistema 1000, en especial, comenzando con una configuración de lavado respectiva seguida de una configuración de tratamiento respectiva, similar a la configuración de lavado y a la configuración de tratamiento que se describen en la presente memoria para el sistema 1000, *mutatis mutandis*.

Una característica del sistema 2000 es que los fluidos corporales de mamíferos del reservorio donante 1200 se conectan a cada dispositivo 100 sucesivamente en la batería 2500, permitiendo el paso de una mayor calidad de fluidos corporales de mamíferos tratados, es decir, en los que el nivel de la proteína fibrinolítica al menos uno en el fluido corporal de mamíferos se depleciona sucesivamente más y más a medida que el fluido corporal de mamíferos deplecionado tratado pasa de un dispositivo 100 al siguiente dispositivo 100 en la batería 2500.

Por otro lado, es posible que la variedad de dispositivos 100 conectados en serie puedan crear una contrapresión en el sistema 2000 que podría dar lugar a que el flujo de fluido corporal de mamífero a través del sistema 2000 sea menor que, por ejemplo, en el sistema 1000.

Según a la Figura 19, otro ejemplo de un sistema para deplecionar al menos una proteína fibrinolítica del (de los) fluido(s) corporal(es) de mamífero, designado generalmente con el número de referencia 3000, según la materia tratada en la presente descripción, comprende una batería 3500 que comprende una variedad de dispositivos 100. En la ilustración de la Figura 19, la batería 3500 comprende cuatro dispositivos 100, y en variaciones alternativas de este ejemplo la batería 3500 puede comprender en cambio dos, tres o más de cuatro dispositivos 100, *mutatis mutandis*.

El sistema 3500 también comprende un reservorio de suero salino 1100, un reservorio donante 1200, un reservorio de plasma receptor 1300 y un reservorio de residuos de lavado 1400, así como una primera válvula de tres vías 70 y una segunda válvula de tres vías 90, tal y como se describe en la presente memoria para el sistema 1000 ilustrado en las Figuras 15 y 16, *mutatis mutandis*. En este ejemplo, la batería 3500 comprende una variedad de dispositivos 100 interconectados de forma que permitan la comunicación de los fluidos entre los respectivos volúmenes de control V de la variedad de dispositivos 100.

Al menos en este ejemplo, cada dispositivo 100 (de la batería 3500) es tal y como se describe en los ejemplos de la presente memoria, o las variaciones alternativas de dichos ejemplos. En cualquier caso, el volumen de control V de cada dispositivo 100 de la batería 3500 contiene una variedad de grupos de partículas, incluyendo al menos el primer grupo de primeras partículas y el segundo grupo de segundas partículas.

Al menos en este ejemplo, la variedad de dispositivos 100 de la batería 3500 están interconectados en paralelo, y el respectivo puerto de entrada de fluido 330 de los dispositivos 100 están interconectados y en comunicación de fluido entre sí a través del colector de entrada 3330. Además, los respectivos puertos de salida de fluido 340 de los dispositivos 100 están interconectados y en comunicación fluida entre sí a través del colector de salida 3340. El colector de entrada 3330 de la batería 3500 está conectado al reservorio de suero salino 1100 y al reservorio donante 1200 a través de la primera válvula de tres vías 70, de forma similar al dispositivo 100 del sistema 1000 ilustrado en las Figuras 15 y 16, *mutatis mutandis*. El colector de salida 3340 de la batería 3500 está conectado al reservorio de plasma receptor 1300 y al reservorio de residuos de lavado 1400 a través de la segunda válvula de tres vías 90, de forma similar al dispositivo 100 del sistema 1000 ilustrado en las Figuras 15 y 16, *mutatis mutandis*.

En este ejemplo, el reservorio de suero salino 1100 contiene suero salino suficiente para lavar y cebar todos los dispositivos 100 de la batería 3500.

Cabe señalar que la batería 3500 de los dispositivos 100, tal como se divulga en la presente memoria, junto con el reservorio de suero salino 1100, el reservorio de plasma receptor 1300 y el reservorio de residuos de lavado 1400, el colector de entrada 3330 y el colector de salida 3340 (y con la exclusión del respectivo reservorio de donante 1200), puede proporcionarse como un kit 3800. El kit 3800 también puede incluir la primera válvula de tres vías 70, así como el conducto 82 conectado al reservorio de suero salino 1100 y a la primera válvula de tres vías 70 a través del puerto 72, y el conducto 86 conectado a la primera válvula de tres vías 70 y al puerto de entrada 3330. El kit 3800 también puede incluir la segunda válvula de tres vías 90, así como los conductos 62, 64 conectados al reservorio de plasma receptor 1300 y al reservorio de residuos de lavado 1400, respectivamente, y a la segunda válvula de tres vías 90 a través de los respectivos puertos 92, 94, y el conducto 66 conectado al tercer puerto 96 de la segunda válvula de tres vías 90 y al puerto de salida 3340. El kit 3800 puede incluir además un conducto 84 conectado a la primera válvula de tres vías 70 a través del puerto 74, en el que otro extremo del conducto 84 puede conectarse al reservorio donante 1200.

El sistema 3000 puede utilizarse de forma similar al sistema 1000, en especial, comenzando con una configuración de lavado respectiva seguida de una configuración de tratamiento respectiva, similar a la configuración de lavado y a la configuración de tratamiento que se describen en la presente memoria para el sistema 1000, *mutatis mutandis*.

Una característica del sistema 3000 es que se puede tratar un flujo volumétrico y/o un caudal volumétrico relativamente grande de fluidos corporales de mamíferos procedentes del reservorio donante 1200, dividiendo los fluidos corporales de mamíferos entre la variedad de dispositivos 100 de la batería 3500, y tratando los fluidos corporales de mamíferos simultáneamente en los dispositivos 100.

Por otro lado, es posible que la variedad de dispositivos pueda crear una contrapresión en el sistema 2000 que podría dar lugar a que el flujo de fluido corporal de mamífero a través del sistema 2000 sea menor que, por ejemplo, en el sistema 1000.

En una variación alternativa del sistema 3000, los puertos de entrada de fluido 330 de la variedad de dispositivos 100 de la batería 3500 pueden estar conectados directamente y en comunicación fluida con el reservorio de plasma donante respectivo, y/o cada uno de los puertos de salida de fluido 340 puede estar conectado directamente a, y en comunicación fluida selectiva con el reservorio de plasma receptor respectivo.

En otra variante alternativa del sistema 3000, cada dispositivo 100 puede sustituirse por una batería de dispositivos 100 en conexión en serie, por ejemplo correspondiente a la batería 2500, *mutatis mutandis*.

Se ha propuesto un modelo fisiológico de hemostasia basado en las células que se inicia cuando el factor VII activado (VIIa) se une a las células portadoras del factor tisular, lo que provoca una mayor activación de los factores IX y X, que a su vez cortan (activan) el factor II (protrombina) para formar trombina (IIa). La trombina activa el factor XI, que a su vez activa otros factores para generar más trombina. A continuación, la trombina escinde el fibrinógeno para formar el coágulo preliminar de fibrina, que se estabiliza en un coágulo hemostático firme mediante la acción reticulante del factor XIII.

En caso de lesión vascular, el sistema de coagulación se activa, lo que provoca la deposición de fibrina reticulada en tejidos y vasos sanguíneos, comprometiendo de este modo el flujo sanguíneo. Por lo tanto, es necesario otro sistema que pueda disolver adecuadamente el coágulo de fibrina, impidiendo de esta forma que siga creciendo más allá de las necesidades fisiológicas, e iniciar la lisis del coágulo cuando éste ya no sea necesario. Este sistema se compone de proteínas fibrinolíticas, que se activan, convirtiendo la fibrina en sus productos solubles de degradación mediante la acción de la serina proteasa, la plasmina. En condiciones fisiológicas, la participación medida de activadores, inhibidores y cofactores regulan con precisión la fibrinólisis.

El plasminógeno, principal componente del sistema fibrinolítico, se sintetiza principalmente en el hígado. La escisión (activación) del plasminógeno en un único enlace peptídico Arg-Val en la posición 560-561, da lugar a la serina proteasa activa, la plasmina, que a su vez disuelve el coágulo de fibrina. Los activadores del plasminógeno realizan dicha escisión.

El principal activador endógeno del plasminógeno es el **activador tisular del plasminógeno (tPA)**. Funcionalmente, el t-PA es en sí mismo un activador pobre en plasminógeno. Sin embargo, en presencia de fibrina, la eficacia catalítica de la activación del plasminógeno dependiente del tPA aumenta hasta en 500 veces. La actividad de la plasmina sobrepasada también escinde los factores de coagulación, lo que impediría la formación de nuevos coágulos.

El segundo activador endógeno del plasminógeno es el u-PA o prouroquinasa de cadena simple. El u-PA tiene una afinidad por la fibrina mucho menor que el tPA. Aunque el u-PA es un activador bastante efectivo del plasminógeno en presencia o ausencia de fibrina, su actividad de activación del plasminógeno se ve estimulada significativamente por la fibrina. El u-PA se muestra a través de distintas células, como las células endoteliales activadas, los macrófagos, las células epiteliales renales y algunas células tumorales.

El sistema fibrinolítico mantiene un equilibrio bastante estable gracias a la acción de los activadores (como se ha detallado anteriormente) y los inhibidores de las proteínas fibrinolíticas. El principal inhibidor de la plasmina es la  $\alpha_2$  antiplasmina - una glicoproteína de cadena simple que se sintetiza principalmente en el hígado y circula en el plasma en concentraciones relativamente altas (2  $\mu$ M). La plasmina liberada en la sangre circulante o en las proximidades de un coágulo se neutraliza inmediatamente al formar un complejo estequiométrico irreversible 1:1 junto con la  $\alpha_2$  antiplasmina.

Entre los distintos inhibidores de los activadores del plasminógeno, el inhibidor-1 del activador del plasminógeno (PAI-1) es el más extendido. Lo liberan las células endoteliales, los monocitos, los macrófagos, los hepatocitos, los adipocitos y las plaquetas. El PAI-1 es el inhibidor fisiológico más importante y de acción más rápida tanto del tPA como del u-PA.

El inhibidor 2 del activador del plasminógeno (PAI 2) se sintetiza en la placenta humana. Se encuentran niveles significativos de PAI 2 en el plasma humano, principalmente durante el embarazo.

Finalmente, el inhibidor de la fibrinólisis activable a través de la trombina (TAFI) es una carboxipeptidasa plasmática con especificidad para los residuos carboxiterminales de arginina y lisina que actúa como un potente inhibidor de la fibrinólisis.

El tratamiento de pacientes con distintos problemas de coagulación es esencial durante episodios de hemorragia espontánea, traumatismos y procedimientos quirúrgicos. En estos casos se suelen utilizar productos derivados de la sangre o del plasma (por ejemplo, plasma normal o plasma fresco congelado - PFC). Estos productos contienen factores de coagulación y proteínas fibrinolíticas y, por lo tanto, se supone que detienen la hemorragia y corrigen la anomalía de coagulación ausente o alterada induciendo la formación de un coágulo hemostático. En general, la carencia o anomalía de cualquier factor de coagulación puede derivar en una tendencia hemorrágica debido a una capacidad insuficiente para formar un coágulo hemostático estable. Si estar limitados por ninguna teoría, los inventores

asumieron que la presencia de proteínas fibrinolíticas, responsable de la lisis del coágulo hemostático, puede provocar la disolución del coágulo y el agravamiento de los fenómenos hemorrágicos.

De esta forma, una vez formado un coágulo hemostático tras la sustitución del factor de coagulación faltante por el (los) producto(s) derivado(s) de la sangre/plasma disponible/s, la disolución del coágulo, si se requiere, la lleva a cabo el sistema fibrinolítico. Sin embargo, si no se quiere la disolución del coágulo, sino todo lo contrario, por ejemplo, mantener el coágulo hemostático en situaciones de hemorragia o generar más coágulos sanguíneos, un tratamiento con fluidos corporales, específicamente, sangre o plasma y cualquier producto derivado que incluya los factores de coagulación, pero deplecionado en factores fibrinolíticos, puede ser una solución deseable.

Tal y como se indica en la presente memoria, la materia tratada en la presente descripción proporciona conjugados, una variedad de conjugados o cualquier composición de los estos, así como dispositivos, kits y sistemas para eliminar proteínas fibrinolíticas de fluidos corporales, específicamente, sangre, plasma y productos de los mismos, y por lo tanto proporciona además métodos que utilizan estos productos.

Por lo tanto, en aún otro aspecto, la materia tratada en la presente descripción se relaciona con un método para deplecionar al menos una proteína fibrinolítica de fluidos corporales de mamíferos o desde cualquier producto derivado de ellos. Más concretamente, el método comprende los siguientes pasos: En un primer paso (i), se somete(n) el(los) fluido(s) corporal(es) o cualquier preparado de estos a un procedimiento de depleción por afinidad específico para la/s al menos una/s proteína/s fibrinolítica/s. El siguiente paso (ii) consiste en recuperar el al menos un fluido corporal deplecionado en proteínas fibrinolíticas obtenido en la etapa (i).

Hay que tener en cuenta que el procedimiento de depleción por afinidad comprende poner en contacto el fluido corporal con una cantidad eficaz de la variedad de conjugados según la materia tratada en la presente descripción o con al menos una composición que comprenda la variedad de conjugados, según la materia tratada en la presente descripción. Como alternativa, el procedimiento de depleción por afinidad puede realizarse aplicando el fluido corporal sobre un dispositivo, batería, kit o sistema que comprenda los conjugados de la materia tratada en la presente descripción, cualquier variedad de conjugados o cualquier composición que comprenda la variedad de conjugados según la materia tratada en la presente descripción.

Cabe señalar que en algunas realizaciones, cada conjugado comprende al menos una partícula, al menos un enlace y al menos un aminoácido, un derivado del mismo o un análogo del mismo. En algunas realizaciones concretas, la variedad de conjugados comprende al menos dos conjugados diferentes, y donde dicho aminoácido, un derivado del mismo o un análogo del mismo es al menos uno de los siguientes: ácido 4-(aminometil)-ciclohexano-carboxílico (ácido tranexámico), ácido  $\epsilon$ -amino caproico, lisina, ácido ciclohexanocarboxílico y ácido 4-metil-ciclohexanocarboxílico. En algunas realizaciones más, la variedad de conjugados comprende al menos dos conjugados diferentes, y donde dicho aminoácido, un derivado del mismo o un análogo del mismo es al menos uno de los siguientes: ácido 4-(aminometil)-ciclohexano-carboxílico (ácido tranexámico), ácido  $\epsilon$ -amino caproico y lisina.

Cabe señalar que en algunas realizaciones, las partículas conjugadas útiles en los métodos de la materia tratada en la presente descripción pueden ser como se definen en la materia tratada en la presente descripción en la presente memoria. En algunas realizaciones más, el método de la materia tratada en la presente descripción puede utilizar cualquiera de los dispositivos, baterías, kits o sistemas proporcionados por la materia tratada en la presente descripción, tal y como se define en la presente memoria.

En algunas realizaciones, los métodos de la materia tratada en la presente descripción pueden ser aplicables para deplecionar las proteínas fibrinolíticas del fluido corporal que puede ser al menos uno de sangre total, plasma o producto derivado de la sangre que comprende al menos un factor de coagulación.

En algunas realizaciones concretas, dicho producto derivado de la sangre puede ser al menos uno de los siguientes: sangre total, plasma, plasma fresco congelado (PFC), plasma rico en plaquetas (PRP) y crioprecipitado.

Cabe destacar que, en algunas realizaciones, el método de la materia tratada en la presente descripción puede llevarse a cabo ex vivo o in vitro. Más concretamente, en fluidos corporales que ya no forman parte del cuerpo humano.

La transfusión de sangre sigue siendo un método fundamental para salvar una vida. En la moderna terapia de banco de sangre se transfunden componentes sanguíneos en lugar de sangre total.

La terapia de componentes sanguíneos implica la separación de la sangre en sus componentes para suministrar al paciente únicamente el componente específico deseado, evitando de este modo el uso de componentes innecesarios. El uso de componentes sanguíneos permite tratar a distintos pacientes con la sangre de un único donante.

El término "plasma fresco congelado" (PFC), tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere al principal componente sanguíneo, es decir, la fracción líquida acelular de la sangre humana que se ha congelado y conservado tras una donación de sangre y que se utiliza para la transfusión. Tras la donación, se centrifuga una unidad de sangre

humana, se separa el contenido celular de la sangre y el plasma restante se congela a una temperatura de al menos -18 °C (0 F) en las ocho horas posteriores a la extracción.

El PFC contiene todos los componentes (factores/proteínas) de los sistemas de coagulación, fibrinolítico y del complemento. Existen indicaciones bien definidas para el uso del PFC en deficiencias de coagulación únicas o múltiples, así como en hemorragias existentes o previstas como las que se producen en traumatismos o intervenciones quirúrgicas.

“Crioprecipitado”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a las proteínas precipitadas del plasma obtenidas a partir de una única unidad de plasma fresco mediante congelación rápida en las 6-8 horas siguientes a la obtención (tal y como se hace con el PFC) y descongelación rápida a 4<sup>o</sup> C. El crioprecipitado es rico en Factor VIII, factor XIII, factor von Willebrand y fibrinógeno. Por lo tanto, este componente es apto para el tratamiento o la prevención de hemorragias en condiciones hereditarias o adquiridas asociadas con la falta o el deterioro de las proteínas de la coagulación antes mencionadas.

El componente sanguíneo “plasma rico en plaquetas” (PRP) se prepara mediante centrifugación o un procedimiento de aféresis a partir de una unidad de sangre fresca (donada).

Además de prepararse a partir de una unidad estándar de sangre total, los componentes sanguíneos pueden obtenerse mediante un procedimiento de aféresis. La aféresis se realiza utilizando un aparato/máquina de aféresis, que es un dispositivo semiautomatizado que separa la sangre. En este procedimiento, si se planea utilizar plasma para una donación, la sangre total anticoagulada del donante se hace pasar por un aparato en el que la sangre se separa en hematíes, plasma y una fracción de leucocitos/plaquetas, que se devuelven al sujeto. Únicamente el plasma separado no se devuelve al sujeto, sino que se utiliza posteriormente para la donación.

Existen distintos instrumentos semiautomatizados de separación de células sanguíneas para la recogida de plaquetas, granulocitos, células madre sanguíneas, células mononucleares y plasma. Todos ellos utilizan la centrifugación para separar los componentes sanguíneos. Algunos procedimientos de aféresis implican dos venopunciones con flujo continuo de sangre del donante a través del separador de células sanguíneas; otros pueden realizarse con una única venopunción y extracción y retorno intermitente de sangre.

En algunas otras realizaciones concretas, el método de la materia tratada en la presente descripción puede utilizarse para la depleción de la proteína fibrinolítica que puede ser al menos una de las siguientes: plasminógeno y activador tisular del plasminógeno (tPA).

Más concretamente, **el plasminógeno**, (también conocido como PLG, Enzima de entrada EC:3.4.21.7), tal y como se utiliza en la presente memoria, es el principal componente del sistema fibrinolítico y se sintetiza principalmente en el hígado. En los seres humanos existen dos glicoformas principales de plasminógeno: el plasminógeno tipo I, que contiene dos elementos de glucosilación (N-ligado a N289 y O-ligado a T346), mientras que el plasminógeno tipo II sólo contiene un azúcar O-ligado (O-ligado a T346). El plasminógeno tipo II se recolecta preferentemente en la superficie celular en lugar de la glicoforma tipo I. En cambio, el plasminógeno tipo I parece recolectarse con mayor facilidad en los coágulos sanguíneos. En la circulación, el plasminógeno adopta una conformación cerrada, resistente a la activación. Al unirse a los coágulos o a la superficie celular, el plasminógeno adopta una forma abierta que puede convertirse en plasmina activa mediante diversas enzimas, como el activador del plasminógeno tisular (tPA), el activador del plasminógeno uroquinasa (uPA), la calicreína y el factor XII (factor Hageman). Más concretamente, la escisión (activación) del plasminógeno en un único enlace peptídico Arg-Val en la posición 560-561, da lugar a la serina proteasa activa, la plasmina, que a su vez disuelve el coágulo de fibrina.

El plasminógeno se compone de siete dominios. Además de un dominio C-terminal de serina proteasa similar a la quimotripsina, el plasminógeno contiene un dominio N-terminal Pan Apple (PAP) junto con cinco dominios Kringle (KR1-5). El dominio Pan-Apple contiene una serie de características importantes para mantener el plasminógeno en forma cerrada, y los dominios Kringle son responsables de la unión a los residuos de lisina presentes en receptores y sustratos.

En algunas realizaciones, el plasminógeno al que se refiere la materia tratada en la presente descripción puede ser el plasminógeno humano. En dichas realizaciones, el gen del plasminógeno (GenBank: AY192161.1 mapeado en cr6q26) comprende aproximadamente 52,5 kb de ADN y contiene 19 exones (OMIM num173350). Cabe señalar que en algunas realizaciones, el plasminógeno tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere al plasminógeno humano que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico que comprende con la secuencia mencionada por SEQ ID NO. 1. En algunas otras realizaciones, el plasminógeno humano puede comprender una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de homología con la secuencia mencionada por SEQ ID NO. 1. En otras realizaciones, dicha molécula de plasminógeno humano puede comprender la secuencia de aminoácidos mencionada por SEQ ID NO. 2. En otras realizaciones, dicha molécula de plasminógeno humano puede comprender una secuencia de

aminoácidos que tenga al menos aprox. 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de homología con la secuencia mencionada por SEQ ID NO. 2.

Un “fluido corporal deplecionado en plasminógeno” o “fluido corporal libre de plasminógeno” tal y como se usa en la presente memoria, significa que los productos de la materia tratada en la presente descripción (que según algunas realizaciones, han sido preparados tratando fluidos corporales como sangre, plasma o productos sanguíneos con agentes de unión a proteínas fibrinolíticas, concretamente, agentes de unión a plasminógeno), muestran una cantidad reducida, disminuida, atenuada, de plasminógeno en aproximadamente 100 % a 50 %, en comparación con la sangre o producto sanguíneo no tratado. Más específicamente, al menos aproximadamente un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % del plasminógeno normalmente presente en el fluido corporal, específicamente, en la sangre o los productos sanguíneos, se elimina de los productos de la materia tratada en la presente descripción, específicamente cuando se compara con la sangre o los productos sanguíneos no tratados. En otras palabras, el producto de la materia tratada en la presente descripción puede comprender plasminógeno en una cantidad de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 50 % de la cantidad de plasminógeno en otros productos o sangre o productos sanguíneos no tratados. Concretamente, alrededor del 0,01 % o menos, 0,05 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, el 60 %, el 70 % o menos de la cantidad de plasminógeno en comparación con la sangre o los productos sanguíneos no tratados.

El plasminógeno, cuando se activa para formar la enzima plasmina activa, muestra actividad proteolítica, específicamente, escisión o descomposición de proteínas en polipéptidos o aminoácidos más pequeños. A este respecto, el fluido corporal tratado mediante los métodos de la materia tratada en la presente descripción carece de actividad proteolítica de plasminógeno o plasmina. En algunas realizaciones específicas, la actividad proteolítica de la plasmina y el plasminógeno implica la escisión de la fibrina, disolviendo de esta forma los coágulos de fibrina. Cabe destacar que el término “desprovisto de actividad de plasmina y plasminógeno” significa que el fluido corporal tratado por el método de la materia tratada en la presente descripción carece completamente o al menos muestra una actividad proteolítica “reducida”, “disminuida”, “moderada”, “inhibida” o “atenuada” de plasmina y plasminógeno en un porcentaje de aproximadamente 1 % a 99,9 %, específicamente, entre el aprox. 1 % y el aprox. 5 %, entre el aprox. 5 % y el 10 %, entre el aprox. 10 % y el 15 %, entre el aprox. 15 % y el 20 %, entre el aprox. 20 % y el 25 %, entre el aprox. 25 % y el 30 %, entre el aprox. 30 % y el 35 %, entre el aprox. 35 % y el 40 %, entre el aprox. 40 % y el 45 %, entre el aprox. 45 % y el 50 %, entre el aprox. 50 % y el 55 %, entre el aprox. 55 % y el 60 %, entre el aprox. 60 % y el 65 %, entre el aprox. 65 % y el 70 %, entre el aprox. 75 % y el 80 %, entre el aprox. 80 % y el 85 %, entre el aprox. 85 % y el 90 %, entre el aprox. 90 % y el 95 %, entre el aprox. 95 % y el 99 %, o entre el aprox. 99 % y el 99,9 %, o incluso el 100 % en comparación con la actividad proteolítica de la plasmina o el plasminógeno activos en un fluido corporal como la sangre, el plasma o un hemoderivado, en concreto, la sangre o el hemoderivado no tratados.

Además, en algunas realizaciones, el fluido corporal tratado mediante los métodos de la materia tratada en la presente descripción carece de tPA. La depleción del tPA utilizando los métodos, conjugados y dispositivo de la materia tratada en la presente descripción se ha demostrado claramente en la Figura 9.

Cabe destacar que el término **tPA** utilizado en la presente memoria para el activador tisular del plasminógeno (también conocido como PLAT; entrada enzimática EC 3.4.21.68,) se refiere a una serina proteasa secretada que convierte y activa la proenzima plasminógeno en una potente enzima fibrinolítica plasmina. El tPA se sintetiza en las células endoteliales vasculares como una única cadena polipeptídica que se somete a un corte proteolítico por plasmina o tripsina en un enlace arginina-isoleucina situado en el centro, lo que da lugar a una forma de 2 cadenas unidas por disulfuro compuesta por la cadena pesada derivada N-terminal y la cadena ligera C-terminal. El gen tPA (ADN acc NT\_167187.1 mapeado en chr. 8p11.21) contiene 14 exones que codifican el dominio de la cadena pesada incluyendo dos regiones Kringle (K1 y K2) y regiones homólogas a factores de crecimiento y el dominio de la cadena ligera que comprende el sitio catalítico de la serina proteasa. El empalme alternativo del gen tPA da lugar a múltiples variantes de transcripción que codifican diferentes isoformas que intervienen en múltiples procesos biológicos, aparte de la fibrinólisis, como la migración celular y la remodelación tisular. El aumento de la actividad del tPA causa hiperfibrinólisis que se manifiesta como hemorragia excesiva, mientras que su disminución conduce a hipofibrinólisis que puede dar lugar a trombosis o embolia. Los fenotipos relacionados con el tPA incluyen la hiperfibrinólisis familiar (debida al aumento de la liberación de tPA) y la trombofilia familiar (debida a la disminución de la liberación de tPA (OMIM nº. 612348)). Cabe señalar que en algunas realizaciones, el tPA, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere al tPA humano que comprenden la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia mencionada por SEQ ID NO. 3. En algunas otras realizaciones, el tPA humano puede comprender una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de homología con la secuencia mencionada por SEQ ID NO. 3. En otras realizaciones, dicha molécula de tPA humano puede comprender la secuencia de aminoácidos mencionada por SEQ ID NO. 4. En otras realizaciones, el tPA humano puede comprender una secuencia de aminoácidos que tenga al menos aprox. 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de homología con la secuencia mencionada por SEQ ID NO. 4.

Un “fluido corporal bajo en tPA” o “fluido corporal libre de tPA”, tal y como se utiliza en la presente memoria, significa que el fluido corporal tratado por los métodos de la materia tratada en la presente descripción (que según algunas realizaciones, se han preparado tratando fluidos corporales como sangre, plasma o productos sanguíneos con los conjugados de la materia tratada en la presente descripción), muestran una cantidad reducida, disminuida, atenuada, de tPA normalmente presente en aproximadamente el 100 % al 50 %, en comparación con la sangre o el producto sanguíneo no tratado. Más concretamente, al menos aproximadamente un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % del tPA se elimina del fluido corporal, concretamente cuando se compara con la sangre, el plasma o los hemoderivados no tratados. En otras palabras, el fluido corporal tratado por los métodos de la materia tratada en la presente descripción puede comprender tPA en una cantidad de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 50 % de la cantidad de tPA en otros productos o en sangre o productos sanguíneos no tratados. Concretamente, alrededor del 0,01 % o menos, 0,05 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 % o menos, incluso 60 % o 70 % de la cantidad de tPA en comparación con el fluido corporal no tratado, como sangre, plasma o productos sanguíneos.

En algunas otras realizaciones, los fluidos corporales o, concretamente, la sangre, el plasma o los productos derivados de la sangre preparados por los métodos de la materia tratada en la presente descripción pueden estar desprovistos de plasminógeno y tPA, y como tales, desprovistos de cualquier actividad fibrinolítica como se ha mencionado anteriormente. En algunas otras realizaciones, el fluido corporal o producto preparado por los métodos de la materia tratada en la presente descripción puede estar también desprovisto de cualquier otro agente fibrinolítico, p. ej., uroquinasa (uPA). Además, debe entenderse que, en algunas realizaciones, pueden agregarse agentes antifibrinolíticos adicionales al producto fluido corporal preparado por los métodos de la materia tratada en la presente descripción.

En algunas realizaciones opcionales, el método puede comprender además el paso de medir la cantidad de plasminógeno en el fluido corporal deplecionado en proteínas fibrinolíticas resultado del paso (ii), determinando al menos uno de los tiempos de coagulación y de lisis total del coágulo en dicho fluido corporal deplecionado en proteínas fibrinolíticas.

En algunas realizaciones, el método de la materia tratada en la presente descripción puede utilizarse en la preparación de al menos un producto sanguíneo y/o derivado de la sangre que tenga una actividad fibrinolítica reducida.

La actividad fibrinolítica, tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la capacidad de algunas enzimas proteolíticas de la sangre y de los productos derivados de la sangre para disolver la fibrina y los coágulos sanguíneos. La principal enzima proteolítica que disuelve la fibrina es la plasmina. La plasmina se forma mediante la activación del plasminógeno por parte del tPA y/o el uPA. Cuando la plasmina descompone la fibrina, se forman productos de degradación de la fibrina (PDF). Los PDF compiten con la trombina y ralentizan la formación de coágulos al impedir la conversión de fibrinógeno en fibrina. Este efecto puede observarse en la prueba del tiempo de coagulación de la trombina (TCT), que es más prolongado en personas con una fibrinólisis activa. Los PDFs, y más concretamente, el dímero D, pueden medirse utilizando la tecnología anticuerpo-antígeno. Es más específico que el TCT y confirma si se ha producido fibrinólisis. Por lo tanto, se utiliza para indicar una trombosis venosa profunda, una embolia pulmonar, una CID y la eficacia del tratamiento en el infarto agudo de miocardio. Como alternativa, es posible una detección más rápida de la actividad fibrinolítica, especialmente de la hiperfibrinólisis, con la tromboelastometría (TEM) en sangre total, incluso en pacientes en tratamiento con heparina. En este ensayo, el aumento de la fibrinólisis se evalúa comparando el perfil de TEM en ausencia o presencia del inhibidor de la fibrinólisis aptrotinina. Además, la fibrinólisis total puede medirse mediante una prueba de tiempo de lisis de euglobulina (ELT). El ELT mide la fibrinólisis coagulando la fracción de euglobulina (principalmente los importantes factores fibrinolíticos fibrinógeno, PAI-1, tPA, , alfa-2-antiplasmina, y plasminógeno) del plasma y observando a continuación el tiempo necesario para la disolución del coágulo. Un tiempo de lisis reducido indica un estado hiperfibrinolítico y riesgo de hemorragia.

Como se ha indicado anteriormente, el fluido corporal, la sangre, el plasma o los productos sanguíneos tratados por los métodos de la materia tratada en la presente descripción muestran una actividad fibrinolítica reducida o disminuida. Cabe destacar que los términos “reducido”, “disminuido”, “moderado”, “inhibido” o “atenuado” a los que se hace referencia en la presente memoria, se refieren a la retardación, contención, disminución o reducción de un proceso, específicamente, de la actividad fibrinolítica, en uno de los porcentajes aproximados de 1 % a 99,9 %, específicamente, entre el aprox. 1 % y el aprox. 5 %, entre el aprox. 5 % y el 10 %, entre el aprox. 10 % y el 15 %, entre el aprox. 15 % y el 20 %, entre el aprox. 20 % y el 25 %, entre el aprox. 25 % y el 30 %, entre el aprox. 30 % y el 35 %, entre el aprox. 35 % y el 40 %, entre el aprox. 40 % y el 45 %, entre el aprox. 45 % y el 50 %, entre el aprox. 50 % y el 55 %, entre el aprox. 55 % y el 60 %, entre el aprox. 60 % y el 65 %, entre el aprox. 65 % y el 70 %, entre el aprox. 75 % y el 80 %, entre el aprox. 80 % y el 85 %, entre el aprox. 85 % y el 90 %, entre el aprox. 90 % y el 95 %, entre el aprox. 95 % y el 99 %, o entre el aprox. 99 % y el 99,9 %, o incluso el 100 % en comparación con fluidos corporales como la sangre, el plasma o productos sanguíneos que incluyen tPA y/o plasminógeno, con sangre o productos sanguíneos que no fueron tratados con los conjugados de la materia tratada en la presente descripción, con sangre o productos sanguíneos comunes o con productos sanguíneos disponibles comercialmente. En otras palabras, estos productos no muestran actividad fibrinolítica, o como mucho, una actividad fibrinolítica mínima y reducida, específicamente, alrededor del 0,01 % o menos, 0,05 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 % o menos de la actividad fibrinolítica en comparación con la



actividad fibrinolítica de una sangre o producto sanguíneo no tratado. En algunas realizaciones, el fluido corporal, la sangre, el plasma o los hemoderivados tratados mediante los métodos, conjugados, composiciones, así como el dispositivo, la batería, los kits o los sistemas proporcionados por la materia tratada en la presente descripción, que muestran una actividad fibrinolítica reducida o nula, tal como se ha definido anteriormente, pueden utilizarse para cualquier aplicación terapéutica divulgada por la materia tratada en la presente descripción, tal como se expone a continuación.

En algunas otras realizaciones concretas, el método de la materia tratada en la presente descripción puede utilizarse in vivo/ex vivo para deplecionar al menos una proteína fibrinolítica en fluidos corporales de y/o en un sujeto que lo necesite.

Por lo tanto, en otro aspecto de la misma, la materia tratada en la presente descripción proporciona un método para deplecionar al menos una proteína fibrinolítica del (de los) fluido(s) corporal(es) de un sujeto que lo necesite mediante un procedimiento extracorpóreo. Más concretamente, el método comprende los siguientes pasos:

En el primer paso (i), se transfieren los fluidos corporales de dicho sujeto a un aparato extracorpóreo; En algunas realizaciones, el dispositivo, la batería, los kits o los sistemas proporcionados por la materia tratada en la presente descripción pueden considerarse como dichos aparatos extracorpóreos.

El segundo paso (ii) consiste en someter el fluido corporal a un procedimiento de depleción por afinidad concreto para al menos una o varias proteínas fibrinolíticas. Cabe señalar que dicha depleción puede realizarse antes, durante o después de que la sangre se transfiera dentro y fuera de dicho aparato. De este modo, se obtiene fluido corporal extracorpóreo del sujeto. Este fluido corporal extracorpóreo está deplecionado en al menos una proteína fibrinolítica.

El siguiente paso (iii) consiste en devolver o reintroducir en el sujeto el fluido corporal deplecionado en al menos una de las proteínas fibrinolíticas obtenidas en el paso (ii).

Cabe destacar que el procedimiento de depleción por afinidad comprende el contacto, específicamente, ex vivo, del fluido corporal del sujeto con una cantidad eficaz de una variedad de conjugados o cualquier composición de los mismos. No sólo eso, los conjugados de la materia tratada en la presente descripción o cualesquiera composiciones de los mismos, pueden estar comprendidos dentro de dicho aparato extracorpóreo, o dentro de un dispositivo, batería, kit o sistema conectado a dicho aparato extracorpóreo, según se define en la materia tratada en la presente descripción. Como se ha indicado anteriormente, cada conjugado descrito en la presente memoria puede comprender, en algunas realizaciones, al menos una partícula, al menos un enlace y al menos un aminoácido, un derivado del mismo o un análogo del mismo. En algunas otras realizaciones, la variedad de conjugados comprende al menos dos conjugados diferentes. En algunas otras realizaciones, el aminoácido, un derivado del mismo o un análogo del mismo puede ser al menos uno de los siguientes: ácido 4-(aminometil)-ciclohexano-carboxílico (ácido tranexámico), ácido  $\epsilon$ -amino caproico, lisina, ácido ciclohexanocarboxílico y ácido 4-metil-ciclohexanocarboxílico. En algunas otras realizaciones, el aminoácido, derivado del mismo o análogo del mismo es al menos uno de los siguientes: ácido 4-(aminometil)-ciclohexano-carboxílico (ácido tranexámico), ácido  $\epsilon$ -amino caproico y lisina. En algunas realizaciones, el aminoácido, un derivado del mismo o un análogo del mismo puede ser ácido tranexámico (TXA).

En algunas realizaciones, el aparato extracorpóreo es una máquina de bypass cardiopulmonar (CEC) y donde el aparato extracorpóreo es una máquina de plasmáféresis.

El término “**extracorpóreo**” se refiere a un procedimiento médico que se realiza fuera del cuerpo. Por ejemplo, dicho procedimiento extracorpóreo puede referirse a un procedimiento circulatorio, es decir, un procedimiento en el que se extrae sangre de la circulación de un paciente para aplicarle un proceso antes de devolverla a la circulación. Cualquier aparato que transporta la sangre fuera del cuerpo se denomina circuito extracorpóreo. Estos procedimientos circulatorios incluyen, entre otros, la aféresis, la autotransfusión, la hemodiálisis, la hemofiltración, la plasmáféresis, la extracción extracorpórea de dióxido de carbono, la reanimación cardiopulmonar extracorpórea, la oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO) y el bypass cardiopulmonar durante la cirugía a corazón abierto.

La **circulación extracorpórea** (CEC) es una técnica que asume temporalmente la función del corazón y los pulmones durante una intervención quirúrgica, manteniendo la circulación de la sangre y el contenido de oxígeno del cuerpo del paciente. La bomba de circulación extracorpórea suele denominarse máquina de circulación extracorpórea o “bomba”. Las bombas de circulación extracorpórea las controlan los perfusionistas. La CEC es una forma de circulación extracorpórea. La oxigenación mediante membrana extracorpórea suele utilizarse para tratamientos a largo plazo.

Una **máquina de aféresis** es un aparato que recibe la sangre extraída del cuerpo de un paciente o donante y la separa en sus distintos componentes: plasma, plaquetas, glóbulos blancos y glóbulos rojos.

Cabe señalar que en algunas realizaciones, las partículas conjugadas útiles en los métodos de la materia tratada en la presente descripción pueden ser como se definen en la materia tratada en la presente descripción. En algunas otras realizaciones, el método de la materia tratada en la presente descripción puede utilizar el dispositivo, batería, kit o sistema definido anteriormente.

En algunas realizaciones, los métodos de la materia tratada en la presente descripción pueden ser aplicables para deplecionar al menos una proteína fibrinolítica del fluido corporal que puede ser al menos uno de sangre total, plasma o producto derivado de la sangre que comprende al menos un factor de coagulación.

En algunas realizaciones concretas, dicho producto derivado de la sangre puede ser al menos uno de los siguientes: sangre total, plasma, plasma fresco congelado (PFC), plasma rico en plaquetas (PRP) y crioprecipitado.

En algunas otras realizaciones concretas, el método de la materia tratada en la presente descripción puede utilizarse para la depleción de la proteína fibrinolítica que puede ser al menos un plasminógeno y un tPA. En algunas realizaciones concretas, los métodos de la materia tratada en la presente descripción pueden utilizarse para la depleción del tPA. En algunas otras realizaciones, los métodos de la materia tratada en la presente descripción pueden utilizarse para la depleción del plasminógeno. Aún más, en ciertas realizaciones, los métodos de la materia tratada en la presente descripción pueden utilizarse para la depleción del plasminógeno y el tPA.

En alguna otra realización, el método puede comprender además el paso de recuperar al menos uno de los plasminógenos y tPA a partir de los conjugados de la materia tratada en la presente descripción, la variedad de conjugados o cualquier composición de los mismos, o concretamente, las partículas conjugadas de TXA.

Debe considerarse que las proteínas fibrinolíticas deplecionadas extraídas de los fluidos corporales por los métodos de la materia tratada en la presente descripción, pueden utilizarse para otros fines. En algunas realizaciones concretas, la recuperación del plasminógeno y/o tPA del aparato o conjugado de la materia tratada en la presente descripción puede realizarse aplicando sobre dicho aparato, una cantidad eficaz de los conjugados, composiciones de los mismos o específicamente, TXA, derivados de los mismos o cualquier análogo de los mismos sobre las composiciones, conjugados o concretamente, partículas conjugadas de TXA unidas a dicho plasminógeno y/o tPA. En otras realizaciones, el plasminógeno recuperado puede utilizarse para tratar a dicho sujeto en aquellos casos en los que se requiera fibrinólisis.

Aún más, debe entenderse que la presente descripción proporciona además un aparato extracorpóreo para su uso en un método para deplecionar al menos una proteína fibrinolítica del (de los) fluido(s) corporal(es) de un sujeto que lo necesite mediante un procedimiento extracorpóreo. Más concretamente, el método comprende los siguientes pasos de: En el primer paso (i), se transfieren los fluidos corporales dentro de dicho sujeto. En algunas realizaciones, el dispositivo, la batería, los kits o los sistemas proporcionados por la materia tratada en la presente descripción pueden considerarse como dichos aparatos extracorpóreos. El segundo paso (ii) consiste en someter el fluido corporal a un procedimiento de depleción por afinidad concreto para al menos una o varias proteínas fibrinolíticas. Cabe señalar que dicha depleción puede realizarse antes, durante o después de que la sangre se transfiera dentro y fuera de dicho aparato. De este modo, se obtiene fluido corporal extracorpóreo del sujeto. Este fluido corporal extracorpóreo está deplecionado en al menos una proteína fibrinolítica. El siguiente paso (iii) consiste en devolver o reintroducir en el sujeto el fluido corporal deplecionado en al menos una de las proteínas fibrinolíticas obtenidas en el paso (ii).

En otro aspecto más, la materia tratada en la presente descripción proporciona un método para el tratamiento, prevención, profilaxis, mejora, inhibición de hemorragias, trastornos hemostáticos y cualquier hemorragia o condición patológica asociada a los mismos en un sujeto que lo necesite. Más concretamente, el método puede comprender el paso de administrar al sujeto tratado una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un producto sanguíneo y/o derivado de la sangre que tenga una actividad fibrinolítica reducida. En algunas realizaciones, el producto puede prepararse mediante el método descrito en la presente memoria.

En algunas realizaciones, el método de la materia tratada en la presente descripción puede aplicarse a trastornos hemostáticos que pueden ser hereditarios o adquiridos.

Los trastornos hemostáticos son trastornos de la coagulación clasificados como hereditarios o adquiridos. Los trastornos hemorrágicos adquiridos son aquellos en los que la hemorragia es inducida por una causa externa (adquirida), como un traumatismo, una intervención quirúrgica o un tratamiento fibrinolítico, tal y como se aclarará más adelante.

Los trastornos hemorrágicos causados por deficiencias hereditarias de uno o más factores de coagulación son trastornos poco frecuentes que se encuentran por todo el mundo. Los homocigotos o heterocigotos compuestos para los genes mutantes responsables de dichos defectos presentan manifestaciones hemorrágicas de gravedad variable y normalmente relacionadas con el grado de disminución de la actividad de un factor de coagulación adecuado.

En otras realizaciones, los métodos de la materia tratada en la presente descripción son aplicables para el tratamiento, la profilaxis, la mejora, la inhibición o el retraso de la hemorragia asociada con el trastorno hemostático hereditario y la tendencia hemorrágica indefinida.

“Trastorno hemostático hereditario”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una deficiencia hereditaria de al menos un factor de coagulación. Más concretamente, se han identificado numerosas mutaciones en los genes

que codifican los factores de coagulación I, II, V, VII, X y XI, que conducen a la deficiencia de al menos uno de dichos factores o a la alteración de su actividad. Los homocigotos de estas mutaciones presentan tendencia a la hemorragia de forma espontánea o tras un traumatismo o una intervención quirúrgica. Los heterocigotos de las diversas deficiencias rara vez muestran tendencia a las hemorragias.

5 La tendencia indefinida a la hemorragia, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una condición de tendencia a la hemorragia mientras no se pueda establecer un diagnóstico preciso de dicha condición.

10 Algunos pacientes sometidos a una evaluación de síntomas hemorrágicos leves muestran una tendencia hemorrágica no diagnosticada que puede no haber sido reconocida hasta que se produce un acontecimiento grave que induce a la hemorragia, como la cirugía o el parto. La variabilidad clínica con respecto a las manifestaciones hemorrágicas es común entre dichos individuos, lo que sugiere que los factores ambientales y otros factores genéticos pueden mejorar los riesgos de hemorragia. Aunque los problemas hemorrágicos leves pueden no hacerse evidentes hasta la exposición a eventos hemostáticos importantes (como cirugía, extracciones dentales, traumatismos importantes, menarquia o parto), no se ha establecido el riesgo predictivo de hemorragia tras una intervención quirúrgica en estos individuos. El sexo influye en las manifestaciones de la hemorragia. Las mujeres suelen ser sometidas a una evaluación debido a hemorragias molestas durante la menstruación y/o el parto. Además, las hemorragias persistentes o que se vuelven problemáticas 24 horas o más después de una extracción dental plantean la posibilidad de un trastorno hemorrágico. En la práctica, no suele establecerse un diagnóstico en un paciente con hemorragia mucocutánea leve.

20 Las pruebas comunes de laboratorio suponen un sello distintivo para el diagnóstico de la tendencia hemorrágica indefinida. No establecer su diagnóstico puede suponer un problema para la paciente que deba someterse a una intervención quirúrgica o a un parto.

25 Para los síntomas hemorrágicos leves de pacientes con trastornos hemorrágicos no definidos, puede utilizarse un tratamiento inhibidor fibrinolítico con ácido  $\epsilon$ -aminocaproico o ácido tranexámico para cirugías dentales y orales. También pueden utilizarse otros procedimientos quirúrgicos para reducir las hemorragias. Sin embargo, en caso de hemorragia grave, por ejemplo durante la cirugía o el parto, se requiere sangre o componentes derivados de la sangre.

30 En realizaciones más concretas, el trastorno hemostático hereditario puede ser un trastorno resultante de al menos una deficiencia en al menos un factor de coagulación y una tendencia indefinida a la hemorragia.

35 En otras realizaciones, la deficiencia en al menos un factor de coagulación puede suponer la deficiencia en al menos uno de los factores XI, X, V, VII, II (protrombina) y I (fibrinógeno). Así pues, en algunas realizaciones, los métodos descritos en la materia tratada en la presente descripción pueden aplicarse a cualquier forma de hemorragia que acompañe a trastornos hemostáticos hereditarios causados por una deficiencia de al menos uno de los factores XI, X, V, VII, II (protrombina) y I (fibrinógeno) descritos en la presente memoria.

40 En otras realizaciones, los métodos de la materia tratada en la presente descripción pueden aplicarse para tratar trastornos caracterizados por deficiencias hereditarias de los factores de coagulación I, II, V, VII, X y XI que incluyen al menos una o cualquier tendencia hemorrágica asociada a los mismos.

45 Las deficiencias hereditarias de los factores de coagulación I, II, V, VII, X y XI son trastornos hemorrágicos autosómicos recesivos que se han descrito en la mayoría de las poblaciones. Su frecuencia relativa varía de una población a otra, a veces como resultado de la gran cantidad de genes mutantes específicos en poblaciones endogámicas. Distintos estudios de población indican que entre estos trastornos hemorrágicos son comunes la deficiencia de los factores XI y VII, los trastornos menos comunes son la deficiencia de los factores V y X y la afibrinogenemia, y los trastornos más raros son la deficiencia del factor II (protrombina) y del factor XIII. La gravedad de las manifestaciones hemorrágicas en los pacientes afectados que son homocigotos o heterocigotos compuestos para un gen mutante es variable y suele relacionarse con el grado de la deficiencia. Algunos pacientes sólo presentan hematomas leves o muestran hemorragias excesivas únicamente tras sufrir un traumatismo. Otros pacientes, normalmente con menos del 1 por ciento de actividad normal del factor VII, XIII o X, pueden presentar hemorragias intracraneales y hemartrosis similares a las de pacientes con hemofilias graves.

55 En algunas realizaciones específicas, el método de la materia tratada en la presente descripción puede ser aplicable para tratar, prevenir, reducir, atenuar o inhibir hemorragias asociadas con la deficiencia hereditaria del factor XI, o cualquier hemorragia adquirida o afección hemostática en pacientes que sufren de deficiencia del factor IX.

60 La deficiencia hereditaria del factor XI se transmite como rasgo autosómico recesivo. El trastorno se manifiesta en homocigotos o heterocigotos compuestos como una tendencia hemorrágica de leve a moderada relacionada principalmente con lesiones. Se han descrito sujetos afectados en la mayoría de las poblaciones, aunque en los judíos, sobre todo en los de origen asquenazí, el trastorno es más frecuente.

65 La deficiencia del factor XI como resultado de una proteína disfuncional es rara y la mayoría de los pacientes poseen un nivel de proteína de factor XI disminuido. En total, se han descrito más de 150 mutaciones en pacientes judíos y no judíos de diversos orígenes, la mayoría de las cuales son mutaciones con cambio de sentido.

La mayoría de las manifestaciones hemorrágicas en homocigotos y heterocigotos compuestos están relacionadas con lesiones. La hemorragia excesiva puede producirse en el momento de la lesión o comenzar varias horas o días después del traumatismo. La tendencia hemorrágica varía en función del evento hemostático y de los lugares de la lesión. Los procedimientos quirúrgicos que afectan a tejidos con alta actividad fibrinolítica (tracto urinario, amígdalas, nariz, alveolos dentales) se asocian con frecuencia a hemorragias excesivas en pacientes con deficiencia grave del factor XI, independientemente del genotipo. En este momento, la tendencia hemorrágica relacionada con el lugar puede entenderse a la luz de la función demostrada del factor XI en la prevención de la lisis del coágulo. La deficiencia del factor XI se asocia por sí misma a un aumento de la fibrinólisis, por lo que el riesgo hemorrágico adicional de la cirugía en lugares ricos en fibrinólisis en estos pacientes puede aumentar aún más la tendencia hemorrágica.

El actual tratamiento de los pacientes hemorrágicos con deficiencia de factor XI se basa en el PFC. Los pacientes con deficiencia grave del factor XI que deben someterse a una intervención quirúrgica deben evaluarse cuidadosamente y prepararse meticulosamente para la operación. Debe considerarse el uso de un agente antifibrinolítico en pacientes sometidos a una operación en un lugar con alta actividad fibrinolítica local. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el tPA y/o el PFC deplecionado en plasminógeno proporcionado por la materia tratada en la presente descripción puede ser particularmente relevante para tratar a pacientes con deficiencia del Factor XI. Más concretamente, un sujeto que posee cualquiera de las características descritas anteriormente.

En otras realizaciones, el método de la materia tratada en la presente descripción puede ser aplicable para tratar, prevenir, reducir, atenuar, inhibir hemorragias asociadas con la deficiencia hereditaria del factor VII, o cualquier hemorragia adquirida o afección hemostática en pacientes que sufren de deficiencia del factor VII.

La deficiencia hereditaria del factor VII es un trastorno autosómico recesivo poco frecuente que se ha observado en la mayoría de las poblaciones. Permite un sencillo diagnóstico presuntivo ya que la deficiencia del factor VII es el único trastorno de la coagulación que conlleva un tiempo de protrombina (TP) prolongado. La mayoría de las mutaciones causantes de la deficiencia del factor VII son mutaciones con cambio de sentido.

Las manifestaciones hemorrágicas se dan en homocigotos y en heterocigotos compuestos con deficiencia del factor VII. Los pacientes con una actividad del factor VII inferior al 1 % de lo normal suelen presentar manifestaciones hemorrágicas graves, como hemartrosis que provoca artropatía grave y hemorragia intracerebral potencialmente mortal.

Los pacientes con niveles ligeramente superiores del factor VII (actividad del factor VII igual o superior al 5 % de lo normal) presentan una enfermedad mucho más leve, caracterizada por epistaxis, hemorragias gingivales, menorragia y aparición frecuente de hematomas. Algunas intervenciones quirúrgicas, como las extracciones dentales, la amigdalectomía y las intervenciones en el tracto urogenital, suelen ir acompañadas de hemorragias cuando no se ha establecido ningún tratamiento previo a la intervención. En cambio, procedimientos quirúrgicos como la laparotomía, la herniorrafia, la apendicectomía y la histerectomía no han presentado complicaciones. Esta aparente discrepancia puede explicarse por los distintos grados de fibrinólisis local que presentan los respectivos tejidos traumatizados.

El tratamiento sustitutivo con PFC es esencial en pacientes que presentan hemorragias graves, como hemartrosis o hemorragias intracerebrales. Cuando hay que someter al paciente a una intervención quirúrgica, debe tenerse en cuenta el lugar de la cirugía, ya que las extracciones dentales, la amigdalectomía, la cirugía de nariz y las intervenciones urológicas suelen asociarse con hemorragias debido a la fibrinólisis local. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el tPA y el PFC deplecionado en plasminógeno proporcionados por la materia tratada en la presente descripción pueden ser particularmente relevantes para el tratamiento de pacientes con deficiencia del Factor VII, específicamente, cualquiera de las condiciones discutidas anteriormente.

En otras realizaciones más, el método de la materia tratada en la presente descripción puede ser aplicable para tratar, prevenir, reducir, atenuar, inhibir hemorragias asociadas con la deficiencia hereditaria del factor X, o cualquier hemorragia adquirida o afección hemostática en pacientes que sufren de deficiencia del factor X.

La deficiencia hereditaria del factor X, una tendencia hemorrágica de moderada a grave, es un trastorno autosómico recesivo. Las 95 mutaciones descritas actualmente que provocan la deficiencia del factor X incluyen delecciones grandes, delecciones pequeñas con desplazamiento del marco, mutaciones sin sentido y mutaciones con cambio de sentido. Las manifestaciones clínicas de la deficiencia del factor X se relacionan con los niveles funcionales del factor X. Las personas con deficiencia grave del factor X y niveles funcionales del factor X inferiores al 1 % de lo normal sangran espontáneamente y tras un traumatismo. Las hemorragias se producen principalmente en articulaciones y tejidos blandos; aunque, las hemorragias de las mucosas, como la menorragia, pueden ser especialmente problemáticas en las mujeres. Hemorragias menos frecuentes son la hemorragia intracerebral, la hemorragia intestinal intramural (que puede producir síntomas como los de un abdomen agudo), la hemorragia del tracto urinario y la hemorragia de tejidos blandos con desarrollo de pseudoquistes hemorrágicos o pseudotumores. En las personas con deficiencias leves del factor X, las hemorragias son menos frecuentes y suelen producirse únicamente después de un traumatismo o durante o después de una intervención quirúrgica. El plasma fresco congelado se utiliza en el tratamiento de pacientes con deficiencia del factor X. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el tPA y/o el PFC

deplecionado en plasminógeno (o cualquier otro producto sanguíneo) proporcionado por la materia tratada en la presente descripción puede ser especialmente relevante para el tratamiento de pacientes con deficiencia de factor X, específicamente, pacientes que padecen cualquiera de las afecciones comentadas anteriormente.

- 5 En otras realizaciones más, la materia tratada en la presente descripción puede ser aplicable para tratar, prevenir, reducir, atenuar e inhibir hemorragias asociadas con la deficiencia hereditaria del factor V, o cualquier hemorragia adquirida o afección hemostática en pacientes que sufren de deficiencia del factor V.

10 La deficiencia hereditaria del factor V es uno de los trastornos hemorrágicos hereditarios menos frecuentes y se manifiesta en homocigotos o heterocigotos compuestos como una tendencia hemorrágica moderada. La deficiencia del factor V se hereda como un rasgo autosómico recesivo. Los heterocigotos, cuya actividad plasmática del factor V oscila entre el 25 % y el 60 % de lo normal, suelen ser asintomáticos. Se han identificado más de 80 mutaciones distintas en total, de las cuales una cuarta parte son mutaciones con cambio de sentido. Los pacientes homocigotos o heterocigotos compuestos cuyo nivel de factor V oscila entre menos del 1 y el 10 por ciento de lo normal presentan una tendencia a la hemorragia de por vida. Las manifestaciones más frecuentes son la equimosis, la epistaxis, las hemorragias gingivales, las hemorragias tras pequeñas laceraciones y la menorragia. La hemorragia posparto se produce en más del 50 % de los embarazos de pacientes con deficiencia grave del factor V. Las hemorragias en otras localizaciones son menos frecuentes. Los traumatismos, las extracciones dentales y la cirugía confieren un alto riesgo de hemorragia excesiva. En caso de que se produzca una hemorragia espontánea grave o se realice una intervención quirúrgica, debe administrarse plasma fresco congelado de reposición. Al planificar la terapia de sustitución plasmática, es importante tener en cuenta los procedimientos quirúrgicos en lugares con alta actividad fibrinolítica local, como el tracto urogenital, la cavidad oral y la nariz, ya que la cirugía en estos lugares dará lugar a una hemorragia excesiva y la hemorragia posparto es frecuente. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el tPA y los productos deplecionados en plasminógeno proporcionados por la materia tratada en la presente descripción pueden ser particularmente relevantes para el tratamiento de pacientes con deficiencia del Factor V, específicamente, cualquiera de las condiciones discutidas anteriormente.

30 En ciertas realizaciones, los métodos de la materia tratada en la presente descripción pueden ser particularmente aplicables para tratar, prevenir, reducir, atenuar, inhibir hemorragias asociadas con la deficiencia hereditaria del factor II, o cualquier hemorragia adquirida o condición hemostática en pacientes que sufren de deficiencia del factor II.

35 La deficiencia hereditaria del factor II (protrombina) es una de las deficiencias más raras del factor de coagulación. Se presenta de dos formas: tipo I, deficiencia verdadera (hipoprotrombinemia), y tipo II, en la que se produce protrombina disfuncional (disprotrombinemia). Estos trastornos autosómicos recesivos son genéticamente heterogéneos y se caracterizan por una tendencia hemorrágica de leve a moderada.

40 Las anomalías de la protrombina se heredan de forma autosómica recesiva. Entre los individuos con deficiencia del tipo I, los heterocigotos presentan niveles de protrombina que son aproximadamente el 50 % de lo normal, mientras que los homocigotos muestran niveles que suelen ser inferiores al 10 % de lo normal. Se han identificado más de cincuenta mutaciones que causan deficiencia de protrombina, la mayoría de las cuales son mutaciones con cambio de sentido.

45 Las deficiencias hereditarias de los tipos I y II se caracterizan por hemorragias mucocutáneas y de tejidos blandos de leves a moderadas que suelen correlacionarse con el grado de deficiencia funcional de protrombina. Con niveles de protrombina de aproximadamente el 1 % de lo normal, las hemorragias pueden producirse espontáneamente o tras un traumatismo. Las hemorragias quirúrgicas pueden ser significativas. Pueden producirse menorragias, epistaxis, hemorragias gingivales, hematomas fáciles y hematomas subcutáneos.

50 La terapia de sustitución en pacientes con deficiencia hereditaria de protrombina consiste en la administración de PFC. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el tPA y el PFC deplecionado en plasminógeno proporcionados por la materia tratada en la presente descripción pueden ser particularmente relevantes para el tratamiento de pacientes con deficiencia del Factor II, específicamente, cualquiera de las condiciones discutidas anteriormente.

55 En otras realizaciones más, la materia tratada en la presente descripción puede ser aplicable para tratar, prevenir, reducir, atenuar, inhibir hemorragias asociadas con una deficiencia hereditaria del fibrinógeno, o cualquier hemorragia adquirida o afección hemostática en pacientes que sufren una deficiencia hereditaria del fibrinógeno.

60 La “deficiencia de fibrinógeno (factor I)”, tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a anomalías hereditarias del fibrinógeno que comprenden la afibrinogenemia (ausencia completa del fibrinógeno), la disfibrinogenemia y la hipodisfibrinogenemia. Los trastornos hereditarios del fibrinógeno son poco frecuentes y pueden subdividirse en trastornos de tipo I y de tipo II. Los trastornos de tipo I (afibrinogenemia e hipofibrinogenemia) afectan a la cantidad de fibrinógeno en la circulación sanguínea. Los trastornos de tipo II (disfibrinogenemia e hipodisfibrinogenemia) afectan a la calidad del fibrinógeno circulante. La afibrinogenemia, la forma más grave de deficiencia de fibrinógeno, se caracteriza por una herencia autosómica recesiva y la ausencia total de fibrinógeno en el plasma.

65

La disfibrinogenemia se define por la presencia de unos niveles normales de fibrinógeno plasmático funcionalmente anormal. La hipodisfibrinogenemia se define por unos niveles bajos de una proteína disfuncional. Se trata de trastornos heterogéneos causados por numerosas mutaciones diferentes en los tres genes codificantes del fibrinógeno. Las disfibrinogenemias y las hipodisfibrinogenemias son trastornos autosómicos dominantes. La mayoría de los pacientes afectados son heterocigotos para mutaciones con cambio de sentido en la región codificante de uno de los tres genes del fibrinógeno. Dado que el hexámero de fibrinógeno secretado contiene dos copias de cada una de las tres cadenas de fibrinógeno, y la red de fibrina resultante contiene múltiples copias de la molécula, la heterocigosidad para un alelo mutante es suficiente para alterar la estructura y la función del coágulo de fibrina.

La hemorragia debida a la afibrinogenemia suele manifestarse en el periodo neonatal, con un 85 % de los casos que presentan hemorragia del cordón umbilical, aunque no es inusual que empiece a una edad más tardía. Las hemorragias pueden producirse en la piel, el tracto gastrointestinal, el tracto genitourinario o el sistema nervioso central, siendo la hemorragia intracraneal la principal causa de muerte. Existe una susceptibilidad intrigante de rotura espontánea del bazo en pacientes afibrinogénicos. Las mujeres durante el periodo de menstruación pueden experimentar menometrorragia. Además, en las mujeres afibrinogénicas es bastante habitual el aborto en el primer trimestre. Estas pacientes también pueden presentar hemorragia preparto y posparto. También se ha observado hemoperitoneo tras la rotura del cuerpo lúteo.

La terapia de sustitución con productos comerciales que contienen fibrinógeno es la única opción para el tratamiento de pacientes con deficiencia hereditaria de fibrinógeno. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los métodos de la materia tratada en la presente descripción pueden ser particularmente relevantes para el tratamiento de pacientes con deficiencia de fibrinógeno, específicamente, cualquiera de las condiciones discutidas anteriormente. Concretamente, en algunas realizaciones, el fluido corporal deplecionado en proteínas fibrinolíticas preparado mediante los conjugados y métodos de la materia tratada en la presente descripción se complementa con fibrinógeno.

A diferencia de los preparados comerciales de productos derivados de la sangre utilizados para el tratamiento de las deficiencias hereditarias de factores de coagulación, el líquido corporal deplecionado en proteínas fibrinolíticas preparado mediante los conjugados, composiciones y métodos de la materia tratada en la presente descripción tiene una ventaja sustancial, ya que además de proporcionar el factor que falta (calidad procoagulante), la eliminación de t-PA y plasminógeno de los productos les confiere cualidades antifibrinolíticas que son esenciales para prevenir la lisis adicional del coágulo en caso de hemorragia.

En algunas realizaciones, los métodos de la materia tratada en la presente descripción pueden aplicarse para tratar trastornos hemostáticos adquiridos. El trastorno hemostático adquirido puede ser al menos uno de los siguientes: hemorragia inducida por cirugía, hemorragia inducida por traumatismo, hemorragia gastrointestinal aguda, hemorragia asociada a quemaduras, accidente cerebrovascular hemorrágico, lesión pulmonar asociada a enfisema y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), hemorragia asociada al parto, coagulación intravascular diseminada (CID) y hemorragia resultante de terapia fibrinolítica o trombolítica.

En algunas realizaciones concretas, el método de la materia tratada en la presente descripción puede ser aplicable para tratar, prevenir, reducir, atenuar e inhibir hemorragias asociadas con procedimientos quirúrgicos, concretamente, procedimientos quirúrgicos menores o mayores.

Las intervenciones quirúrgicas suponen un gran desafío para el sistema hemostático, especialmente cuando la cirugía se realiza en lugares (por ejemplo, tejidos, órganos) ricos en proteínas fibrinolíticas. Incluso los pacientes sin trastornos hemorrágicos o con trastornos hemorrágicos leves o moderados pueden sangrar en exceso tras una intervención quirúrgica. Aparte de la magnitud del traumatismo quirúrgico, hay que tener en cuenta la magnitud de la actividad fibrinolítica en el lugar de la intervención.

Hay que entender que en aquellos casos en que los procedimientos quirúrgicos son electivos, esperados o no urgentes (por ejemplo, cirugía cesárea, o cualquier otra cirugía mayor que permita suficiente tiempo para los preparativos preoperatorios), los productos de la materia tratada en la presente descripción pueden utilizarse para el tratamiento preoperatorio para facilitar la prevención o reducción de la hemorragia excesiva durante la intervención quirúrgica. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la materia tratada en la presente descripción puede proporcionar un método preventivo particularmente útil para pacientes con trastornos hereditarios, pacientes que sufren de hiperfibrinólisis y/o pacientes que se espera que sean operados.

En algunas realizaciones concretas, el método de la materia tratada en la presente descripción es adecuado para tratar hemorragias inducidas por traumatismos (hemorragias traumáticas).

Cualquier tipo de lesión puede provocar una hemorragia traumática, por ejemplo, accidentes de trabajo y de tráfico, peleas o caídas. Existen diferentes tipos de heridas traumáticas que pueden causar hemorragias. En general, los traumatismos provocan daños en los vasos sanguíneos que, a su vez, hacen que la sangre fluya externamente fuera del cuerpo o internamente hacia órganos corporales como el cerebro, el pulmón, el hígado, el riñón, el bazo o hacia cavidades corporales como el tórax y el abdomen.

Junto a las medidas físicas para detener la hemorragia, se suele administrar sangre y componentes derivados de la sangre para iniciar la coagulación de la sangre, lo que acaba provocando el cese de la hemorragia.

La sangre empobrecida en tPA y/o plasminógeno y los productos derivados de la sangre de la materia tratada en la presente descripción presentan una ventaja sobre los productos comerciales derivados de la sangre, ya que proporcionan una cualidad antifibrinolítica adicional, que impide la disolución de un coágulo formado que podría ser esencial para el rápido cese de la hemorragia.

En algunas realizaciones concretas, el fluido corporal deplecionado en proteínas fibrinolíticas preparado mediante los conjugados y métodos de la materia tratada en la presente descripción puede ser adecuado para el tratamiento de hemorragias gastrointestinales agudas o crónicas.

“Hemorragia gastrointestinal (GI)”, también conocida como sangrado gastrointestinal, tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a todas las formas de sangrado en el tracto gastrointestinal, desde la boca hasta el recto. “Hemorragia gastrointestinal aguda” significa que existe una pérdida significativa de sangre en poco tiempo que provoca una pérdida aguda de sangre y un shock hemorrágico. Los síntomas pueden incluir vómitos (hematemesis) de sangre roja o negra (debido a la sangre digerida también llamada “en posos de café”), heces sanguinolentas o negras (sangre digerida denominada melena). Por el contrario, la hemorragia digestiva crónica es el sangrado de pequeñas cantidades de sangre durante un tiempo prolongado. En este caso los síntomas son los de la anemia ferropénica.

Las hemorragias digestivas suelen dividirse en dos tipos principales: hemorragias digestivas altas y hemorragias digestivas bajas. Las causas de las hemorragias digestivas altas son, entre otras, la úlcera péptica y las varices esofágicas, que pueden producirse en algunos casos por cirrosis hepática y cáncer, entre otras enfermedades. Las causas de las hemorragias digestivas bajas incluyen: hemorroides, cáncer y enfermedad inflamatoria intestinal, entre otras. Una endoscopia del tracto gastrointestinal inferior y superior puede localizar la zona de la hemorragia. El diagnóstico por imagen médica puede ser útil en aquellos casos que no están claros.

La hemorragia digestiva alta aguda es más frecuente que la hemorragia digestiva baja. Se producen entre 50 y 150 hemorragias digestivas altas por cada 100.000 adultos al año. Se calcula que las hemorragias digestivas bajas aparecen entre 20 y 30 por cada 100.000 adultos al año. En los Estados Unidos se producen unos 300.000 ingresos hospitalarios al año. El riesgo de fallecimiento por una hemorragia digestiva se sitúa entre el 5 % y el 30 %. El riesgo de hemorragia es más frecuente en varones y aumenta con la edad.

La causa más frecuente de hemorragia digestiva alta es la úlcera péptica. La inflamación esofágica y la enfermedad erosiva son las siguientes causas más frecuentes. En pacientes con cirrosis hepática, el 50-60 % de las hemorragias se deben a varices esofágicas. Aproximadamente la mitad de las personas con úlceras pépticas tienen una infección por *Helicobacter pylori*. Otras causas son las úlceras gástricas o duodenales, los desgarros de Mallory-Weiss, el cáncer y la angiodisplasia. Se ha observado que distintos medicamentos pueden provocar hemorragias digestivas altas: AINEs, inhibidores de la COX-2, ISRS, corticosteroides y anticoagulantes.

Las hemorragias digestivas bajas suelen producirse en el colon, el recto o el ano. Las causas más frecuentes de hemorragia digestiva baja son las hemorroides, el cáncer, la angiodisplasia, la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn y la fístula aortoentérica.

El objetivo inicial del tratamiento de la hemorragia gastrointestinal aguda es la reanimación, empezando por el manejo de las vías respiratorias y la reanimación con líquidos y sangre por vía intravenosa.

La colonoscopia es muy útil para el diagnóstico y el tratamiento de las hemorragias digestivas bajas. Pueden emplearse distintas técnicas, como el clipaje, la cauterización y la escleroterapia. La cirugía, aunque rara vez se utiliza para tratar las hemorragias digestivas altas, sigue siendo habitual para tratar las hemorragias digestivas bajas, consistente en cortar la parte del intestino que causa el problema. La embolización angiográfica puede utilizarse tanto para las hemorragias digestivas altas como para las bajas.

Además, los productos sanguíneos deplecionados en plasminógeno y/o tPA preparados por los métodos de la materia tratada en la presente descripción, utilizando los conjugados y aparatos de la materia tratada en la presente descripción, pueden utilizarse para tratar ictus hemorrágicos.

El “ictus hemorrágico”, tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la hemorragia que se produce directamente en el parénquima cerebral. Se cree que el mecanismo habitual es una fuga en las pequeñas arterias intracerebrales dañadas por una hipertensión crónica. Los pacientes con hemorragias intracerebrales tienen más probabilidades que los que sufren un ictus isquémico de presentar cefalea, alteraciones del estado mental, convulsiones, náuseas y vómitos y/o marcada hipertensión. Aun así, ninguno de estos síntomas distingue de forma fiable entre ictus hemorrágico e isquémico. Los síntomas específicos pueden derivarse de déficits neurológicos focales. El tipo de déficit depende de la zona del cerebro afectada. Si el hemisferio dominante está afectado (normalmente el izquierdo), puede producirse un síndrome que muestra los siguientes síntomas: hemiparesia derecha,

pérdida hemisensorial derecha, preferencia de mirada izquierda, reducción del campo visual derecho y afasia. Si es el hemisferio no dominante (normalmente el derecho), puede producirse un síndrome que muestra los siguientes síntomas: hemiparesia izquierda, pérdida hemisensorial izquierda, preferencia de mirada derecha y reducción del campo visual izquierdo.

Las imágenes cerebrales han supuesto un paso crucial en la evaluación de la sospecha de ictus hemorrágico y deben obtenerse de forma urgente. Las imágenes cerebrales ayudan a diagnosticar la hemorragia y pueden identificar complicaciones como la hemorragia intraventricular, el edema cerebral o la hidrocefalia. Dichas imágenes pueden tomarse mediante tomografía computarizada sin contraste (TCNC) o resonancia magnética (RM).

En caso de que el tratamiento con hemoderivados esté indicado para el ictus hemorrágico, se utilizan sangre, PFC y plaquetas obtenidas de un banco de sangre. Teniendo en cuenta la calidad protrombótica y antifibrinolítica del fluido corporal deplecionado en proteínas fibrinolíticas preparado mediante los conjugados y métodos de la materia tratada de la materia tratada en la presente descripción, parece que son más apropiados para detener la hemorragia en un paciente que sufre un ictus hemorrágico que los hemoderivados convencionales.

En algunas realizaciones concretas, los métodos de la materia tratada en la presente descripción pueden ser adecuados para tratar lesiones pulmonares asociadas con enfisema y EPOC. En formas de realización más específicas, el método de la materia tratada en la presente descripción puede comprender el paso de administrar al sujeto tratado una cantidad terapéuticamente eficaz de fluido corporal deplecionado en proteínas fibrinolíticas preparado por los conjugados y métodos de la materia tratada en la presente descripción, debido a su enriquecimiento en alfa-1 antitripsina, lo que hace que su uso sea más apropiado para el tratamiento de un sujeto con enfisema y EPOC. En estas enfermedades, las proteasas leucocitarias rompen la elasticidad de los pulmones, lo que provoca un llenado pulmonar y el consiguiente desarrollo de enfisema pulmonar y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Por lo tanto, la alfa-1 antitripsina dentro del fluido corporal deplecionado en proteínas fibrinolíticas preparado por los conjugados y métodos de la materia tratada en la presente descripción puede inhibir la actividad de las proteasas leucocitarias y, de este modo, restaurar la elasticidad del tejido pulmonar.

El enfisema es una forma de enfermedad pulmonar crónica (de larga duración). Los pacientes con enfisema muestran dificultades para respirar debido a una limitación para expulsar el aire. Las causas del enfisema son múltiples, aunque el tabaquismo es con mucho la más frecuente.

El enfisema es uno de los principales tipos de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Se denomina "obstructiva" porque las personas con enfisema exhalan como si algo obstruyera el flujo de aire. La otra forma de EPOC es la bronquitis crónica, que también puede estar causada por el tabaquismo.

El enfisema se produce cuando el delicado revestimiento de los alvéolos del pulmón sufre daños irreparables. En la mayoría de los casos, el daño se debe a las toxinas del humo del tabaco. Las alteraciones pulmonares del enfisema evolucionan lentamente a lo largo de los años, a medida que se destruyen los frágiles tejidos entre los alvéolos pulmonares y se forman bolsas de aire en los pulmones. El aire queda atrapado en estos espacios de tejido pulmonar dañado. Los pulmones se van agrandando lentamente y el hecho de respirar cada vez requiere más esfuerzo.

Este problema del enfisema se denomina limitación del flujo aéreo. Durante las pruebas de función pulmonar, una persona con enfisema tarda mucho más tiempo en vaciar los pulmones que una persona sin enfisema.

Junto al tabaquismo, la otra gran causa conocida de enfisema es una deficiencia de alfa-1 antitripsina. Sin embargo, se trata de una causa menor en comparación con el tabaquismo. La alfa-1 antitripsina es una proteína natural que circula en la sangre humana. Su función principal es impedir que las células blancas de la sangre dañen los tejidos normales. De este modo, el tratamiento de un sujeto con enfisema con fluido corporal deplecionado en proteínas fibrinolíticas preparado mediante los conjugados y métodos de la materia tratada en la presente descripción enriquecidos en alfa-1 antitripsina puede inhibir la actividad de las proteasas y restaurar de esta forma la elasticidad del tejido pulmonar.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es un tipo de enfermedad pulmonar obstructiva que se caracteriza por un flujo de aire deficiente a largo plazo. Los principales síntomas son la falta de aire y la disnea con producción de esputo. La EPOC suele empeorar con el tiempo. Con el tiempo, resulta difícil subir escaleras o transportar objetos. La bronquitis crónica y enfisema son términos antiguos utilizados para distintos tipos de EPOC. El término "bronquitis crónica" se sigue utilizando para definir una tos productiva que está presente durante al menos tres meses al año durante dos años.

La EPOC es un tipo de enfermedad pulmonar obstructiva en la que existe un flujo de aire deficiente crónico e incompletamente reversible (limitación del flujo de aire) y una incapacidad para espirar completamente (atrapamiento de aire). El flujo de aire deficiente es el resultado de la descomposición del tejido pulmonar (lo que se conoce como enfisema) y de la enfermedad de las vías respiratorias pequeñas (lo que se conoce como bronquiolitis obstructiva). La contribución relativa de estos dos factores depende de una persona a otra. La destrucción grave de las vías



respiratorias pequeñas puede dar lugar a la formación de grandes bolsas de aire conocidas como bullas que sustituyen al tejido pulmonar. Esta forma de enfermedad se denomina enfisema bulloso.

El tabaquismo es la causa más frecuente de EPOC, mientras que otros factores, como la contaminación atmosférica y la genética, desempeñan un papel menor. En los países en vías de desarrollo, una de las fuentes habituales de contaminación atmosférica son las calefacciones y cocinas mal ventiladas. La exposición prolongada a estos agentes irritantes provoca una respuesta inflamatoria en los pulmones que da lugar al estrechamiento de las vías respiratorias pequeñas y a la descomposición del tejido pulmonar. El diagnóstico se basa en un flujo de aire deficiente medido mediante pruebas de función pulmonar. A diferencia del asma, la reducción del flujo de aire no mejora mucho con el uso de los broncodilatadores.

Los síntomas más comunes de la EPOC son la producción de esputo, la disnea y la tos productiva. Estos síntomas están presentes durante un periodo prolongado y suelen empeorar con el tiempo. No está claro si existen distintos tipos de EPOC. Aunque anteriormente se distinguía entre enfisema y bronquitis crónica, el enfisema es sólo una descripción de los cambios pulmonares y no una enfermedad en sí, y la bronquitis crónica es simplemente un descriptor de los síntomas que pueden o no aparecer con la EPOC.

La EPOC avanzada provoca una presión elevada en las arterias pulmonares, lo que tensa el ventrículo derecho del corazón y, provoca a su vez, insuficiencia cardíaca derecha. Esta situación se conoce como *cor pulmonale*, y provoca síntomas de hinchazón de piernas y venas abultadas en el cuello. La EPOC es más frecuente que cualquier otra enfermedad pulmonar como causa de *cor pulmonale*. El *cor pulmonale* es menos frecuente desde que se utiliza oxígeno suplementario.

Como consecuencia, el fluido corporal deplecionado en proteínas fibrinolíticas preparado por los conjugados y métodos de la materia tratada en la presente descripción puede ser beneficioso como tratamiento complementario de la EPOC, ya que su enriquecimiento en alfa-1 antiplasmina puede inhibir las proteasas de los leucocitos y reparar de esta forma la calidad elástica del tejido pulmonar dañado.

Además, los productos sanguíneos deplecionados en plasminógeno y/o tPA preparados por los métodos de la materia tratada en la presente descripción, utilizando los conjugados y aparatos de la materia tratada en la presente descripción, pueden utilizarse para tratar quemaduras y cualquier hemorragia asociada a las mismas. El término “**quemadura**”, tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una lesión de los tejidos que implica daños en la piel y, posiblemente, en los tejidos subyacentes a la piel. Las quemaduras pueden estar causadas por el contacto con calor, llamas, productos químicos, electricidad o radiación.

Las quemaduras están causadas principalmente por accidentes, y pueden clasificarse en quemaduras por calor, quemaduras eléctricas, quemaduras químicas, quemaduras por radiación según sea la causa. La gravedad de una quemadura se divide en quemaduras de primer, segundo, tercer y cuarto grado según la anchura y profundidad de la quemadura, el tiempo de contacto con la temperatura de los objetos causantes de las quemaduras y las condiciones de la piel. En las quemaduras de segundo o mayor grado pueden quedar cicatrices y es necesario el tratamiento en un hospital.

Las quemaduras de primer grado provocan enrojecimiento de la piel y dolor con picor. Causan daños en la epidermis, la capa más externa de la piel, e hinchazón acompañada de dolor y enrojecimiento. Los síntomas desaparecen en unos días, pero pueden quedar exfoliaciones superficiales y pigmentación. Tras la recuperación, la cicatriz no permanece. La quemadura solar es el ejemplo más común de quemadura de primer grado.

Las quemaduras de segundo grado afectan a la epidermis y la dermis, y provocan enrojecimiento, dolor, hinchazón y ampollas en las 24 horas posteriores al accidente. Las quemaduras de segundo grado pueden afectar a las glándulas sudoríparas o a los poros. Se produce una fuerte sensación de quemazón y dolor. La rotura de las ampollas deja zonas erosionadas y libera grandes cantidades de secreción. Cuando la zona quemada es de un 15 % o más de la superficie corporal, debe prestarse una especial atención. Las quemaduras de segundo grado se curan en pocas semanas, aunque en muchos casos queda pigmentación o despigmentación. Cuando se producen infecciones secundarias, los síntomas parciales se agravan y tardan más en curarse.

Las quemaduras de tercer grado afectan a la epidermis, la dermis e incluso la grasa subcutánea, y la piel adquiere un color más oscuro o más claro, y los vasos sanguíneos situados inmediatamente debajo de la superficie cutánea se coagulan. Las regiones quemadas pueden quedar entumecidas, aunque los pacientes sienten un dolor extremadamente intenso y se produce la muerte del tejido y la estructura de la piel, lo que requiere un tratamiento muy prolongado y deja cicatrices. En las 2 semanas posteriores al accidente, las costras se desprenden y dejan al descubierto la superficie ulcerada. Se segregan grandes cantidades de fluidos y es probable que se produzcan hemorragias, aunque las quemaduras de tercer grado se curan cuando se forman gradualmente nuevos tejidos que conducen a la regeneración de la epidermis, quedando cicatriz. Cuando se desarrolla una necrosis profunda de la piel, o cuando se producen infecciones secundarias, la cicatrización se retrasa y se crea una superficie de cicatriz irregular, que da lugar a la formación de queloides o a deformación o trastornos del movimiento. Cuando la zona quemada representa el 10 % o más de la superficie corporal, se requiere una atención especial.

Las quemaduras de cuarto grado afectan a los tejidos carbonizados y oscurecidos de las regiones quemadas, y se extienden a través de la capa cutánea para lesionar la capa grasa, los ligamentos, las fascias, los músculos e incluso los tejidos óseos. Las quemaduras de cuarto grado se tratan principalmente de quemaduras eléctricas de alto voltaje y, en algunos casos, las quemaduras dérmicas profundas de 2-3 grados pueden convertirse en quemaduras de cuarto grado cuando se produce una infección vírica. Cuando la zona quemada alcanza el 20 % o más, pueden producirse reacciones en todo el cuerpo; hipotensión, shock, disfunción renal aguda debido a la pérdida excesiva de fluidos corporales, y posteriormente pueden producirse infección de la herida o neumonía, sepsis y síndrome de disfunción orgánica múltiple.

A temperaturas superiores a 44 °C (111 °F), las proteínas empiezan a perder su forma tridimensional y comienzan a descomponerse. Esto provoca daños en las células y en los tejidos. Muchos de los efectos directos sobre la salud de una quemadura son secundarios a la alteración del funcionamiento normal de la piel. Entre ellos podemos citar una alteración de la sensibilidad de la piel, la capacidad para evitar la pérdida de agua por evaporación y la capacidad para controlar la temperatura corporal. La alteración de las membranas celulares hace que las células pierdan potasio hacia el exterior y absorban agua y sodio.

En las grandes quemaduras (más del 30 % de la superficie corporal total) se produce una respuesta inflamatoria importante. El resultado es una mayor pérdida de líquido a través de los capilares y el consiguiente edema tisular. Esto provoca una **pérdida general de volumen sanguíneo**, y la sangre restante sufre una **pérdida significativa de plasma**, lo que hace que la sangre quede más concentrada. Un flujo sanguíneo deficiente a órganos como los riñones y el tracto gastrointestinal puede provocar insuficiencia renal y úlceras estomacales.

En otras realizaciones, la hemorragia inducida por la cirugía puede ser una hemorragia inducida por una cirugía menor o mayor. La cirugía mayor se define como cualquier procedimiento quirúrgico que implique anestesia o asistencia respiratoria. En caso de hemorragia durante una cirugía mayor, el tratamiento incluye la sustitución de los factores de coagulación ausentes o no funcionales por PF comerciales, PFC o crioprecipitado.

A diferencia de la cirugía mayor que, como se detalla más arriba, se refiere a cualquier procedimiento quirúrgico que implique anestesia o asistencia respiratoria, la **cirugía menor** es un procedimiento médico que implica una incisión con instrumentos, realizada para reparar un daño o detener una enfermedad en un cuerpo vivo. Dado que la cirugía menor incluye una incisión o corte, que supone una penetración o apertura con un borde afilado en cualquier parte de un cuerpo humano, en un sujeto con tendencia hemorrágica este procedimiento puede conllevar una hemorragia significativa.

Hay que tener en cuenta que en algunas realizaciones, los métodos de la materia tratada en la presente descripción pueden ser aplicables para cirugía menor que puede incluir cualquier tratamiento o procedimiento dental. El término "**tratamiento dental**" se refiere a cualquier tratamiento destinado a la prevención y/o curación de enfermedades, trastornos y condiciones de los tejidos blandos y duros de la mandíbula, la cavidad oral, el área maxilofacial y las estructuras adyacentes y asociadas del cuerpo humano. Dichos tratamientos se relacionan obviamente con la odontología, la ortodoncia, la periodoncia, la medicina oral y la cirugía oral, pero también pueden relacionarse con otras ramas de la odontología y la práctica médica que puedan estar implicadas en la salud de la cavidad oral en general.

Además, la cirugía mayor puede ser una operación a corazón abierto o un trasplante de hígado.

La cirugía mayor se define como cualquier procedimiento quirúrgico que implique anestesia o asistencia respiratoria. En caso de hemorragia durante una cirugía mayor, el tratamiento incluye la sustitución de los factores de coagulación ausentes o no funcionales por PF comerciales, PFC o crioprecipitado. Sin embargo, esto puede no ser suficiente, ya que la presencia de tPA y plasminógeno en los productos mencionados puede mediar la actividad fibrinolítica en el lugar de la lesión de la cirugía y estimular de esta forma la disolución del coágulo formado para detener o prevenir la hemorragia. Por lo tanto, la administración de los productos deplecionados en t-PA y plasminógeno de la materia tratada en la presente descripción, que muestran una actividad fibrinolítica significativamente reducida, es una opción terapéutica mejor y más eficaz que los productos comerciales, ya que además de complementar los factores de coagulación con los productos de la materia tratada en la presente descripción, su actividad antifibrinolítica (tal y como se demuestra en los Ejemplos), puede disminuir o prevenir la hemorragia provocada por la lisis del coágulo inducida por las proteínas fibrinolíticas presentes en los productos comerciales.

En especial, los métodos de la materia tratada en la presente descripción pueden aplicarse a la cirugía a corazón abierto. Algunos procedimientos quirúrgicos pueden causar hemorragias graves, como la cirugía a corazón abierto. En estas intervenciones se utiliza circulación extracorpórea (bypass cardiopulmonar - CEC).

La cirugía cardiovascular (a corazón abierto) es una intervención quirúrgica en el corazón o los grandes vasos realizada por cirujanos cardíacos. Suelen realizarse para tratar complicaciones de cardiopatías isquémicas (por ejemplo, bypass coronario), corregir cardiopatías congénitas o tratar valvulopatías por diversas causas, como endocarditis, cardiopatía reumática y aterosclerosis. Dichas intervenciones también incluyen el trasplante de corazón.

Durante una operación a corazón abierto, el corazón se detiene temporalmente. Durante una operación a corazón abierto los pacientes están conectados a un bypass cardiopulmonar, es decir, una máquina que bombea la sangre y el oxígeno por ellos. Una máquina nunca funciona igual que un corazón y unos pulmones normales, por lo que, al igual que en numerosas intervenciones quirúrgicas, el tiempo que se utiliza este aparato se reduce al mínimo. Este método artificial ofrece un bypass, cuya función es cubrir temporalmente las necesidades del paciente en cuanto a la función del corazón y los pulmones.

Los fenómenos hemorrágicos que se producen en estas operaciones se deben a la anticoagulación utilizada durante la cirugía, que, de forma deliberada, induce un déficit de coagulación. Además, la disfunción plaquetaria derivada del paso de la sangre por la circulación extracorpórea contribuye a un aumento de la tendencia al sangrado.

Hay que tener en cuenta que los métodos de la materia tratada en la presente descripción pueden aplicarse especialmente a sujetos sometidos a cirugía a corazón abierto mediante CEC. Los productos, las composiciones y los métodos de la materia tratada en la presente descripción pueden ofrecer un beneficio doble a los pacientes:

1. Durante la cirugía a corazón abierto, la sangre fluirá a través de un tubo agregado a la máquina de circulación extracorpórea (máquina CEC), tubo que se recubre con ácido tranexámico para deplecionar el t-PA y/o el plasminógeno de la sangre (tal y como se detalla en los Procedimientos Experimentales). La bomba dirigirá el flujo sanguíneo desde la máquina de CEC hacia el paciente. Al mismo tiempo que fluye a través de este tubo, la sangre empobrecida en t-PA y plasminógeno se devuelve a la circulación del paciente.

De esta forma la sangre devuelta es pobre en actividad fibrinolítica y está enriquecida en actividad antifibrinolítica, lo que protege frente a la tendencia hemorrágica.

2. En caso de que se produzca una hemorragia por los motivos antes mencionados, el paciente puede tratarse para detener la hemorragia con el fluido corporal deplecionado en proteínas fibrinolíticas preparado mediante los conjugados y métodos de la materia tratada en la presente descripción, que se espera que sean más potentes para detener la hemorragia debido a sus cualidades antifibrinolíticas.

En otras realizaciones, los métodos de la materia tratada en la presente descripción son adecuados para el tratamiento de las hemorragias asociadas a la cirugía de trasplante hepático.

El hígado desempeña un papel fundamental en la hemostasia y la trombosis. En las células del parénquima hepático se sintetizan la mayoría de los factores de coagulación, los inhibidores fisiológicos de la coagulación y los componentes esenciales del sistema fibrinolítico. El hígado también regula la hemostasia y la fibrinólisis eliminando de la circulación los factores de coagulación activados y los complejos de inhibidores enzimáticos. Por lo tanto, si se produce una disfunción hepática en pacientes con enfermedad hepática, aparece un complicado trastorno hemostático que puede provocar hemorragias.

Durante la primera fase del trasplante de hígado, la extirpación del hígado enfermo (fase anhepática), pueden producirse cambios hemostáticos significativos. Dado que los factores de coagulación activados no se han eliminado de la circulación, pueden utilizarse junto al consumo de plaquetas y la hiperfibrinólisis secundaria. Además, también se produce una hiperfibrinólisis primaria debido a un filtrado defectuoso del tPA. Los cambios hemostáticos más severos durante el trasplante de hígado se producen tras la fase de reperusión del hígado del donante. Las plaquetas quedan atrapadas en el injerto, dando lugar a un agravamiento de la trombocitopenia y causando daños en el injerto por inducción de la apoptosis de las células endoteliales. La liberación del factor tisular y el tPA del injerto reperfundido provoca a su vez fibrinólisis. Por lo tanto, se cree que la hiperfibrinólisis contribuye de forma significativa al deterioro de la hemostasia durante las fases anhepática y de reperusión. Además, el injerto libera sustancias similares a la heparina que pueden inhibir la coagulación. Por otro lado, otros factores como la hipotermia, la acidosis metabólica y la hemodilución afectan negativamente a la hemostasia durante esta fase. El trasplante de hígado es un procedimiento prolongado con amplias superficies de herida quirúrgica que incluyen la posible transacción de venas colaterales. La mejora de las técnicas quirúrgicas y de los cuidados anestésicos han permitido reducir notablemente la pérdida de sangre durante el trasplante hepático. En caso de producirse una hemorragia incontrolada, pueden transfundirse concentrados de hematíes, plaquetas y plasma fresco congelado. El uso de agentes antifibrinolíticos sintéticos, como el ácido tranexámico (un análogo de la lisina) y la aprotinina (un inhibidor de la serina proteasa) es una práctica habitual.

Por lo tanto, cabe destacar que los productos de la materia tratada en la presente descripción, conjugados, composiciones y métodos descritos por la materia tratada en la presente descripción, debido a sus cualidades antifibrinolíticas pueden ser especialmente aptos para el cese de la hemorragia asociada con el estado hiperfibrinolítico inducido por la cirugía de trasplante de hígado.

Es importante destacar que los métodos de la materia tratada en la presente descripción pueden aplicarse a cualquier cirugía que implique el trasplante de cualquier órgano o tejido, por ejemplo, hígado, riñón, pulmón, corazón, páncreas, piel, vasos sanguíneos o similares.

En otras realizaciones, los métodos de la materia tratada en la presente descripción pueden aplicarse a trastornos hemostáticos adquiridos que pueden ser hemorragias resultantes de terapias fibrinolíticas o trombolíticas.

El tratamiento fibrinolítico/trombolítico se administra principalmente a pacientes con infarto agudo de miocardio (trombosis arterial coronaria aguda) o con ictus agudo (trombosis arterial cerebral aguda). El objetivo del tratamiento fibrinolítico/trombolítico es restablecer rápidamente el flujo sanguíneo en el vaso ocluido acelerando de esta forma la proteólisis fibrinolítica del trombo. El tratamiento fibrinolítico suele producir un estado fibrinolítico ya que la activación del plasminógeno no se limita al trombo. Dichos efectos son complejos e incluyen una reducción del nivel de fibrinógeno, un aumento de los productos de degradación del fibrinógeno y una disminución de los factores de coagulación. Una de las complicaciones del tratamiento fibrinolítico es la hemorragia. Las complicaciones hemorrágicas son más frecuentes con el tratamiento fibrinolítico que con el anticoagulante y requieren un diagnóstico y tratamiento rápidos. Dos son los problemas que contribuyen a un aumento de la hemorragia. En primer lugar, el efecto fibrinolítico no se limita al lugar de la trombosis, sino que suele ser sistémico. Por lo tanto, cualquier tapón hemostático necesario para prevenir hemorragias en lugares con lesiones vasculares causadas por catéteres necesarios para el tratamiento o dentro de lesiones patológicas en el cerebro, el tracto gastrointestinal u otros lugares también son susceptibles de disolución. La complicación más grave es la hemorragia intracraneal, que se produce en aproximadamente el 1 % de los pacientes y se asocia a una elevada mortalidad y una grave discapacidad en los supervivientes. Las complicaciones hemorrágicas más frecuentes se asocian a procedimientos vasculares invasivos como la colocación de catéteres arteriales y venosos. En estos lugares puede haber hemorragias frecuentes y no deben suponer la interrupción del tratamiento si pueden tratarse con presión local u otras medidas sencillas. El problema puede minimizarse limitando las punciones venosas y arteriales y estableciendo medidas locales de actuación temprana. Las lesiones preexistentes, como úlceras gastrointestinales o lesiones genitourinarias también pueden producirse hemorragias importantes.

El tratamiento de las complicaciones hemorrágicas tras la fibrinólisis/trombólisis implica medidas locales, así como la corrección del estado de hipocoagulabilidad sistémica, incluyendo un tratamiento de sustitución para corregir el defecto hemostático causado por la plasminemia sistémica. Con frecuencia se necesita sustituir el fibrinógeno, lo que puede realizarse mediante la administración de crioprecipitado, mientras que puede utilizarse plasma fresco congelado para sustituir otras proteínas hemostáticas.

Cabe señalar que la terapia fibrinolítica/trombolítica implica el uso de anticoagulantes o agentes anticoagulantes. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término “agente anticoagulante” se refiere a cualquier agente que interfiera en la coagulación de la sangre. Algunos anticoagulantes, como los derivados cumarínicos bishidroxycumarina (Dicumarol) y la warfarina (Coumadin) inhiben la síntesis de la protrombina, una sustancia que forma coágulos, y otros factores de coagulación. Los anticoagulantes pueden incluir, entre otros, compuestos que actúan como antagonistas de los adrenorreceptores beta2, antagonistas del neuropéptido V2, análogos de la prostaciclina, inhibidores de la tromboxano sintasa, agonistas del calcio, derivados de la cumarina, inhibidores de la elastasa, antiinflamatorios no esteroideos, inhibidores de la trombina, inhibidores de la lipoxigenasa, inhibidores del factor Vila, inhibidores del factor Xa, inhibidores de la fosfodiesterasa III, heparinas y antagonistas de la glucoproteína fibrinógeno IIb/IIIa.

Las cumarinas son antagonistas de la vitamina K. Una muy importante es la warfarina (Coumadin). Este tipo de anticoagulantes se utilizan para tratar a pacientes con trombosis venosa profunda (TVP), embolia pulmonar (EP) y para prevenir émbolos en pacientes con fibrilación auricular (FA) y prótesis valvulares mecánicas. Otros ejemplos de anticoagulantes son el acenocumarol, el fenprocumón, la atromentina y la fenindiona.

La heparina es una sustancia biológica que suele obtenerse del intestino de los cerdos. Activa la antitrombina III, que impide que la trombina coagule la sangre. La heparina de bajo peso molecular, un producto más procesado, es bastante útil ya que no requiere la monitorización del parámetro de coagulación APTT y ofrece menos efectos secundarios que, por ejemplo, la Enoxaparina (Clexane).

El fondaparinux es un azúcar sintético compuesto por los cinco azúcares (pentasacárido) de la heparina que se unen a la antitrombina y, además, es un inhibidor del factor Xa. Es una molécula de menor tamaño que la heparina de bajo peso molecular. Otro ejemplo es el ldraparinux sódico, que posee una estructura química y actúa de forma similar al fondaparinux.

Fármacos como el rivaroxabán, el apixabán y el edoxabán actúan inhibiendo directamente el factor Xa (a diferencia de las heparinas y el fondaparinux, que activan la antitrombina).

Otros ejemplos son, entre otros, el betrixabán de Portola Pharmaceuticals, el darexabán (YM150) de Astellas y, más recientemente, el letaxabán (TAK-442) de Takeda y el eribaxabán (PD0348292) de Pfizer.

Otro tipo de anticoagulantes son los inhibidores directos de la trombina. Entre ellos podemos citar, entre otros, los fármacos bivalentes hirudina, lepirudina y bivalirudina; y los fármacos monovalentes argatroban y dabigatrán.

La propia proteína antitrombina se utiliza como agente anticoagulante terapéutico proteico que puede purificarse a partir de plasma humano o producirse de forma recombinante (por ejemplo, Atryn, que se produce a partir de la leche de cabras modificadas genéticamente).

Como ya se ha indicado anteriormente, la administración de anticoagulantes, por ejemplo la heparina, es el tratamiento antitrombótico estándar indicado para la trombosis venosa aguda, para la profilaxis de la trombosis en el paciente posquirúrgico (especialmente ortopédico) e inmóvil, y para el lavado de vías intravenosas para mantener la permeabilidad. Sin embargo, la heparina y las HBPM presentan ciertos inconvenientes debido a su potencia. La principal complicación es una hemorragia incontrolada como consecuencia de una simple tensión del movimiento o contactos con objetos físicos o en las zonas quirúrgicas. Además, aproximadamente el 5 % (rango de hasta el 30 %) de los pacientes tratados con heparina, y alrededor del 2 % de los pacientes que reciben heparina no fraccionada (HNF), desarrollan trombocitopenia inmunomediada (TIH) que puede complicarse con hemorragias (como consecuencia de la disminución del recuento de plaquetas) o con trombosis arterial y venosa debido a la aglutinación intravascular de plaquetas. Los productos y métodos de la materia tratada en la presente descripción pueden prevenir este tipo de efectos indeseados de dichos agentes anticoagulantes.

Más específicamente, la **Coagulación intravascular diseminada (CID)** es un proceso patológico que se caracteriza por una activación generalizada de la cascada de coagulación que da lugar a la formación de coágulos sanguíneos en los pequeños vasos sanguíneos de todo el organismo. Esto compromete el flujo sanguíneo tisular y, en última instancia, puede provocar daños en distintos órganos. Además, como el proceso de coagulación consume factores de coagulación y plaquetas, se interrumpe la coagulación normal y pueden producirse graves hemorragias en distintas zonas.

En algunas realizaciones más, la materia tratada en la presente descripción proporciona métodos aplicables para el tratamiento, prevención, profilaxis, mejora, inhibición de cualquier hemorragia asociada con el parto o los embarazos, por ejemplo, la hemorragia posparto (HPP). El **sangrado posparto o hemorragia posparto (HPP)** suele definirse como la pérdida de más de 500 ml o 1.000 ml de sangre en las primeras 24 horas posteriores al parto. Los signos y síntomas iniciales pueden ser un aumento de la frecuencia cardíaca, sensación de desmayo al ponerse de pie y aumento de la frecuencia respiratoria. La enfermedad puede aparecer hasta seis semanas después del parto. La causa más frecuente es una mala contracción del útero tras el parto, por no haberse expulsado toda la placenta, un desgarro del útero o una mala coagulación de la sangre.

Las causas de la hemorragia posparto son la atonía uterina, los traumatismos, la retención de placenta y la coagulopatía, comúnmente denominadas las “cuatro T”:

Tono: la atonía uterina es la incapacidad del útero para contraerse y puede provocar hemorragias continuas. La retención del tejido placentario y la infección pueden contribuir a una atonía uterina. La atonía uterina es la causa más frecuente de hemorragia posparto.

Traumatismo: Lesión en el canal del parto, que incluye el útero, el cuello uterino, la vagina y el perineo, que puede producirse incluso si el parto se controla adecuadamente. La hemorragia es considerable, ya que todos estos órganos contienen una mayor cantidad de sangre durante el embarazo.

Tejidos: la retención de tejidos de la placenta o del feto puede provocar hemorragias.

Trombina: se produce un trastorno hemorrágico cuando existe un fallo de coagulación, como suele ocurrir con las enfermedades denominadas coagulopatías.

Cabe destacar que en algunas realizaciones, el tPA y/o el producto libre de plasminógeno de la materia tratada en la presente descripción y cualquier método que utilice el mismo, puede aplicarse para el tratamiento y prevención de la HPP tal y como se ha mostrado anteriormente.

En algunas otras realizaciones, el método de la materia tratada en la presente descripción puede aplicarse también para tratar el SGP. **Síndrome de Goodpasture (SGP)** es una rara enfermedad autoinmune en la que los anticuerpos atacan la membrana basal de los pulmones y los riñones, provocando hemorragias pulmonares e insuficiencia renal. La depleción de proteínas fibrinolíticas como el tPA y/o el plasminógeno utilizando los conjugados y métodos de la materia tratada en la presente descripción, de un fluido corporal como productos sanguíneos que se utilizan regularmente para tratar a dichos pacientes puede mejorar el tratamiento.

En algunas otras realizaciones, los métodos de la materia tratada en la presente descripción pueden aplicarse para tratar hemorragias causadas por la rotura de vasos.

En algunas realizaciones concretas, se utiliza una inyección intraarticular de plasma o plasma rico en plaquetas para el tratamiento de pacientes con osteoartritis de rodilla (OA). Se ha demostrado que la inyección de PRP en la rodilla produce mejoras clínicas significativas (Meheux CJ et al.). Por otra parte, se considera que la expresión de activadores del plasminógeno (AP) del tipo de la uroquinasa, que degradan diversos componentes de la matriz extracelular como los colágenos y la proteína del núcleo del aggrecano, es de especial importancia en el desarrollo de la OA (Pap G et al.). Expression of stromelysin and urokinase type plasminogen activator protein in resection specimens and biopsies at different stages of osteoarthritis of the knee (Pap G. et al.). Por lo tanto, la inyección de fluido corporal deplecionado

en proteínas fibrinolíticas preparado mediante los conjugados y métodos de la materia tratada en la presente descripción evitaría el efecto deletéreo y mejoraría el resultado.

Además, las intervenciones quirúrgicas pueden provocar hemorragias graves en pacientes con trastornos hemostáticos hereditarios. Estos pacientes pueden sangrar excesivamente durante o después de una intervención quirúrgica. Hay que tener en cuenta que, en pacientes con trastornos hemostáticos hereditarios, aparte de la magnitud del traumatismo quirúrgico, hay que tener en cuenta la magnitud de la actividad fibrinolítica en el lugar de la intervención. De esta forma, los procedimientos quirúrgicos en zonas con una gran actividad fibrinolítica, como las cavidades bucal, nasal y faríngea, así como el sistema urogenital, en especial, el lecho prostático, pueden acabar con una hemorragia excesiva en pacientes con trastornos hemostáticos hereditarios. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los métodos de la materia tratada en la presente descripción pueden ser específicamente aplicables también para dicha hemorragia.

Como se ha indicado anteriormente, los métodos de la materia tratada en la presente descripción implican la administración o reintroducción de un fluido corporal o producto del mismo con una actividad fibrinolítica reducida o nula, resultante de los métodos discutidos anteriormente en la presente memoria, utilizando los conjugados de la materia tratada en la presente descripción o cualquier composición, dispositivo, batería, kit o sistemas descritos en la materia tratada en la presente descripción.

En algunas realizaciones concretas, dicha administración puede llevarse a cabo utilizando un aparato extracorpóreo. En algunas otras realizaciones, el producto libre de actividad fibrinolítica puede administrarse al sujeto utilizando cualquier dispositivo, batería, kit o sistemas como los descritos en la presente memoria.

Debe tenerse en cuenta que, en algunas realizaciones, el producto con actividad fibrinolítica reducida descrito anteriormente puede prepararse a partir de fluidos corporales obtenidos de un sujeto alogénico. En otras realizaciones más, especialmente en el caso de procedimientos electivos (p. ej., cirugía planificada), el sujeto puede tratarse con un producto derivado del fluido corporal de una fuente autóloga.

La donación de sangre “**autóloga**”, tal y como se utiliza en la presente memoria, es un concepto en el que las personas que se transfunden pueden donar sangre para su propio uso si se puede prever la necesidad de sangre y desarrollar un plan de donación. Esta situación suele ocurrir durante una intervención quirúrgica planificada previamente. La sangre autóloga para transfusión puede obtenerse mediante donación preoperatoria. El término “**sangre alogénica**”, tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la sangre extraída de un donante no emparentado de la misma especie. Más concretamente, en algunas realizaciones, cuando la sangre o los productos sanguíneos de la materia tratada en la presente descripción se obtienen de al menos un sujeto humano o más, se entiende por fuente alogénica que el producto resultante puede utilizarse para otro/s individuo/s humano/s.

Tal y como se ha indicado anteriormente, la materia tratada en la presente descripción en la actualidad proporciona métodos para el tratamiento de hemorragias, trastornos hemostáticos y cualquier afección asociada a los mismos. Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos “*enfermedad*”, “*trastorno*”, “*afección*” y similares, en relación con la salud de un sujeto, se utilizan indistintamente y tienen los significados atribuidos a todos y cada uno de dichos términos.

Se entiende que los términos utilizados indistintamente “*asociados*” y “*relacionados*”, al referirse a patologías en la presente memoria, significan enfermedades, trastornos, afecciones o cualquier patología que al menos una de las siguientes: comparte causalidades, coexiste con una frecuencia superior a la coincidente, o en la que al menos una enfermedad, trastorno, afección o patología causa una segunda enfermedad, trastorno, afección o patología.

Como se ha indicado anteriormente, la materia tratada en la presente descripción proporciona métodos para tratar los trastornos especificados anteriormente. El término “*tratamiento*”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la administración de una cantidad terapéutica de la composición de la materia tratada en la presente descripción que sea eficaz para mejorar los síntomas no deseados asociados con una enfermedad, prevenir la manifestación de dichos síntomas antes de que se produzcan, ralentizar la progresión de la enfermedad, ralentizar el deterioro de los síntomas, mejorar el inicio del periodo de remisión, ralentizar el daño irreversible causado en la fase crónica progresiva de la enfermedad, retrasar el inicio de dicha fase progresiva, disminuir la gravedad o curar la enfermedad, mejorar la tasa de supervivencia o una recuperación más rápida, o prevenir la aparición de la enfermedad o una combinación de dos o más de los anteriores. El tratamiento puede realizarse al desarrollarse inicialmente una afección hemostática, o puede suministrarse de forma continua, por ejemplo mediante la administración más de una vez al día, cada 1 día a 7 días, cada 7 días a 15 días, cada 15 días a 30 días, cada mes a dos meses, cada dos meses a 6 meses, o incluso más, para lograr los efectos terapéuticos mencionados.

El término “*profilaxis*” se refiere a la prevención o reducción del riesgo de aparición del evento biológico o médico, específicamente, la aparición o reaparición de trastornos asociados con la hemorragia, que se busca prevenir en un tejido, un sistema, un animal o un ser humano, por un investigador, veterinario, médico u otro clínico, y el término “*cantidad profilácticamente eficaz*” se entiende como la cantidad de una composición farmacéutica que puede lograr dicho objetivo. De esta forma, en realizaciones concretas, los métodos de la materia tratada en la presente descripción son particularmente eficaces en la profilaxis, es decir, en la prevención de afecciones asociadas a trastornos hemorrágicos. Así, los sujetos a los que se les ha administrado dichas composiciones tienen menos probabilidades

de experimentar síntomas asociados con dichos trastornos hemorrágicos que también tienen menos probabilidades de volver a ocurrir en un sujeto que ya los ha experimentado en el pasado.

5 El término “*mejora*” al que se hace referencia en la presente memoria se refiere a la disminución de los síntomas y a la mejora del estado de un sujeto gracias a las composiciones y métodos según la materia tratada en la presente descripción en la presente memoria, en donde dicha mejora puede manifestarse en forma de inhibición de los procesos patológicos asociados con los trastornos hemorrágicos descritos en la presente memoria, una reducción significativa de su magnitud o una mejora del estado fisiológico del sujeto enfermo.

10 El término “*inhibir*” y todas las variaciones de dicho término pretenden abarcar la restricción o prohibición del progreso y exacerbación de síntomas patológicos o del progreso de un proceso patológico, con los que dichos síntomas o proceso patológico están asociados.

15 El término “*eliminar*” se refiere a la erradicación o supresión sustancial de los síntomas patológicos y posiblemente de la etiología patológica, opcionalmente, según los métodos de la materia tratada en la presente descripción descritos a continuación.

20 Los términos “*retrasar*”, “*retrasar la aparición*”, “*retardar*” y todas sus variaciones pretenden abarcar la ralentización del progreso y/o exacerbación de un trastorno asociado con el mal plegamiento de proteínas o la agregación de proteínas, concretamente, trastornos hemorrágicos y sus síntomas que ralentizan su progreso, exacerbación o desarrollo, de modo que aparezcan más tarde que en ausencia del tratamiento según la materia tratada en la presente descripción.

25 Tal y como se ha indicado anteriormente, el tratamiento o la prevención incluyen la prevención o el aplazamiento del desarrollo de la enfermedad, la prevención o el aplazamiento del desarrollo de los síntomas y/o la reducción de la gravedad de los síntomas que se desarrollarán o se espera que se desarrollen. También incluyen la mejora de los síntomas existentes, la prevención de síntomas adicionales y la mejora o prevención de las causas metabólicas subyacentes de los síntomas. Cabe destacar que los términos “*inhibición*”, “*moderación*”, “*reducción*” o “*atenuación*” a los que se hace referencia aquí, se refieren al retraso, contención o reducción de un proceso, específicamente, un trastorno hemorrágico mediante, en uno de los porcentajes aproximados de 1 % a 99,9 %, específicamente, entre el  
30 aprox. 1 % y el aprox. 5 %, entre el aprox. 5 % y el 10 %, entre el aprox. 10 % y el 15 %, entre el aprox. 15 % y el 20 %, entre el aprox. 20 % y el 25 %, entre el aprox. 25 % y el 30 %, entre el aprox. 30 % y el 35 %, entre el aprox. 35 % y el 40 %, entre el aprox. 40 % y el 45 %, entre el aprox. 45 % y el 50 %, entre el aprox. 50 % y el 55 %, entre el aprox. 55 % y el 60 %, entre el aprox. 60 % y el 65 %, entre el aprox. 65 % y el 70 %, entre el aprox. 75 % y el 80 %, entre el aprox. 80 % y el 85 %, entre el aprox. 85 % y el 90 %, entre el aprox. 90 % y el 95 %, entre el aprox. 95 % y el 99 %, o entre el aprox. 99 % y el 99,9 %.

Puede llevar a cabo en una o varias administraciones diarias, semanales o mensuales, con los niveles de dosis y patrones elegidos por el médico. Las realizaciones más específicas se refieren al uso de 2-3 dosis semanalmente.

40 La materia tratada en la presente descripción se refiere al tratamiento de sujetos o pacientes que lo necesiten. Por “*paciente*” o “*sujeto necesitado*” se entiende cualquier organismo que pueda estar infectado por los patógenos mencionados anteriormente, y para el que se quieran los productos, conjunto/s y métodos preventivos y profilácticos aquí descritos, incluyendo seres humanos, mamíferos domésticos y no domésticos como sujetos caninos y felinos, bovinos, simios, equinos y murinos, roedores, aves domésticas, acuicultura, peces y peces exóticos de acuario. Cabe  
45 destacar que el sujeto tratado también puede ser cualquier reptil o animal de zoológico.

50 Por “*sujeto mamífero*” se entiende cualquier mamífero para el que se quiera la terapia propuesta, incluyendo sujetos humanos, equinos, caninos y felinos, más concretamente humanos. Debe tenerse en cuenta que, concretamente en el caso de sujetos no humanos, el método de la materia tratada en la presente descripción puede realizarse mediante la administración por inyección (intravenosa (IV), intraarterial (IA), intramuscular (IM) o subcutánea (SC)), agua potable, alimento, pulverización, lavado oral y directamente en el tracto digestivo de los sujetos necesitados.

55 Cabe destacar que la materia tratada en la presente descripción proporciona, en otros aspectos de la misma, cualquier producto de fluido corporal que muestre una actividad fibrinolítica disminuida y que haya sido preparado por cualquiera de los métodos de la materia tratada en la presente descripción. Por lo tanto, la materia tratada en la presente descripción, en algunas realizaciones de la misma, comprende cualquier producto de fluido corporal de mamífero que carece o se ha reducido la cantidad de al menos una proteína fibrinolítica, concretamente, al menos un tPA, y / o plasminógeno. En algunas realizaciones, el producto producido por los métodos de la materia tratada en la presente descripción carece de tPA. En algunas otras realizaciones, el producto resultante de los métodos de la materia tratada  
60 en la presente descripción carece de tPA y plasminógeno. Como se ha indicado anteriormente, dicho producto producido por el método de la materia tratada en la presente descripción puede ser cualquier fluido corporal sometido a cualquiera de los procedimientos, conjugados, composiciones, dispositivos y sistemas descritos en la presente memoria, concretamente, sangre de mamífero, plasma o cualquier producto sanguíneo.

65 En otro aspecto más, la materia tratada en la presente descripción proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un producto sanguíneo y/o derivado de la sangre que tiene una actividad fibrinolítica reducida para su

uso en un método para el tratamiento, prevención, profilaxis, mejora, inhibición de hemorragias, trastornos hemostáticos y cualquier hemorragia o condición patológica asociada a los mismos en un sujeto que lo necesite. Debe entenderse que dicho producto fluido corporal se prepara mediante los métodos de la materia tratada en la presente descripción. En algunas realizaciones más, dicho producto de fluido corporal puede prepararse mediante cualquiera de los conjugados de la materia tratada en la presente descripción, cualquier composición de los mismos o cualquier dispositivo, batería, kits o sistemas que comprendan la variedad de conjugados de la materia tratada en la presente descripción según se define en la presente memoria.

En otras realizaciones más, la sangre y/o el producto derivado de la sangre utilizado en la materia tratada en la presente descripción puede aplicarse específicamente al tratamiento de cualquier trastorno hemostático, en concreto, un trastorno hemorrágico hereditario o adquirido, tal como se define anteriormente en la materia tratada en la presente descripción.

Hay que entender que cualquiera de los conjugados descritos por la materia tratada en la presente descripción, cualquier composición de los mismos y cualquier dispositivo, batería, kit o sistemas descritos por la materia tratada en la presente descripción, en relación con otros aspectos de la materia tratada en la presente descripción pueden aplicarse también en este aspecto. Aún más, hay que destacar que la materia tratada en la presente descripción abarca además cualquier sangre y/o producto derivado de la sangre descrito en la presente memoria para su uso por cualquiera de los métodos terapéuticos o cualquier otro método descrito en la presente memoria, para cualquiera de las condiciones o trastornos descritos anteriormente en la presente memoria.

Todos los términos científicos y técnicos utilizados en la presente memoria tienen significados de uso común en la técnica, a menos que se especifique lo contrario. Las definiciones que aquí se ofrecen tienen por objeto facilitar la comprensión de determinados términos utilizados frecuentemente y no pretenden limitar el alcance de la presente descripción.

Todas las definiciones, tal y como se definen y utilizan en la presente memoria, deben entenderse que prevalecen sobre las definiciones de diccionario, las definiciones de los documentos y/o los significados ordinarios de los términos definidos.

El término “aproximadamente”, tal y como se utiliza en la presente memoria, indica valores que pueden desviarse hasta un 1 %, más concretamente un 5 %, más concretamente un 10 %, más concretamente un 15 %, y en algunos casos hasta un 20 % por encima o por debajo del valor al que se hace referencia; el intervalo de desviación incluye valores enteros y, si procede, también valores no enteros, constituyendo un intervalo continuo. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “aproximadamente” se refiere a  $\pm 10$  %.

Los artículos indefinidos “un”, “una”, “unos”, “unas”, tal y como se utilizan en la presente especificación y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, deben entenderse como “al menos uno”. Debe tenerse en cuenta que, tal y como se utilizan en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, pueden referirse tanto formas singulares “un”, “una” y “el”, “la” como plurales “unos”, “unas”, “los”, “las”, a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

La expresión “y/o”, tal y como se utiliza en la especificación y en las reivindicaciones, debe entenderse en el sentido de “uno o ambos” de los elementos así combinados, es decir, elementos que están presentes conjuntamente en algunos casos y disyuntivamente en otros. Los elementos múltiples enumerados con “y/o” deben interpretarse de la misma forma, es decir, “uno o más” de los elementos así conectados. Como opción, pueden estar presentes otros elementos además de los elementos específicamente identificados por la cláusula “y/o”, ya estén relacionados o no con los elementos específicamente identificados. De esta forma, como ejemplo no limitativo, “al menos uno de A y B” (o, equivalentemente, “al menos uno de A o B”, o, equivalentemente “al menos uno de A y/o B”) puede referirse, en una realización, a al menos uno, incluyendo opcionalmente más de uno, A, sin B presente (y opcionalmente incluyendo elementos diferentes de B); en otra realización, al menos uno, que opcionalmente incluya más de uno, B, sin que esté presente A (y que opcionalmente incluya elementos diferentes de A); en otra realización, al menos uno, que opcionalmente incluya más de uno, A, y al menos uno, que opcionalmente incluya más de uno, B (y que opcionalmente incluya otros elementos); etc.

Tal como se utiliza en la presente especificación y en las reivindicaciones, debe entenderse que “o” tiene el mismo significado que “y/o”, tal como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, al separar elementos de una lista, “o” o “y/o” se interpretará como inclusivo, es decir, la inclusión de al menos uno, pero también incluyendo más de uno, de un número o lista de elementos y, opcionalmente, elementos adicionales no incluidos en la lista. Únicamente los términos que indiquen claramente lo contrario, como “sólo uno de” o “exactamente uno de”, o, cuando se utilice en las reivindicaciones, “consistente en”, se referirán a la inclusión de exactamente un elemento de un número o lista de elementos. En general, el término “o”, tal y como se utiliza en la presente memoria, sólo se interpretará en el sentido de que indica alternativas exclusivas (es decir, “uno u otro, pero no ambos”) cuando vaya precedido de términos de exclusividad, como “o bien”, “uno de”, “sólo uno de” o “exactamente uno de” “Consistente esencialmente en”, cuando se utilice en las reivindicaciones, tendrá su significado ordinario tal como se utiliza en la legislación sobre patentes.

Tal y como se utiliza en la presente especificación y en las reivindicaciones, la expresión “al menos uno”, en referencia a una lista de uno o más elementos, debe entenderse en el sentido de al menos un elemento seleccionado de entre uno o más de los elementos de la lista de elementos, pero sin incluir necesariamente al menos uno de todos y cada uno de los elementos específicamente enumerados en la lista de elementos y sin excluir ninguna combinación de



elementos de la lista de elementos. Esta definición también permite que, opcionalmente, puedan estar presentes elementos distintos de los elementos específicamente identificados dentro de la lista de elementos a los que se refiere la frase “al menos uno”, ya estén relacionados o no con los elementos específicamente identificados. De esta forma, como ejemplo no limitativo, “al menos uno de A y B” (o, equivalentemente, “al menos uno de A o B”, o, equivalentemente “al menos uno de A y/o B”) puede referirse, en una realización, a al menos uno, incluyendo opcionalmente más de uno, A, sin B presente (y opcionalmente incluyendo elementos diferentes de B); en otra realización, al menos uno, que opcionalmente incluya más de uno, B, sin que esté presente A (y que opcionalmente incluya elementos diferentes de A); en otra realización, al menos uno, que opcionalmente incluya más de uno, A, y al menos uno, que opcionalmente incluya más de uno, B (y que opcionalmente incluya otros elementos); etc.

También debe entenderse que, a menos que se indique claramente lo contrario, en cualquier método reivindicado en la presente memoria que incluya más de un paso o acción, el orden de los pasos o acciones del método no se limita necesariamente al orden en que se mencionan los pasos o acciones del método.

A lo largo de esta especificación y de los Ejemplos y reivindicaciones que le siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, todas las frases transicionales tales como “que comprende”, “que incluye”, “que porta”, “que tiene”, “que contiene”, “que involucra”, “que sostiene”, “compuesto de” y similares deben entenderse como abiertas, es decir, que significan incluyendo pero no limitadas a. Únicamente las frases transicionales “que consiste en” y “que consiste esencialmente en” serán frases transicionales cerradas o semicerradas, respectivamente, tal como se establece en el Manual de Procedimientos de Examen de Patentes de la Oficina de Patentes de los Estados Unidos. Más concretamente, los términos “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “que tiene” y sus conjugados significan “que incluye pero no se limita a”. El término “compuesto de” significa “incluido y limitado a”. El término “que consiste esencialmente en” significa que la composición, método o estructura puede incluir ingredientes, pasos y/o partes adicionales, pero sólo si los ingredientes, pasos y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, método o estructura reivindicada.

Debe tenerse en cuenta que varias realizaciones de esta materia tratada en la presente descripción pueden presentarse en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo se utiliza simplemente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible en el alcance de la materia tratada en la presente descripción. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo menciona específicamente todos los subintervalos posibles, así como los distintos valores numéricos comprendidos dentro de ese intervalo. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo del 1 al 6 menciona específicamente subintervalos del 1 al 3, del 1 al 4, del 1 al 5, del 2 al 4, del 2 al 6, del 3 al 6, etc., así como los distintos números de dicho intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo. Siempre que en el documento se indique un intervalo numérico, se entiende que incluye cualquier número citado (fraccionario o entero) dentro del intervalo indicado. Los términos “entre” un primer número indicado y un segundo número indicado y “entre” un primer número indicado “a” un segundo número indicado se utilizan indistintamente y se entiende que incluyen el primer y segundo números indicados y todos los números fraccionarios y enteros comprendidos entre ellos.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término “método” se refiere a los modos, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea determinada, incluyendo, entre otros, los modos, medios, técnicas y procedimientos conocidos o fácilmente desarrollados a partir de los modos, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los profesionales de las artes química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

Se aprecia que ciertas características de la materia tratada en la presente descripción, que, para mayor claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. A la inversa, distintas características de la materia tratada en la presente descripción, que se describen, por brevedad, en el contexto de una sola realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como convenga en cualquier otra realización descrita de la materia tratada en la presente descripción. Ciertas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse características esenciales de dichas realizaciones, a menos que la realización no sea operativa sin dichos elementos.

Varias realizaciones y aspectos de la materia tratada en la presente descripción, tal como se describen en la presente memoria y se reivindican en la sección de reivindicaciones, encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Al divulgarse y describirse, debe entenderse que esta materia tratada en la presente descripción no se limita a los ejemplos, pasos de métodos y composiciones concretas divulgadas en la presente memoria, ya que dichos pasos de métodos y composiciones pueden variar en cierta medida. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente memoria se utiliza únicamente con el fin de describir realizaciones particulares y no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la materia tratada en la presente descripción estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Los siguientes ejemplos son representativos de técnicas empleadas por los inventores para llevar a cabo aspectos de la materia tratada en la presente descripción. Debe apreciarse que si bien estas técnicas son ejemplos de realizaciones preferidas para la práctica de la materia tratada en la presente descripción, los expertos en la materia, a la luz de la

presente descripción, reconocerán que pueden hacerse numerosas modificaciones sin apartarse del alcance de la materia tratada en la presente descripción.

Ejemplos

5

Procedimientos experimentales

Reactivos:

10 Sepharose 4B200 (Sigma Aldrich)

Plasma humano - El plasma de donantes sanos se obtuvo del Banco de Sangre MDA.

Y/o Crioprecipitado Humano - El crioprecipitado se obtuvo del Banco de Sangre Hadassah

15

Métodos

Recuperación de las perlas (método n.º 1)

20

1. Las perlas se lavaron 3 veces con 100 mM de lisina PH= 9,0 y NaCl 1M a 300 x g durante 2 minutos a TA.

2. Las perlas se lavaron 3 veces con 3M de NaCl a 300 x g durante 2 minutos a temperatura ambiente (TA)

3. Las perlas se lavaron 3 veces X3 con H<sub>2</sub>O a 300 x g durante 2 minutos, a TA.

25

4. Las perlas se lavaron 3 veces con 0,5M de NaOH a 300 x g durante 2 minutos, a TA, en el tercer lavado se incubaron las perlas con NaOH durante 30 minutos.

5. Las perlas se lavaron 3 veces con H<sub>2</sub>O a 300 x g durante 2 minutos, a TA.

30

6. Las perlas se lavaron 3 veces con 0,5M de citrato de sodio a 300 x g durante 2 minutos a TA.

7. Las perlas se lavaron 3 veces a 300 x g durante 2 minutos, a TA con: a- 10 mM de citrato sódico PH=6.8. b- 120 mM NaCl. c- 120 mM de Glicina. 8. Las perlas se lavaron 3 veces con H<sub>2</sub>O a 300 x g durante 2 minutos a TAoC.

35

9. Las perlas se lavaron 3 veces con etanol al 20 % + NaCl 1M\*. Tras el tercer lavado, se agregó Etanol al 20 % + NaCl 1M para obtener una suspensión al 70 %, se volvieron a suspender invirtiéndolas delicadamente y se almacenaron a 4 °C.

40 Recuperación de las perlas con bomba peristáltica (método n.º 2)

1- Se conectó el filtro a la bomba peristáltica.

2- Se pasaron a través del filtro 150 ml de cada solución durante 15min:

45

a- 100 mM de lisina PH= 9.0 y 1M de NaCl.

b- 3M de NaCl

c- H<sub>2</sub>O

d- 0,5M de NaOH (incubar el filtro con NaOH durante 30min).

e- H<sub>2</sub>O.

55

f- 0,5M de citrato de sodio.

g- 10 mM de citrato de sodio PH=6.8.

h- 120 mM NaCl.

60

120 mM de Glicina.

i- H<sub>2</sub>O.

65

j- 20 % de Etanol + 1M de NaCl.

Todos los tampones se esterilizaron en autoclave excepto el NaOH

#### Detección de PLG

La detección de PLG en el **Ejemplo 7** se realizó utilizando el KIT: ab196262 KIT ELISA de paso simple par PLG humana.

Tabla 1: Preparación de la placa (dilución de plasma 1:10<sup>5</sup>):

	A	B	C	D
	(dilución estándar en serie- ng/μl)	(dilución estándar en serie- ng/μl)	Conjugado 1	Conjugado 6
4	1,875	→	↓	↓
5	3,75	→	Plasma 69B	1:10
6	7,5	→	↓	↓
7	15	→		Plasma no tratado 69B
8	30	→	↓	↓

#### Preparación de los reactivos:

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de usarse.

#### Preparación de los reactivos (para 36 pocillos):

1X de tampón de lavado PT (36 mL): 3,6 mL de 10X de tampón de lavado PT + 32,4 mL de agua desionizada.

Cóctel de anticuerpos (1,8 mL): 180 μL de 10X de Anticuerpo de Captura + 180 μL de 10X de Anticuerpo de Detección + 1440 μL de diluyente de anticuerpos CPI.

#### Preparación de la muestra:

El plasma se diluyó a 10<sup>5</sup> X en diluyente de muestra NS en diluciones en serie:

1:100 de plasma = 10 μl de plasma + 990 μl de diluyente de muestra en SN

1:10<sup>5</sup> de plasma = 1 μl de plasma + 999 μl de diluyente de muestra en SN

#### Preparación del estándar:

1- Solución madre (120 ng/mL): Reconstitución de la muestra estándar de proteína PLG agregando 200 μL de agua con una pipeta. Mantener a temperatura ambiente durante 10 minutos y mezclar delicadamente.

2- Etiquetado de ocho tubos de 1,5 mL, estándares 1-8.

Al tubo 1, se agregaron 225 μL de diluyente de muestra en SN.

A los tubos 2-8, se agregaron 150 μL de diluyente de muestra en SN.

Se agregaron 75 μl de solución madre al tubo 1.

Se agregaron 150 μl de estándares al tubo siguiente (del tubo 2 a 7)

El estándar n.º 8 no contiene proteínas y es el control blanco.

#### Procedimiento del ensayo:

Retirar las tiras de microplacas sobrantes del marco de placas y devolver a la bolsa de aluminio con el pack desecante, volver a sellarlas y volver a conservarlas a 4 °C.

1- Se agregaron 50 μl de todas las muestras o estándares a sus respectivos pocillos.

2- Se agregaron 50 μl del Cóctel de Anticuerpos a cada pocillo.

3- Las placas se sellaron y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador de placas regulado a 400 rpm.

5 4- Cada pocillo se lavó con 3 x 350 µl de Tampón de Lavado PT 1X (lavado por aspiración o decantación de los pocillos y, a continuación, dispensación de 350 µl de Tampón de Lavado PT 1X en cada pocillo).

5- Se agregaron 100 µL de sustrato TMB a cada pocillo y se incubaron durante

10 10 minutos en la oscuridad en un agitador de placas regulado a 400 rpm.

6- Se agregaron 100 µl de Solución de Parada a cada pocillo. La placa se agitó en un agitador de placas durante 1 minuto para mezclarla.

15 7- La absorbancia del OD se leyó a 450 nm.

Tromboelastografía (TEG)

Instrumental TEG: Sistema TEG 5000 (60) (Haemonetics, Braintree, MA) (válido hasta 31-10-2019)

20 Copas y pivotes desechables [HAE-07-052]

Reactivos para TEG:

25 1. WT-tPA 1 mg/ml (Acytilyse 50 mg,) [Acytilyse 50 mg, Boehringer Ingelheim; 1 vial de 2,333 mg de polvo contiene 50 mg de Alteplasa activa (WT-tPA)].

2. Cloruro cálcico 0,2M [Haemonetics, cat n.º 7003 lot nº: 150597BA].

30 3. Plasma humano citratado fresco congelado.

4. FVII Valin (1 mg/ml madre) DPD-V304-037 Bulk B.

35 5. Control nivel I [Haemonetics, cat n.º 8001, lote nº: HMO3199 caducidad: 2018-10]

6. Control nivel II [Haemonetics, cat n.º 8002, lote nº: HMO3178 caducidad: 2018-10]

7. PBSx10, Biological Industries lot nº: 1626505

40 8. Agua diluyente TEG Hemostasis system lote nº: 0110-1404

El ensayo se realizó según el Protocolo "Lisis de coágulos monitorizada mediante tromboelastografía (TEG)". Antes de utilizar la TEG, la calibración se realizó utilizando controles de nivel I y nivel II, cada control se ensayó en ambos canales (tal y como se describe en el protocolo). El reactivo WT- tPA se diluyó 1:90 en PBSx1 5 µl Wt-tPA (16,66 µM) +595 µl PBS\*1 =concentración de trabajo 0,185 µM (la concentración final en las muestras es de 1,85nM).

Modelo de hemorragia externa (corte de la cola en ratones)

Animales y condiciones:

50 Especie/Cepa: Ratones, c57black

Género/Número/Edad: Macho, 24, 8 semanas.

55 Fuente: Laboratorios Harlan, Israel.

Peso corporal: El peso corporal era de 20-25 g al inicio del estudio. Los pesos mínimo y máximo del grupo se mantuvieron dentro de un intervalo de ±10 % del peso medio del grupo.

60 Periodo de aclimatación: 7 días.

Identificación: Rotulador permanente (hasta 24 h de experimento) y tarjetas de jaula.

65 La manipulación de los animales se llevó a cabo según el Instituto Nacional de Salud (NIH) y la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC). Los animales se alojaron en jaulas de polisulfona (PSU) (4-6 ratones/jaula), con rejilla superior de acero inoxidable e instalaciones para comida en pellets y

agua potable en botella de policarbonato transparente; lecho: se utilizó cáscara de arroz limpia y esterilizada al vapor. El material del lecho se cambiaba junto con la jaula al menos dos veces por semana.

5 Dieta: Los animales fueron alimentados ad libitum con una dieta comercial para roedores. Los animales tuvieron libre acceso a agua potable sometida a autoclave obtenida del suministro municipal.

Contaminantes: Ninguno de los contaminantes previstos en los suministros de alimentos y agua puede influir en el resultado del presente estudio.

10 Condiciones ambientales: Los animales se alojaron en condiciones estándar de laboratorio con un suministro adecuado de aire fresco. Los animales se mantuvieron en un entorno de clima controlado. La temperatura oscilaba entre los 20-24 °C y la HR entre 30-70 % con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

15 Cuidados veterinarios: Los animales fueron inspeccionados a su llegada para adecuarlos al estudio. Al tratarse de un experimento de 24 horas, no hubo necesidad de seguimiento veterinario tras el inicio del estudio.

Comité ético: Este estudio se llevó a cabo con la aprobación de la “Junta Israelí de Experimentos con Animales” y de conformidad con la “Ley Israelí de Bienestar Animal”.

20 Responsabilidades:

1. El Director de las Instalaciones supervisa todos los aspectos de la salud y la cría de los animales, y cuenta con la asistencia de todo el personal del programa de animales.

25 2. El Director del Estudio se aseguró de que todo el personal técnico y de investigación recibiera la formación adecuada. El personal tiene experiencia en la aplicación de los procedimientos necesarios.

Establecimiento del modelo de ensayo

30 Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina y xilacina (100 y 10 mg/kg, respectivamente) en función de su peso. Los animales fueron tratados con los diferentes tratamientos mediante inyecciones intravenosas de: 200 µL de solución salina, 200 µL de plasma y 200 µL de plasma deplecionado en plasminógeno. A continuación, se colocó a los animales en posición decúbito prono. Se amputó un segmento distal de 7 mm de la cola con un bisturí. La cola se sumergió inmediatamente en un tubo Falcon de 50 mL que contenía solución salina isotónica precalentada en un baño de agua a 37°C. La posición de la cola era vertical con la punta situada unos 2 cm por debajo del horizonte corporal. Se monitorizó a cada animal durante 60 minutos, incluso si cesaba la hemorragia, para detectar cualquier posible resangrado. El tiempo de sangrado se determinó utilizando un cronómetro. Si se producían ciclos de sangrado on/off, se registraba la suma de los tiempos de sangrado dentro del periodo de 60 minutos. El experimento se interrumpió al cabo de 60 minutos para evitar la letalidad durante el experimento, tal y como exige el comité local de ética animal. Se volvió a registrar el peso corporal, incluyendo la punta de la cola, y se estimó el volumen de sangre perdida durante el periodo experimental a partir de la reducción del peso corporal. Se realizó un cálculo de la sangre en pellet tras la centrifugación de los tubos. Al final del experimento, los animales fueron sacrificados mediante sobredosis de anestesia.

45 La especie de roedor elegida fue la c57black, animales adultos jóvenes sanos de cepas de laboratorio de uso común. Este ratón modelo supone un paso inicial que proporciona información temprana sobre la eficacia del plasma deplecionado en plasminógeno para tratar la hemorragia excesiva.

50 Se utilizó un total de 24 ratones en 3 grupos. Cada grupo incluía 8 animales. El grupo de control recibió únicamente solución salina, el segundo grupo recibió plasma sin tratar y el tercer grupo recibió plasma deplecionado en plasminógeno (PEP). Los animales se dividieron en grupos aleatoriamente. Un animal de cada grupo recibió plasma o tratamiento de control, que se aplicó por vía intravenosa en una única dosis de 200 µl. El número total de animales se basa en estudios previos que demuestran que éste es el número mínimo de animales por grupo que ofrece información significativa respecto a la cantidad de sangre perdida por los animales. El tratamiento se administró mediante inyección intravenosa.

Crioprecipitado de depleción de plasminógeno mediante clear plasma:

60 1 - Montaje del dispositivo ClearPlasma:

- Llenar el filtro con resina.
- Bloquear la entrada de llenado.

65 • Colocar el regulador de flujo en la posición OFF.

- Fijar las abrazaderas al tubo de extensión (con el regulador de flujo).
- Cerrar la abrazadera
- 5 • Fijar el tubo de Extensión al filtro
- Fijar la abrazadera a la Bolsa de Recogida
- Cerrar la abrazadera.
- 10 • Fijar la bolsa de recogida al filtro,
- 1 Llenar ClearPlasma con 18 ml de Resina: TXA conjugado TXA y/o ácido ciclohexanocarboxílico (resina superflow de 90- 100 µm- Conjugado 1)
- 15 2 Lavar la resina con 60 ml de agua.
- 3 Lavar la resina con 60 ml de solución salina.
- 20 4 Conectar la bolsa de crioprecipitado a ClearPlasma
- 5 Hacer pasar 16 ml de crioprecipitado por los filtros en 22 min.
- 6 Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo - Crioprecipitado deplecionado en plasminógeno.
- 25 2- Detección de PLG
- E-80PMG - Plasminógeno Humano Kit ELISA, Lote n.º 10 – (ICL, Inc.)
- 30 • Las instrucciones de uso proceden del prospecto del Kit. (1)

• **Tabla 2: Preparación de la placa:**

	1	2	3	4
A	BLK	BLK		
B	6,25 ng/ml	6,25 ng/ml		
C	12,5 ng/ml	12,5 ng/ml		
D	25 ng/ml	25 ng/ml		
E	50 ng/m	50 ng/m		
F	100 ng/ml	100 ng/ml		
G	200 ng/m	200 ng/ml	No tratado	No tratado
H	No tratado	No tratado	Filtro PEP	Filtro PEP

35 Dilución de las muestras:

Preparar una dilución 1/5.000 de la muestra en diluciones en serie:

1:100 de Crioprecipitado (1:100 = 5 µl de Crioprecipitado (1:100 + 495 µl 1X de diluyente).

40 1:5000 de Crioprecipitado (1:50 = 10 µl de Crioprecipitado diluido (1:100 + 490 µl 1X de diluyente).

Mezclar bien en cada fase.

45 Procedimiento del ensayo:

1 Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de utilizarlos.

50 2 Pipetear 100µL de muestra (por duplicado) en los pocillos previamente designados.

3 Incubar la placa de microtitulación a temperatura ambiente durante 60 minutos. Mantener la placa tapada y nivelada durante la incubación.

4 Tras la incubación, aspirar el contenido de los pocillos.

5 Llenar completamente los pocillos con tampón de lavado, invertir la placa y verter/agitar el contenido en un contenedor de residuos. A continuación, golpear fuertemente los pocillos sobre papel absorbente para eliminar el tampón residual. Repetir 3 veces hasta completar un total de cuatro lavados.

6 Pipetear 100µL de conjugado de anticuerpo enzimático diluido adecuadamente en cada pocillo. Incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos. Mantener la placa tapada en la oscuridad y nivelada durante la incubación.

7 Lavar y secar los pocillos tal y como se describe en los pasos 5/6.

8 Pipetear 100µL de Solución de Sustrato TMB en cada pocillo.

9 Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 10 minutos exactos.

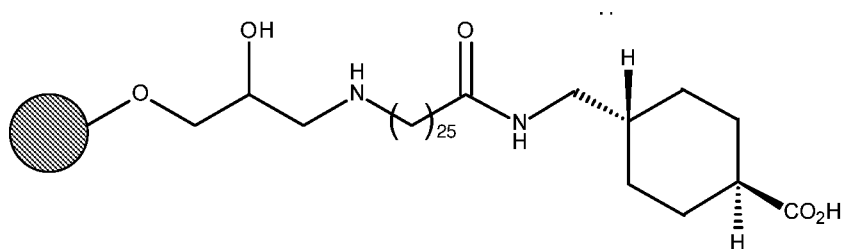
10 transcurridos diez minutos, agregar 100µL de solución de parada a cada pocillo.

11 Determinar la absorbancia (450 nm) del contenido de cada pocillo.

#### Ejemplo 1

#### Síntesis de resinas

##### Ejemplo 1.1 - Síntesis del conjugado 1



#### Producción de resina y envasado de filtros - Escalado

Este proceso se realizó siguiendo las instrucciones del producto Sepharose Fast Flow activado con NHS (GE Healthcare cat. n.º 7-0906-02).

El proceso comenzó con un nuevo lote limpio de perlas ingenuas recibidas del fabricante junto con la documentación pertinente.

El volumen de resina utilizado para este protocolo fue de 112 mL de resina escurrida (8x14 mL) en tubo de 8x50 mL (originalmente 70 % de lechada de resina; 14 mL de resina escurrida por tubo). Este protocolo produjo un lote de tres filtros ClearPlasma completos. Los preparativos, el acoplamiento y los lavados posteriores al acoplamiento se realizaron de la forma más limpia posible. Las etapas de lavado de endotoxinas y envasado se realizaron en un entorno limpio.

#### Material de laboratorio utilizado

Filtros de 0,2 µm (p. ej. Steritop), botella de 3x1L (1 mM de HCl; 0,1M de Tris-HCl, pH 8,5; 0,1M de Tampón de acetato, 0,5M de NaCl, pH 4.5), botella de 2x0,5L (tampón de acoplamiento; 4M de Urea, botella de 4x1L (EtOH al 70 %, 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM de Tris-HCl, 0,1M de NaCl, pH 7.5 en agua libre de pirógenos, EtOH al 20 %), Contenedor de residuos orgánicos, Espátulas esterilizadas en autoclave, Vasos de precipitados, Cilindros de medición, Pipetas de plástico limpias, Rodillo / rotador de tubos, Jeringas con punta de catéter de 50 mL, Fundas estériles de filtro ClearPlasma.

#### Reactivos utilizados:

Bicarbonato sódico (NaHCO<sub>3</sub>), Carbonato sódico (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), Cloruro Sódico, Ácido tranexámico, HCl al 37 %, NaOH, Tris-HCl, Ácido acético, Acetato sódico, Etanol, Urea, agua ligera, Agua libre de pirógenos.

## Soluciones

**Todos los tampones y soluciones finales se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm antes de usar.**

Tampón de acoplamiento - 100 mL 0,2M de NaHCO<sub>3</sub>, 0,5M de NaCl, pH 8.3. Se pesó una cantidad de 1,68g de bicarbonato sódico y se disolvió en 70 mL de agua ligera. El pH se ajustó a 8.3 con (1M de NaOH o 1M de HCl). Se pesaron 2,92 g de cloruro sódico y se disolvieron en la solución de bicarbonato sódico. El volumen se ajustó a 100 mL con agua ligera.

Solución de ligando - 85 mL de ácido tranexámico 25 mM (1eq) o 50 mM (2eq) o 125 mM (5eq) o 250 mM (10eq) en tampón de acoplamiento, pH ajustado a 6-9. La cantidad deseada de ácido tranexámico se disolvió en 85 mL 0,2M de NaHCO<sub>3</sub>, 0,5M de NaCl, pH 8.3. El pH se ajustó al nivel deseado. La solución se filtró mediante un filtro de 0,2 µ.

Lavado primario de la resina - 1,5L 1 mM de HCl. En un tubo de 50 mL se agregó una cantidad de 44 mL de agua ligera. Se agregó 1 mL HCL (~37 %, 12M), produciendo 0,25M de HCl. En una botella de 2L se agregaron 1400 mL de agua ligera. Se agregaron 6 mL 0,25M de HCl. El volumen se ajustó a 1500 mL. La solución se filtró mediante un filtro de 0,2 µ.

Bloqueo de la resina - 250 mL 0,3M de Tris-HCl, pH 8.5. Se disolvió una cantidad de 11,82g de Tris-HCl en 200 mL de agua ligera. El pH se ajustó a 8.5 con 1M NaOH o 1M HCl. El volumen se ajustó a 250 mL con agua ligera. La solución se filtró mediante un filtro de 0,2 µ.

Lavado básico - 1,5L de Tris-HCl 0,1M, pH 8.5. Se disolvió una cantidad de 23,64g de Tris-HCl en 1300 mL de agua ligera. El pH se ajustó a 8.5 con 1M NaOH o 1M HCl. El volumen se ajustó a 1500 mL con agua ligera. La solución se filtró mediante un filtro de 0,2 µ.

Lavado ácido de la resina - 1,5L de 0,1M de Tampón de acetato, 0,5M de NaCl, pH 4.5. Se disolvió una cantidad de 12,3g de acetato de sodio en 1300 mL de agua ligera. El pH se ajustó a 4.5 con NaOH 1M o ácido acético 0,1M (1,15 mL de ácido acético glacial en total 200 mL con agua ligera). Se disolvió una cantidad de 43,83g de cloruro sódico. El volumen se ajustó a 1500 mL. La solución se filtró mediante un filtro de 0,2 µ.

Lavado de endotoxinas (EW) 1 - 600 mL de EtOH al 70 %. Mezclar 420 mL de Etanol de alto grado con 180 mL de agua ligera.

EW2 - 600 mL de 50 mM Tris-HCl pH 7.5. Se disolvió una cantidad de 3,63g de Tris-HCl en 500 mL de agua ligera. El pH se ajustó a 7.5 con 1M HCl. El volumen se ajustó a 600 mL con agua ligera.

EW3 - 300 mL de 4M Urea en agua libre de pirógenos. Se disolvió una cantidad de 72g de urea en 200 mL de agua ligera para irrigación. El volumen se ajustó a 300 mL con agua para irrigación.

EW4 - 600 mL de 50 mM Tris-HCl, 0,1 de NaCl, pH 7.5 en agua libre de pirógenos. Se disolvió una cantidad de 3.63g de Tris-HCl en 500 mL de agua ligera para irrigación. El pH se ajustó a 7.5 con 1M HCl. Se disolvió una cantidad de 3,51 g de cloruro sódico en el tampón. El volumen se ajustó a 600 mL con agua para irrigación.

Conservación Libre de Endotoxinas (EFS) - 550 mL de EtOH al 20 % en agua libre de pirógenos. Se mezcló un volumen de 110 mL de Etanol de alto grado junto con 440 mL de agua para irrigación.

1M de HCl - ajuste del pH. Se diluyeron 4,17 mL de ácido clorhídrico al 37 % hasta 50 mL con agua ligera.

1M NaOH - ajuste del pH. Se diluyeron 2g de NaOH en 50 mL de agua ligera.

Para los ajustes del pH de las soluciones sin endotoxinas, se utilizaron soluciones elaboradas con agua para irrigación.

## Preparativos

- La resina se volvió a suspender (perlas de Sepharose activadas con NHS, lechada al 70 % en isopropanol al 100 %) y se transfirió 8x14 mL a tubos PP de 8x50 mL.

- Los tubos se centrifugaron a 400 g durante 3 min.

- Se aspiró el disolvente de conservación.

- Los tubos se llenaron hasta 45 mL con 1 mM HCl y se volvió a suspender la resina.

- Los tubos se centrifugaron a 400 g durante 3 min y se aspiraron.

- El lavado se repitió cuatro veces más (cinco lavados en total).



#### Acoplamiento

- Se agregaron 7 ml de resina a cada tubo.
- 5 - El pH se ajustó a 7.5-8 (en caso necesario).
- Los tubos se giraron delicada y continuamente durante 2-4 horas (temperatura ambiente) / toda la noche (4 °C).
- 10 - La resina se centrifugó, se aspiró y se bloqueó con 25 mL (cada tubo) de 0,1M Tris-HCl, pH 8.5 durante 2-4 horas en rotación.

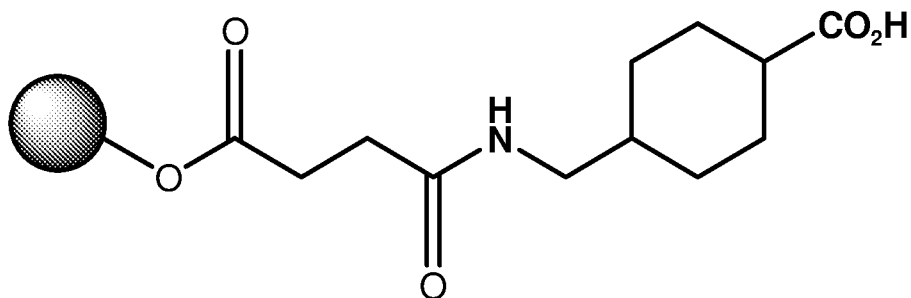
#### Lavado

- 15 La resina se centrifugó y se aspiró.
- Se agregaron 30 mL de 0,1M Tris-HCl pH 8-9 y se volvió a suspender, centrifugar y aspirar.
- Se agregaron 30 mL de tampón acetato 0,1M, NaCl 0,5M, pH 4-5 se volvió a suspender, se centrifugó y se aspiró.
- 20 Estos lavados (de tris a acetato) se repitieron 5 veces.
- Cuando el proceso:
- 25
  - Continúo en otro momento - el paso de lavado (agregar, centrifugar, aspirar) se realizó dos veces en 30 mL de EtOH al 20 %, se almacenó como 50 % de lechada en EtOH al 20 %.
  - Se continuó directamente con el lavado de Endotoxina -se agregaron 30 mL de EtOH al 70 % (EW1).
- 30 Lavado de endotoxinas
- Si la resina se almacenó en EtOH al 20 %, se centrifugó, se aspiró y se agregaron 30 ml de EtOH al 70 % (EW1).
- La resina se incubó en EtOH al 70 % durante 30min (rolling).
- 35 Se lavó la resina y se agregaron 30 mL de 50 mM Tris-HCl pH 7.5 (EW2).
- Se lavó la resina y se agregaron 30 mL de 50 mM Tris-HC, pH 7.5, la resina se incubó durante 30 minutos (rolling).
- 40 Se lavó la resina y se agregaron 15 mL de 4M Urea (EW3).
- Se lavó la resina y se agregaron 15 mL de 4M Urea, la resina se incubó durante 30 minutos (rolling).
- Se lavó la resina y se agregaron 30 mL de Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,1M, pH 7.5 (EW4).
- 45 Se lavó la resina y se agregaron 30 mL de Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,1M, pH 7.5 (EW4), la resina se incubó durante 30 minutos (rolling).
- Se lavó la resina y se agregaron 30 mL de EtOH al 20 % (EFS)
- 50 Se repitió el lavado.
- La resina se conservó en forma de lechada al 70 % en EtOH al 20 % (EFS) hasta su envasado.
- 55 Envasado
- toda la resina de los tubos se mezcló en un recipiente.
- Si las perlas se asentaban, se giraba suavemente el recipiente para conseguir una suspensión homogénea.
- 60
  - se llenó con la suspensión una jeringa estéril con punta de catéter de 50 ml.
  - la carcasa se llenó delicadamente con la suspensión. Si fue necesario rellenar, se utilizó el mismo método anterior.
- 65

- Cuando se aproximaba el llenado del filtro, se abría la tapa del cierre luer de salida para permitir que cualquier volumen sobrante de solución de conservación saliera del filtro. La salida se cerró cuando el compartimento de resina estuvo lleno.

5 El producto envasado se almacenó según las especificaciones del producto.

#### Ejemplo 1.2 - Síntesis del conjugado 2

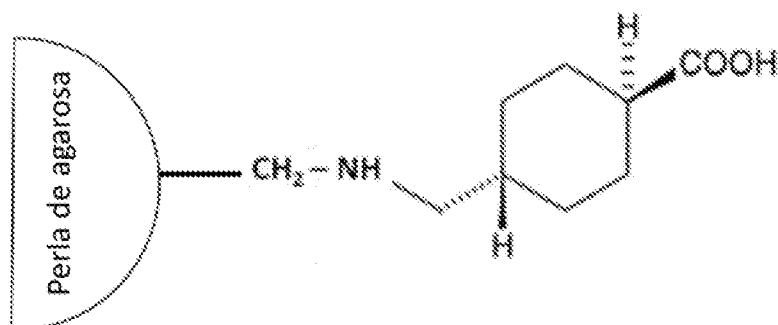


10 La reacción para la preparación del conjugado 2 se representa esquemáticamente en la **Figura 1**.

Más concretamente, se empleó el siguiente procedimiento:

- 15 1. Se lavó una cantidad de 4,2 ml de Sepharose 4B200 (Sigma Aldrich) con acetona a través de un embudo de vidrio filtrante utilizando un agitador. Se consideró que la Sepharose contenía 1 ml de grupo funcional reactivo y, por tanto, que 4,2 ml contenían 4,2 mmol.
2. Se agregó anhídrido succínico (0,42, 4 mmol) a la mezcla de perlas en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 ml) seguido de una adición de piridina (0,339 ml). La mezcla se agitó durante toda la noche.
- 20 3. Las perlas se limaron y lavaron con acetona.
4. Las perlas se suspendieron en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se agregó N-Hidroxisuccinamida NHS (0,483 g) seguido de una adición de EDC (0,8 g). La mezcla se agitó durante toda la noche y luego se filtró.
- 25 5. El producto se suspendió en DMF (3 ml), se agregaron N,N-diisopropiletil amina (0,54 g) y 4-(AMINOMETIL)-CICLOHEXANECARBOXILICO (0,66 g). La mezcla se agitó durante toda la noche. El producto se lavó con acetona y se suministró para posteriores pruebas.

30 Ejemplo 1.3 - Síntesis del conjugado 3 ("Resina de agarosa TXA-Glioxal")



#### 35 Procedimiento

1. Lavar las perlas de agarosa glioxal con agua destilada utilizando un filtro de vidrio.
2. Preparar la solución de ligando y comprobar la actividad y/o la absorbancia a 280 nm.
- 40 3. Agregar 1 ml de perlas de agarosa glioxal a 9 ml de solución TXA en un tampón con un pH 10.05.
4. Agitar delicadamente y comprobar el pH continuamente, Extraer las alícuotas de la suspensión y analizar la actividad o la absorbancia a 280 nm.

45

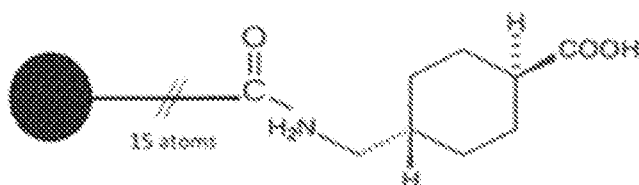
5. Continuar agitando delicadamente durante varias horas o hasta que las mediciones de actividad permanezcan constantes, lo que indica una inmovilización completa. Evitar la agitación magnética. Nota: Una inmovilización más prolongada favorece una fuerte reacción biomolécula/perla y la estabilidad, aunque puede dar lugar a distorsiones desfavorables.

6. Cuando la actividad/absorbancia sea constante, agregar 10 mg de borohidruro sódico sólido a la suspensión y agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente en un recipiente abierto para permitir la salida del hidrógeno. No realizar este paso cerca de una llama abierta. Si es posible, realizarlo cerca de un extractor.

7. Lavar la suspensión con un tampón de fosfato 25 mM pH 7.0 utilizando un filtro de vacío para eliminar el exceso de borohidruro. Posteriormente, lavar bien la suspensión con agua destilada y filtrar hasta que quede seca.

8. Las Perlas de Agarosa Glioxal acopladas al ligando deben conservarse a 4-10 °C en un conservante que contenga un 20 % de Etanol en Agua.

Ejemplo 1.4 - Síntesis del conjugado 4 ("Resina de agarosa TXA-ECH")



Conjugación del Ácido tranexámico (TXA) con perlas de agarosa ECH (G-Biosciences, #786-1223)

1. Preparar la solución de ligando - 50 mM TXA en agua ligera, pH ajustado a 5.2 con HCl.

2. Lavar 2 mL de resina en 10 mL de agua ligera. Centrifugar 3min\*500g.

3. Lavar la resina en 160 mL de 0,5M de NaCl.

4. Agregar 4 mL de solución de ligando a la resina escurrida.

5. Agregar EDC (agente de acoplamiento) para obtener 100 mM en la reacción final.

6. Girar durante 1 hora, ajustar el pH a 5,0 con HCl. Seguir girando durante la noche.

7. Centrifugar la resina y decantar.

8. Lavar la resina en tres ciclos de soluciones alternas:

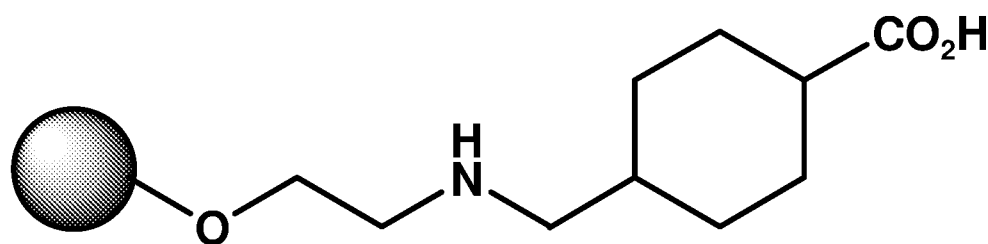
a. 0,1M de Acetato, 0,5M de NaCl, pH 4.0

b. 0,1M de Tris-HCl, 0,5M de NaCl, pH 8.0

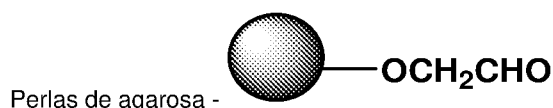
9. Lavar dos veces en agua ligera.

10. Lavar una vez y conservar en EtOH al 20 % a 2-8 °C.

Ejemplo 1.5 - Síntesis del conjugado 5



Reactivo - Cianoborohidruro de sodio

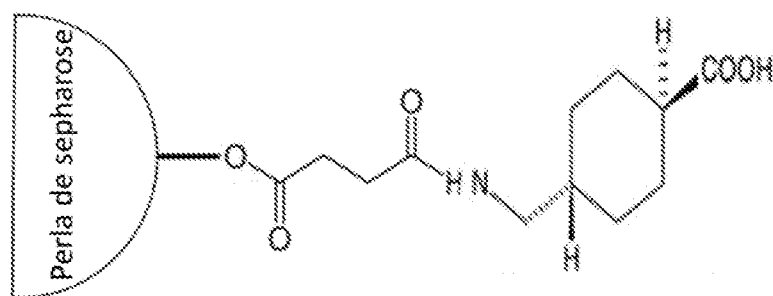


En la primera etapa se prepara la base de Schieff, que luego se reduce con cianoborhidruro sódico ( $\text{NaCNBH}_3$ ) o preferentemente con borohidruro sódico ( $\text{NaBH}_4$ ) para crear el material final. El doble enlace en la base de Schieff se caracteriza por una absorbancia IR de entre 1590-1690  $\text{cm}^{-1}$ . El carbonilo en el aldehído es su material de partida característico por una absorbancia IR de entre 2700-2900  $\text{cm}^{-1}$ . En el material final, también se necesita ácido tanzámico.

Más concretamente, se empleó el siguiente procedimiento:

1. Las Perlas de Agarosa Glioxal se lavaron con agua destilada utilizando un filtro de vidrio.
  2. Se preparó la solución de ligando y se comprobó la actividad y/o la absorbancia a 280 nm.
  3. Se agregó una cantidad de 1 ml de perlas de agarosa glioxal a 9 ml de solución de ligando en un tampón con un pH 10.05. Si el ligando no era estable a temperatura ambiente, los pasos siguientes se ejecutaron en cámara fría.
  4. Se agitó delicadamente y se comprobó el pH con frecuencia. Se retiraron las alícuotas de la suspensión y se realizaron ensayos de actividad o absorbancia a 280 nm.
  5. Se mantuvo una agitación delicada durante varias horas o hasta que las mediciones de actividad permanecieron constantes, lo que indica una inmovilización completa. Se evitó la agitación magnética.
- Nota: Una inmovilización más prolongada favorece una fuerte reacción biomolécula/perla y la estabilidad, aunque puede dar lugar a distorsiones desfavorables.
6. Cuando la actividad/absorbancia fue constante, se agregaron 10 mg de borohidruro sódico sólido a la suspensión y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente en un recipiente abierto para permitir la salida del hidrógeno. Este paso no se realizó cerca de una llama abierta, sino más bien cerca de un extractor, si era posible.
  7. La suspensión se lavó con un tampón de fosfato 25 mM pH 7.0 utilizando un filtro de vacío para eliminar el exceso de borohidruro. Posteriormente, la suspensión se lavó a fondo con agua destilada y se filtró hasta que quedó seca.
  8. Las Perlas de Agarosa Glioxal acopladas al ligando se conservaron a 4-10 °C en un conservante que contenga un 20 % de Etanol en Agua.

Ejemplo 1.6 - Síntesis del conjugado 6 Resina de Sepharose TXA



1. Se lavó una cantidad de 4,2 ml de perlas de Sepharose con acetona a través de un embudo de vidrio filtrante utilizando un agitador.
2. Se agregó anhídrido succínico (0,42, 4 mmol) a la suspensión de perlas en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 ml) seguido de la adición de piridina (0,339 ml). La mezcla se agitó durante toda la noche.
3. Las perlas se limaron y lavaron con acetona.
4. Las perlas se suspendieron en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se agregó N-Hidroxilsuccinamida NHS (0,483 g) seguida de la adición de EDC (0,8 g). La mezcla se agitó durante toda la noche y luego se filtró.

5. El producto se suspendió en DMF (3 ml), se agregaron N,N-diisopropiletil amina (0,54 g) y 4-(AMINOMETIL)-CICLOHEXANECARBOXILICO (0,66 g). La mezcla se agitó durante toda la noche.

Las perlas finales se lavaron dos veces con acetona, también se lavaron en etanol al 70 %, se centrifugaron y se suspendieron en etanol al 20 %.

## Ejemplo 2

Evaluación de la actividad de perlas de agarosa ECH conjugadas con TXA de nueva síntesis, Sterogene Superflow y Perlas de Agarosa Glioxal - Conjugado 1

### Materiales:

- Plasma: El plasma de donantes sanos se obtuvo del Banco de Sangre MDA. El plasma utilizado fue Rh negativo, así como negativo a diferentes antígenos virales (p. ej., VHB, VHC, HTLV, VIH).

- Perlas:

- Perlas de Agarosa Glioxal conjugadas con TXA sintetizadas según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 (Preparación del **Conjugado 1**)

- Perlas de agarosa ECH conjugadas con TXA (nuevas perlas), laboratorios Daren.

- Sterogene Superflow (perlas sterogene).

- Instrumentos:

Agitador: KRS-3016 (MRC)

Lector ELISA: 800TS (BioTek).

El experimento se llevó a cabo en un entorno no estéril.

- Preparación de las soluciones:

Tampón de unión (30 ml):

Citrato de sodio (10 mM)- 0,3 ml

NaCl (120 mM; fecha de preparación:25/09/2017)

Agua ligera = 28,5 ml

Depleción del plasminógeno

- Las perlas ya se conservaron en etanol al 20 % y resina al 70 %. Se transfirió una cantidad de 1 ml de perlas a tubos de 15 ml.

- Los tubos se llenaron de agua y

- Los tubos se centrifugaron a 300x g durante 2 min a TA°C.

- Se eliminó el sobrenadante.

- Estos pasos se repitieron 3 veces

- Las perlas se suspenden en un tampón de unión\*:

- 10 mM de citrato de sodio PH=7.16

- 120 mM de cloruro sódico.

- Se realizó un centrifugado como en la sección 3.

- Se eliminó el sobrenadante.

9. Estos pasos se repitieron 2 veces

10. Se agregó una cantidad de 1 ml de plasma 74E a las perlas.

5 11. La mezcla se mezcló a fondo invirtiéndola delicadamente y se incubó 2 h a temperatura ambiente (si se agitaba en agitador de placas- 80 rpm).

12. Se realizó un centrifugado como en la sección 3 y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo que contenía **depleción del plasma en plasminógeno**.

10

13. La depleción del plasma se comprobó mediante la prueba ELISA.

14. El resto del plasma (no deplecionado y deplecionado) se incubó a -20°C.

15 Detección de PLG

Se utilizó el Kit ELISA Ab108893 para Plasminógeno Humano (abacam®) según las instrucciones del Fabricante.

Las placas se prepararon (dilución de plasma 1:20.000) tal y como se muestra en la **Tabla 3**:

20

3: Preparación de las placas

	1	2
A	En blanco	Plasma (no deplecionado 47E)
B	↓	↓
C	Conjugado 1	
D	↓	
E	Conjugado 3	
F	↓	
G	Perlas de agarosa ECH conjugadas con TXA Conjugado 3	
H	↓	

Preparación del reactivo

25

Todos los reactivos fueron equilibrados a temperatura ambiente (18-25 °C) antes de usarse. Se prepararon reactivos frescos inmediatamente antes de su uso.

1- 1X Diluyente M: Dilución de 1,5 ml de Diluyente M Concentrado 10X 1:10 en 15 ml de agua grado reactivo. Mezcla bien con delicadeza.

30

2- 1X Tampón de Lavado: Dilución de 2 ml de Tampón de Lavado 20X, Concentración 1:20 en 38 ml de agua grado reactivo. Mezcla bien con delicadeza.

3- 1X Anticuerpo Detector de Plasminógeno Biotinilado: En primer lugar centrifugar el vial de 50X Anticuerpo de Plasminógeno Biotinilado para recoger el contenido del fondo. Agregar 12 µl de 50X de solución madre de Anticuerpo de Plasminógeno Biotinilado a los 588 µl de 1X Diluyente M. Mezclar con delicadeza y a fondo.

35

4- 1X Conjugado EP: Centrifugar brevemente el conjugado 100X de estreptavidina-peroxidasa (conjugado EP) y diluir los 6 µl del conjugado 1:100 en 594 µl de 1X Diluyente M.

40

Preparación del estándar:

1- el estándar se equilibró a temperatura ambiente.

45

2- Se etiquetaron siete tubos n.º 2 - 8

3- Agregar 120 µL de 1X Diluyente M a los tubos n.º 2 - 8.

4- Preparar el Estándar n.º 2, agregando 120 µL del Estándar n.º 1 en el tubo n.º 2 y mezclando delicadamente.

50

5- Preparar el Estándar n.º 3, agregando 120 µL del Estándar n.º 2 en el tubo n.º 3 y mezclando delicadamente.

6- Usar la tabla siguiente como guía para preparar las posteriores diluciones en serie.

7- 1X Diluyente M se utiliza como estándar cero, 0 ng/mL (tubo n.º 8).

#### Preparación de la muestra

Las muestras se diluyen 1:20.000 con Diluyente M 1X en diluciones en serie:

a- 1:100 de plasma = 5 µl de plasma + 495 µl 1X de diluyente M.

b- 1:20.000 de plasma = 5 µl de plasma diluido + 995 µl 1X de diluyente M.

Se emplearon los siguientes procedimientos:

1- Se prepararon todos los reactivos, estándares de trabajo y muestras siguiendo las instrucciones. El ensayo se realiza a temperatura ambiente (18-25 °C).

2- Las tiras de microplacas sobrantes se retiraron del marco de la placa y se devolvieron inmediatamente a la bolsa de aluminio con desecante en su interior. La bolsa se volvió a cerrar de forma segura para minimizar la exposición al vapor de agua y se almacenó en un desecador al vacío.

3- Se agregó una cantidad de 50 µL del estándar de plasminógeno o de la muestra por pocillo. Los pocillos se cubrieron con una cinta de sellado y se incubaron durante una hora. El temporizador se puso en marcha tras la última adición de muestra.

4- Los pasos de lavado se realizaron cinco veces a mano con 200 µL de 1X Tampón de Lavado. En cada ocasión se invirtió la placa y se decantó el contenido (colocándola 4 veces sobre papel absorbente de cocina para eliminar completamente el líquido).

5- Se agregó una cantidad de 50 µL de 1X Anticuerpo de Plasminógeno Biotinilado a cada pocillo y se incubó durante una hora.

6- La microplaca se lavó como se ha descrito anteriormente.

7- Se agregó una cantidad de 50 µL de 1X Conjugado EP a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos. Se encendió el lector de microplacas y se configuró previamente el programa.

8- La microplaca se lavó como se ha descrito anteriormente.

9- Se agregó una cantidad de 50 µL de sustrato cromógeno por pocillo y se incubó durante unos 12 minutos o hasta que se desarrolló la densidad óptima de color azul (golpeando suavemente la placa para asegurar una mezcla completa y rompiendo las burbujas en el pocillo con la punta de la pipeta).

10- Se agregó una cantidad de 50 µL de Solución de Parada a cada pocillo. El color cambió de azul a amarillo.

11- La absorbancia se leyó inmediatamente en un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm.

Se observaron los siguientes resultados:

#### • Concentración de PLG:

Los resultados de la curva estándar\* se resumen en la Tabla 4 y se ilustran en la **Figura 3**:

Tabla 4: D.O del Estándar a 450 nm

Muestra	D.O	Datos eliminados	D.O medio	Concentración
STD1	0,071	0,001	0	0
	0,07	-0,001		
STD2	0,227	0,157	0,1455	1,25
	0,204	0,134		
STD3	0,366	0,296	0,2805	2,5
	0,335	0,265		
STD4	0,607	0,537	0,5105	5
	0,554	0,484		
STD5	1,031	0,961	0,934	10

	0,977	0,907		
STD6	1,664	1,594	1,533	20
	1,542	1,472		
STD7	2,173	2,103	2,0995	40
	2,167	2,096		
STD8	2,481	2,411	2,5075	80
	2,674	2,604		

Se obtuvo la fórmula que se muestra en la Tabla 5. De esta forma, se calcularon las concentraciones y el porcentaje de depleción de las muestras, que se presentan en la Tabla 6.

5 Tabla 5: Fórmula obtenida a partir de la curva patrón

Nombre de la curva	Fórmula de la curva	A	B	C	D	R2
Curva estándar	$Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D$	0,0158	1,17	19,6	3	1

Tabla 6. Concentraciones de PLG en las muestras

Muestra	D.O	Datos eliminados	D.O Medio	Concentración (µg/ml)	% de depleción
En blanco	0,062	-0,002	0	0	
	0,066	0,002			
Conjugado 1	0,148	0,084	0,0825	14,1	92,4 %
	0,145	0,081			
Conjugado 2	0,164	0,1	0,0975	17,14	90,8 %
	0,159	0,095			
Conjugado 4	0,662	0,598	0,594	114,22	38,75 %
	0,654	0,59			
(no deplecionado Plasma 47E)	0,952	0,888	0,9	186,5	
	0,985	0,921			

10 Parece que la concentración de PLG en el plasma no deplecionado es ligeramente superior al intervalo normal de concentración de plasminógeno en el plasma humano (153,1-174,9 µg/ml, según el manual de instrucciones del Kit). Los niveles de plasminógeno se deplecionaron en más de un 92 % tras la incubación con perlas recuperadas TXA Superflow, más de un 90 % de depleción tras la incubación con perlas YA2-2 y un 38 % tras la incubación con perlas de agarosa ECH conjugadas con TXA. Mientras que las perlas recuperadas TXA Superflow y las perlas Y2-2 (perlas de agarosa glioxal conjugadas con TXA) mostraron una alta eficacia en la eliminación de plasminógeno del plasma, las perlas de agarosa ECH conjugadas con TXA mostraron una baja eficacia.

### Ejemplo 3

20 Evaluación de la actividad de las nuevas perlas de GE conjugadas, perlas Sterogene Superflow

Materiales:

- 25 • Plasma: El plasma de donantes sanos se obtuvo del Banco de Sangre MDA (Anexo 1)

- Perlas:

30 1- Conjugado 1 ("perlas GE conjugadas con TXA") - pH 6.5, 7.5, 8.5. Para el protocolo de síntesis, véase el Ejemplo 1.

2- "Perlas Sterogene Superflow recubiertas de TXA" [**Conjugado-6**]

- 35 • método n.º 1: Las perlas se han utilizado para el experimento con cerdos y se han recuperado. Instrumental:

1- Agitador: KRS-3016 (MRC)

2- Lector ELISA: 800TS (BioTek).

- 40 • El experimento se llevó a cabo en un entorno no estéril.



## Depleción del plasminógeno

1. a. Las perlas Sterogene TXA superflow se conservaron en Etanol al 20 % y resina al 70 %. Se transfirió una cantidad de 1 ml de perlas a tubos de 15 ml.

b. 1 ml de cada reacción de perlas GE conjugadas con TXA ya listas en Etanol al 20 % y resina al 70 %.

2. Los tubos se llenaron de agua.

3. Centrifugar a 300x g durante 2 min a TA.

4. Se eliminó el sobrenadante.

5. Repetir X3

6. Las perlas se suspendieron en un tampón de unión\*:

a- 10 mM de citrato de sodio PH=7.16

b- 120 mM de Cloruro sódico.

7. Centrifugar como en la sección 3.

8. se eliminó el sobrenadante.

9. Repetir X2

10. Se agregó una cantidad de 1 ml de plasma 27K a las perlas.

11. Los tubos se mezclaron a fondo invirtiéndolos delicadamente y se incubaron 2 h a temperatura ambiente (para agitar en agitador de placas- 80 rpm).

12. Se centrifugó como en la sección 3 y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo - **Plasma deplecionado en plasminógeno**

13. La depleción del plasma se comprobó mediante la prueba ELISA.

14. El resto del plasma (no deplecionado y deplecionado) se incubó a -20°C.

## Detección de PLG

Se utilizó el Kit ELISA Ab108893 para Plasminógeno Humano (abacam®) según las instrucciones del Fabricante.

Las Placas se prepararon como sigue (dilución de plasma 1:20.000):

**Tabla 7:** preparación de la placa:

	1	2
A	En blanco	Conjugado 1 perlas (método n.º 1)
B	↓	↓
C	Reacción 1, PH=6.5	Conjugado 1 perlas (método n.º 2)
D	↓	↓
E	Reacción 1, PH=7.5	No deplecionado 27K
F	↓	↓
G	Reacción 1, PH=8.5	
H	↓	

## Preparación de los reactivos:

Todos los reactivos deben estar equilibrados a temperatura ambiente (18-25 °C) antes de usarse. Preparar reactivos frescos inmediatamente antes de su uso.

1X Diluyente M: 2 ml de 10X Diluyente M Concentrado se diluyeron 1:10 en 18 ml de agua grado reactivo. Mezcla bien con delicadeza.

1X Tampón de Lavado: 4 ml de 20x Tampón de Lavado Concentrado se diluyeron 1:20 en 76 ml de agua de calidad reactiva. Mezcla bien con delicadeza.

5 1X Anticuerpo Detector de Plasminógeno Biotinilado: Ese centrifugó un vial de 50X Anticuerpo de Plasminógeno Biotinilado para recoger el contenido del fondo. Agregar 18 µl de 50X de solución madre de Anticuerpo de Plasminógeno Biotinilado a los 882 µl de 1X Diluyente M. Mezclar con delicadeza y a fondo.

10 1X Conjugado EP: Se centrifugó brevemente el conjugado 100X de Estreptavidina-Peroxidasa (conjugado EP) y se diluyeron 9 µl del conjugado 1:100 en 891 µl de 1X Diluyente M.

Los **estándares** se prepararon como se detalla en el Ejemplo 2. Los resultados de la curva estándar se resumen en la **Tabla 4** y se ilustran en la **Figura 2**. Se obtuvo la fórmula que se muestra en la **Tabla 5**.

15 Preparación de la muestra:

Las muestras se diluyeron 1:20.000 con Diluyente M 1X en diluciones en serie:

20 a- 1:100 de plasma = 5 µl de plasma + 495 µl 1X de diluyente M.

b- 1:20.000 de plasma = 5 µl de plasma diluido + 995 µl 1X de diluyente M.

Procedimiento del ensayo:

25 12- Se prepararon todos los reactivos, estándares de trabajo y muestras siguiendo las instrucciones. Los reactivos se equilibraron a temperatura ambiente antes de usarlos. El ensayo se realizó a temperatura ambiente (18-25 °C).

30 13- Las tiras de microplacas sobrantes se retiraron del marco de la placa y se devolvieron inmediatamente a la bolsa de aluminio con desecante en su interior. La bolsa se volvió a cerrar de forma segura para minimizar la exposición al vapor de agua y se almacenó en un desecador al vacío.

35 14- Se agregó 50 µL del Estándar de Plasminógeno o de la muestra por pocillo. Los pocillos se cubrieron con una cinta de sellado y se incubaron durante una hora. El temporizador se puso en marcha tras la última adición de muestra.

15- Se lavó cinco veces a mano con 200 µL de 1X Tampón de Lavado. En cada ocasión se invirtió la placa y se decantó el contenido (colocándola 4 veces sobre papel absorbente de cocina para eliminar completamente el líquido).

40 16- Se agregaron de 50 µL de 1X Anticuerpo de Plasminógeno Biotinilado a cada pocillo y se incubó durante una hora.

17- Lavado de la microplaca como se ha descrito anteriormente.

45 18- Se agregó una cantidad de 50 µL de 1X Conjugado EP a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos. Se encendió el lector de microplacas y se configuró previamente el programa.

19- Lavado de la microplaca como se ha descrito anteriormente.

50 20- Se agregó una cantidad de 50 µL de Sustrato Cromógeno por pocillo y se incubó durante unos 12 minutos o hasta que se desarrolló la densidad óptima de color azul (golpeando suavemente la placa para asegurar una mezcla completa y rompiendo las burbujas en el pocillo con la punta de la pipeta).

55 21- Se agregaron 50 µl de Solución de Parada a cada pocillo. El color cambió de azul a amarillo.

22- La absorbancia se leyó inmediatamente en un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm.

• **Concentración de PLG:**

60 Las concentraciones y el porcentaje de depleción de las muestras se calcularon según la fórmula detallada en la Tabla 5 y que se presenta en la Tabla 8.

65

Tabla 8: Concentraciones de PLG en las muestras

Muestra	D.O	Datos eliminados	D.O Medio	Concentración (µg/ml)	% de depleción
En blanco	0,081	-0,002	0	0	
	0,084	0,002			
Reacción 1, PH=6.5	0,472	0,389	0,389	76,5	63,73 %
	0,472	0,389			
Reacción 2, PH=7.5	0,486	0,403	0,408	80,12	62,02 %
	0,495	0,412			
Reacción 3, PH=8.5	0,573	0,49	0,477	73,86	54 %
	0,56	0,464			
Conjugado 1	0,15	0,067	0,0615	13,58	93,56 %
	0,138	0,056			
Plasma no deplecionado 27K	1,059	0,976	0,98	210,96	
	1,067	0,984			

Parece que la concentración de PLG en el plasma no deplecionado es ligeramente superior al intervalo normal de concentración de plasminógeno en el plasma humano. Se recuperó alrededor del 24 % del Plasminógeno deplecionado tras la incubación del plasma con perlas TXA Superflow utilizando el método nº1 y más del 93 % tras la incubación con perlas recuperadas utilizando el método nº2. Por lo tanto, las perlas con un 24 % de depleción deben recuperarse de nuevo y las que tienen un 93 % pueden volver a utilizarse en el experimento con cerdos. Mientras que las perlas de GE conjugadas con TXA sintetizadas en PH= 6.5 o PH=7.5 mostraron más del 60 % de depleción de PLG, las que se sintetizaron en PH=8.5 mostraron un 54 % de depleción. Este experimento demuestra que la reacción es más eficiente con un PH=6.5. Los futuros experimentos se llevarán a cabo durante la noche o con diferentes concentraciones de ligando en la reacción.

#### Ejemplo 4

Filtrado del plasma con ClearPlasma

#### • TXA superflow, conjugado 1

Preparación del filtro:

- 1- se envasaron 25 ml de resina en el filtro.
- 2- 100 ml de etanol al 70 % pasaron por el filtro y se incubaron durante 30 minutos.
- 3- se lavó dos veces con Etanol al 70 %.
- 4- se lavó tres veces con Etanol al 20 %.
- 5- se almacenó a 4 °C.

Activación de la resina:

La resina se lavó tres veces con agua ligera y dos veces con un tampón de unión (citrato sódico 10 mM + cloruro sódico 120 mM).

Filtración del plasma:

La bolsa de plasma humano se conectó al filtro y todo el volumen (200 ml) fluyó a través del filtro hacia la bolsa receptora durante 1 hora.

Los resultados se presentan en la siguiente **Tabla 9**.

Tabla 9. Porcentaje de depleción en la muestra

Muestra	DO	OD eliminados	D.O medio	Concentración (µg/ml)	% de depleción
Plasma deplecionado	0,293	0,19	0,185	29,22	81,56 %
	0,282	0,179			

Plasma tratado	no	0,868	0,889	0,78	158,52	
		0,765	0,796			

Tal y como se muestra en la Tabla 9, la filtración del plasma produjo una depleción eficaz del plasminógeno.

• **Dispositivo ClearPlasma™ Perlas de conjugado TXA y/o perlas de agarosa de ácido ciclohexanocarboxílico = Conjugado 1.**

Materiales:

- Plasma: El plasma de donantes sanos se obtuvo del Banco de Sangre Magen David Adom (MDA)
- Dispositivo ClearPlasma™: el cartucho se llenó con perlas de agarosa conjugada con ácido ciclohexanocarboxílico = conjugado 2 utilizando pipetas Pasteur de 3 ml; la resina se lavó con 150 ml de solución salina y se conservó a 2-8 °C.
- Instrumental: Lector ELISA: 800TS (BioTek).

Se conectó una cantidad de 250 ml de plasma al dispositivo mediante un cierre luer y se hizo fluir a través del dispositivo a una velocidad de 2 gotas/segundo durante unos 30 min. El plasma deplecionado se recogió en tapones estériles. Se tomaron muestras del plasma no tratado y del plasma deplecionado para su análisis y el resto se congeló a -20 °C. La concentración de plasminógeno se determinó mediante el Kit ELISA E-80PMG para Plasminógeno Humano, Lote n.º 9 (ICL, Inc.).

Tabla 10. Porcentaje de depleción en la muestra

Muestra	Concentración (µg/ml)	Depleción %
Plasma no tratado (control)	172,646	96 %
Plasma deplecionado en plasminógeno	7,07	

Parece que se eliminó más del 96 % de PLG del plasma tras la filtración con el dispositivo ClearPlasma™ descrito anteriormente.

Ejemplo 5

Evaluación de la eficacia del dispositivo Clear Plasma en la depleción de los niveles de plasminógeno del crioprecipitado mediante el uso de ClearPlasma

El crioprecipitado es un importante derivado plasmático utilizado para tratar hemorragias, especialmente las hemorragias masivas. Por ello, se evaluó la capacidad del dispositivo ClearPlasma para deplecionar el plasminógeno del crioprecipitado.

Materiales:

- a. ClearPlasma: Filtro de plástico (Pentacore Inc.), Resina de conjugado TXA Superflow (Sterogene; Lote: 1608:88), Línea de extensión con regulador de flujo (Qosina; Lote: 159299), Bolsa de extracción de sangre (Fresenius; Lote: FA17H30126).
- b. Instrumental:
  - i. Agitador: Cat n.º. KRS-3016; S/N: SH30000003; Fabricante: MRC.
  - ii. Lector ELISA: Cat n.º. 800TS; S/N: 1709201B; Fabricante: BioTek
  - iii. Centrifugado: Cat n.º. Z383K; S/N: 31030005; Fabricante: HERMLE.a.
- c. Crioprecipitado: El crioprecipitado se obtuvo del Banco de Sangre de Hadassah (más detalles sobre el crioprecipitado en el anexo 1). (Y 2002 18 170007 O Rh positivo)

El experimento se llevó a cabo según a lo descrito en los Procedimientos experimentales. Los datos muestran que una sola pasada de una unidad de crioprecipitado (29 ml) por ClearPlasma disminuyó la concentración de plasminógeno en el crioprecipitado de 155,87 a 2,7 µg/ml, es decir, aproximadamente un 98 % (véase la Figura 3) sin

ningún efecto sobre los factores de coagulación. Así pues, el dispositivo ClearPlasma es adecuado para la depleción del plasminógeno del crioprecipitado. La depleción del plasminógeno del crioprecipitado proporciona un nuevo producto con mayor capacidad para tratar las hemorragias.

## 5 Ejemplo 6

Evaluación de la concentración de plasminógeno activo in vivo.

10 Por poco tiempo, se extrajo Sangre fresca de voluntarios sanos. Se agregaron 50 µl de tPA (6 µM) o solución salina normal (SN) a 1,8 ml de sangre fresca y se determinó el tiempo de coagulación utilizando el aparato Hemochron 401. En experimentos paralelos se agregaron 50 µl de tPA (6 µM) o SN a 1,8 ml de plasma deplecionado en plasminógeno.

Para evaluar el efecto del conjugado de la materia tratada en la presente descripción, se evaluaron dos parámetros. El tiempo de coagulación y el tiempo de lisis total del coágulo.

15 Tiempo de coagulación

El tiempo de coagulación era inversamente proporcional a la concentración de plasminógeno activo.

20 En la sangre de control, el tiempo de coagulación fue de  $113 \pm 27$  segundos ( $n=7$ ), mientras que en la sangre tratada con tPA fue de  $255 \pm 41$  segundos ( $n=8$ ). En la sangre empobrecida en plasminógeno, el tiempo de coagulación en ausencia de tPA fue de  $110 \pm 16$  ( $n = 6$ ), mientras que en presencia de tPA fue de  $118 \pm 18$  ( $n = 7$ ).

Tiempo de lisis total del coágulo

25 La presencia de coágulo sanguíneo se determinó por simple observación y volviendo a introducir el tubo con coágulo sanguíneo en la máquina.

30 El coágulo desapareció de la sangre de control tratada con tPA tras  $14 \pm 5,2$  min ( $n = 6$ ). En cambio, en la sangre de control tratada con SN, el coágulo sanguíneo estaba intacto a las 2 horas de la formación completa del coágulo.

En la sangre empobrecida en plasminógeno con o sin tPA, el coágulo estaba intacto 2 horas después de la formación completa del coágulo. Estos resultados demuestran claramente la eficacia del conjugado de la materia tratada en la presente descripción.

## 35 Ejemplo 7

Evaluación de la eficacia de la plasmaféresis en un modelo porcino de laceraciones hepáticas

40 Este estudio tenía como objetivo investigar el uso de ClearPlasma™ y el beneficio del plasma deplecionado en plasminógeno, en comparación con el plasma normal. El estudio se realizó en Biotechfarm Ltd. (Israel).

Objetivo

45 El objetivo fue el de evaluar la eficacia de la administración de PEP sobre la pérdida de sangre en un modelo de Laceración Hepática Porcina.

Criterios de valoración del estudio

50 Pérdida de sangre medida 30 min después de las laceraciones hepáticas de 4 cm y evaluada según el esquema de clasificación que se presenta a continuación.

Tabla 11: Esquema de graduación del sangrado en el modelo de laceraciones hepáticas porcinas

Categoría	Hemorragia mínima	Hemorragia moderada	Hemorragia masiva
Cantidad de pérdida de sangre	0-100 ml	100-300 ml	X>300 ml

55 Duración del estudio

De ocho a nueve horas por cerdo

60

## Diseño del estudio

Se asignaron catorce cerdos domésticos hembras a 4 grupos (control, plasma normal, ClearPlasma™ y TXA)

Los grupos se trataron como o sigue:

## 5 Grupo de Control 1:

1. Inducción de anestesia general.
2. Recogida de plasma durante 90 minutos.
3. Inducción de laceraciones hepáticas 30 minutos después de la finalización de la recogida de plasma.
4. Cierre de la pared abdominal y de la piel 30 minutos después de la inducción de las laceraciones hepáticas.

## 15 Grupo de Control 2:

1. Inducción de anestesia general.
2. Inducción de laceraciones hepáticas 30 minutos después de la finalización de la recogida de plasma.
3. Cierre de la pared abdominal y de la piel 30 minutos después de la inducción de las laceraciones hepáticas.

## Grupo de Control 3:

1. Inducción de anestesia general.
2. Tratamiento con TXA
3. Inducción de laceraciones hepáticas 30 minutos después de la finalización de la recogida de plasma.
4. Cierre de la pared abdominal y de la piel 30 minutos después de la inducción de las laceraciones hepáticas.

## Grupo de Prueba:

1. Inducción de anestesia general.
2. Recogida de plasma - filtración con ClearPlasma™ (grupo del Dispositivo de Prueba) durante 90 minutos.
3. Inducción de laceraciones hepáticas 30 minutos después de la finalización de la recogida de plasma.
4. Cierre de la pared abdominal y de la piel 30 minutos después de la inducción de las laceraciones hepáticas

Tabla 12: Asignación de animales (estudio de laceración hepática porcina)

Experimento n.º	Animal n.º	Tratamiento
1	143	Plasma normal
	144	PEP
2	145	Plasma normal
	146	PEP
	147	TXA
3	152	PEP
	153	TXA
	156	Plasma normal
4	155	PEP
	157	Plasma normal
5	169	Plasma normal
	170	TXA
	172	PEP
	173	Control
Plasma normal = plasma fresco congelado (PFC); PEP (plasma deplecionado en plasminógeno) = PFC con plasminógeno eliminado mediante ClearPlasma™; TXA = ácido tranexámico.		

#### Procedimientos del estudio

1. Se administró buprenorfina antes de la inducción de la anestesia.
- 5 2. Anestesia - Los animales fueron sedados con Ketamina, Xilacina y Atropina, posteriormente intubados con tubo endotraqueal; la anestesia se mantuvo con Isoflurano en oxígeno.
3. Se colocó un catéter en una vena auricular accesible para el acceso vascular.
- 10 4. Se introdujo una cánula venosa central (CVC) en cada vena yugular para la aplicación de la recogida de plasma.
5. Se recogió el plasma durante 90 minutos. Después, se realizó la transfusión de plasma con ClearPlasma™ o sin él.
- 15 6. Treinta minutos después de la recolección de plasma, se indujeron los modelos de laceraciones hepáticas de la siguiente forma:
  - Los cerdos se colocaron en posición supina.
  - 20 - Se realizó el clipaje y limpieza de la zona ventral.
  - Se practicó una incisión en la línea media.
  - 25 - Se expuso y exteriorizó el lóbulo derecho del hígado para permitir un campo de trabajo suficiente y, a continuación, se enjuagó con solución salina fisiológica.
  - Se realizó una cuadrícula de laceraciones de 4 cm (longitud), separadas 1 cm y de 0,5 cm de profundidad, (se pesó el trozo de hígado).
  - 30 7. La pérdida de sangre se midió determinando la diferencia de peso entre las esponjas secas y las manchadas de sangre tras la inducción del modelo. La diferencia de peso se expresó como pérdida de sangre en gramos.
  - 8. Se midió el tiempo hasta la hemostasia (TTH), en caso necesario.
  - 35 9. Treinta minutos después de la inducción de las laceraciones, se cerraron la pared abdominal y la piel.

#### Monitorización de los Parámetros Fisiológicos

- 40 Antes de la extracción de plasma (referencia), inmediatamente después de la extracción, justo antes de la inducción de las laceraciones hepáticas, durante la hemorragia e inmediatamente después del cierre de la piel:
  - temperatura esofágica,
  - 45 - presión arterial media,
  - frecuencia cardíaca,
  - saturación de oxígeno,
  - 50 - tiempo de coagulación activada,
  - muestra de sangre para CBC,
  - 55 - hematología, bioquímica y parámetros de coagulación, incluyendo el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo parcial de tromboplastina (TPT).
- Antes de la recogida de plasma (referencia), 30 minutos después de la inducción de la laceración hepática (justo antes del cierre) y al final del estudio (5 horas después del cierre):
  - 60 - signos clínicos detallados: tras la recuperación de la anestesia.

#### Antes de la aplicación de la plasmaféresis:

- 65 - peso corporal.

## Cuidados paliativos

Se colocaron mantas sobre los animales para calentar la piel durante la recuperación.

## 5 Eutanasia

Los animales fueron eutanasiados 5 horas después del cierre. Nota: Dos animales con hemorragia continua, durante 60 minutos, tras la inducción de las laceraciones hepáticas (es decir, justo antes del cierre) fue eutanasiado por razones humanitarias.

10

## Métodos de observación clínica

Atributos de comportamiento que incluyen, entre otros, los siguientes:

15 1. Eliminación de sangre, orina y heces, orina decolorada (si procede), diarrea, ausencia de heces (estreñimiento).

2. Signos de enfermedad o lesión, letargo, vómitos, salivación excesiva, postura anormal, dolor, cojera, incomodidad, falta de voluntad o incapacidad para moverse.

20

3. Puntuación de gravedad neurológica (NSS)

4. Se realizaron evaluaciones adicionales siempre que lo justificaban las observaciones clínicas.

## 25 Instrumental

Haemonetics MCS® +, jeringas, agujas y equipos de cirugía de vidrio, monitor de presión arterial, monitores de oxígeno. Todos los diluyentes y soluciones para el lavado y enjuague de los dispositivos o conjuntos de inyección parenteral se trataron de una forma que garantizase que eran estériles, libres de pirógenos y estaban protegidos de la contaminación.

30

## Resultados

En todos los experimentos se recogió plasma de los cerdos utilizando el sistema Haemonetics MCS® +. Se extrajo sangre total, se centrifugó, los hematíes se devolvieron inmediatamente al cerdo y se recogieron hasta 700 ml de plasma que se filtró utilizando ClearPlasma™ (para el grupo de prueba) o no se filtró (para los grupos de control), tal y como se describe en la **Figura 4**. Se anestesió a los cerdos, se les extrajo sangre de la vena y se introdujo en el sistema de plasmaféresis. A continuación, se devolvieron los hematíes al animal y, en los animales del grupo de prueba, se filtró el plasma mediante ClearPlasma™ y se devolvió al animal. Los resultados detallados obtenidos de cada cerdo se muestran en la **Tabla 13**.

40

Tabla 13: Parámetros detallados del experimento de laceración hepática porcina.

Exp. n.º	Cerdo n.º (♀)	Peso Corp. (kg)	Trat.	Fórm. de sol. de citrato dextrosa antig. (ml)	Sang. recd. (ml)	Plasma recd. (ml)	Dur. del sangr. (min)	Cant. del sangr. (gr/ml)	Tam. del corte del hig. (gr.)
1	143	38,8	Plasma normal	189	2186	613	30	406	12
	144	39,1	PEP	185	2431	684	23	150	20
2	145	41,7	Plasma normal	195	2205	312	30	436	22
	146	40,6	PEP	195	2238	700	30	180	20
	147	40,2	TXA (1g de refuerzo y mantenimiento de 35 mg/hora)	0	0	0	12	138	18
3	152	39,4	PEP	203	2577	702	30	430	26
	153	37,4	TXA (1g de refuerzo y mantenimiento de 35 mg/hora)	0	0	0	21	206	28
	156	36	Plasma Normal	202	1300	350	30	530	32
4	155	35,4	PEP	157	2093	750	18	226	20



	157	37,6	Plasma Normal	167	2581	700	28,5	498	22
5	169	40	Plasma Normal	201	1976	415	18	226	26
	170	40	TXA (1g de refuerzo y mantenimiento de 35 mg/hora)	0	0	0	23	158	18
	172	40	PEP	202	2500	650	15	108	24
	173	40	Control (no tratado)	0	0	0	22	146	26
Abreviaturas: trat. (tratamiento), cant. (cantidad), hemor. (hemorragia), Sang. (sangre), Alt. (alto), hig. (hígado), gr. (gramo), exp. (experimento) Pes. (peso), anticoag. (anticoagulante), sol. (solución), fórm. (fórmula), rec. (recoger), dura. (duración), ta. (tamaño). Plasma normal = plasma fresco congelado (PFC); PEP (plasma deplecionado en plasminógeno) = PFC con plasminógeno eliminado mediante ClearPlasma™; TXA = ácido tranexámico.									

Experimento 1: El plasma del cerdo 144 se filtró utilizando ClearPlasma™ y se devolvió al cerdo 144. El plasma del cerdo 143 se transfundió al cerdo 143 tras una filtración simulada. A continuación se preformó un corte de hígado de 4 cm y se registraron la cantidad de sangre y el tiempo de sangrado. Este experimento ha demostrado que la depleción de los niveles de plasminógeno reduce la cantidad de hemorragia. Aunque el tamaño del corte en el hígado fue menor en el cerdo de control, la hemorragia fue mayor que en el cerdo que recibió PEP. Además, la evaluación clínica mejoró y el pulso del cerdo de control fue más rápido e inestable que el del cerdo que recibió PEP.

Experimento 2: Efecto del PEP comparado con el plasma normal y el TXA. Se analizaron tres cerdos de la siguiente forma: el cerdo 145 se trató con plasma normal, el cerdo 146 se trató con plasma deplecionado en plasminógeno y el cerdo 147 se trató con ácido tranexámico (TXA). Los resultados demuestran que el PEP reduce la cantidad de hemorragia en comparación con el plasma normal. Además, hubo una diferencia inferior en la cantidad de hemorragia entre el TXA en comparación con el plasma normal.

Experimento 3: Efecto del PEP comparado con el plasma normal y el TXA. Los resultados demuestran que el PEP reduce la cantidad de hemorragia en comparación con el plasma normal.

Experimento 4: Efecto del PEP comparado con el plasma normal y el TXA. Los resultados demuestran que el PEP reduce la cantidad de hemorragia en comparación con el plasma normal.

Experimento 5: Reducción de la hemorragia tras un corte en el hígado en un cerdo al que se le administró PEP. Se anestesió a los cerdos y se recogió el plasma, tal y como se describe en la sección de material y métodos. Los cerdos fueron tratados con plasma normal, PEP, con TXA 16 mg/kg o sin tratar. A continuación, se cortó el hígado 4 cm con un bisturí, tal y como se describe en la sección de material y método. Los resultados demuestran que el PEP reduce la cantidad de hemorragia en comparación con el plasma normal.

La **Figura 5** muestra la cantidad de sangre perdida durante los 30 minutos posteriores a la laceración hepática. Como puede verse en la **Figura 5**, el uso de ClearPlasma reduce la cantidad de hemorragia en más de un ~50 % en comparación con los cerdos que recibieron plasma normal.

Para validar la reducción de la actividad de proteínas fibrinolíticas como el plasminógeno y el tPA, se realizó una tromboelastografía (TEG) (véanse las **Figuras 6A-6L**). La TEG es un método que se utiliza para comprobar la eficacia de la coagulación sanguínea. Los cerdos se numeraron: n.º 169 -control, n.º 172- plasmaféresis y depleción de plasminógeno; n.º 173 - sólo plasmaféresis. Como puede verse en la **Figura 6J**, sólo en el cerdo n.º 172, no hubo respuesta fibrinolítica tras la administración de tPA. Este resultado demuestra la reducción significativa de proteínas fibrinolíticas como el plasminógeno y el tPA.

En conclusión, en todos los experimentos el uso de ClearPlasma™ mejoró significativamente el resultado clínico y redujo la cantidad de sangre que perdieron los cerdos en comparación con los cerdos que recibieron transfusiones de plasma normales.

#### Ejemplo 8

Evaluación de la seguridad de la administración de plasma deplecionado en plasminógeno sobre la pérdida de sangre en animales tratados con Clexane en un modelo de laceraciones hepáticas porcinas

El estudio se realizó en Biotechfarm Ltd. (Israel).

## Objetivos

Evaluación de la seguridad de la administración de plasma deplecionado en plasminógeno sobre la pérdida de sangre en un modelo de laceraciones hepáticas porcinas. Examinar el efecto de la depleción de plasminógeno en animales tratados con anticoagulantes. Establecer que no existen riesgos de desarrollo de complicaciones tromboembólicas en pacientes con tratamiento con anticoagulantes (Clexane).

## 5 Criterios de valoración del estudio

La pérdida de sangre se midió 30 min tras las laceraciones hepáticas de 4 CM.

## 10 Diseño del estudio

El estudio comparó plasma deplecionado en proteína fibrinolítica y plasma normal en animales tratados con Clexane para comprobar que el tratamiento con PEP no provoca el desarrollo de trombosis venosa profunda (TVP).

15 Especie y sexo: Cerdos ♀ domésticos, 40-50 kg al inicio del estudio.

Número de grupos: 4 (3 de Grupos de Control y 1 Grupo del Dispositivo de Prueba)

Tamaño de los grupos: n=5 (♀) para el Grupo de Control; n=5 (♀) para el Grupo del Dispositivo de Prueba.

20 Número total de animales: 20

Constitución de grupos y dosificación:

25 Grupo de Control 1: 1. Control no tratado: Inducción de anestesia general 2. Recogida de plasma durante 90 minutos. 3. Inducción de laceraciones hepáticas 30 minutos después de la finalización de la recogida de plasma 4. Cierre de la pared abdominal y de la piel 30 minutos después de la inducción de las laceraciones hepáticas.

30 Grupo de Control 2: 1. 4000 Unidades de Clexane: Se inyectaron a los cerdos 4000 Unidades de Clexane 10 horas antes de la cirugía. 2 inducción de anestesia general 3. Inducción de laceraciones hepáticas 30 minutos después de la finalización de la recogida de plasma 4. Cierre de la pared abdominal y de la piel 30 minutos después de la inducción de las laceraciones hepáticas.

35 Grupo de Control 3: 1. Plasma fresco y 4000 Unidades de Clexane: Se inyectaron a los cerdos 4000 Unidades de Clexane 10 horas antes de la cirugía. 2. Inducción de anestesia general 3. Tratamiento con TXA 4. Inducción de laceraciones hepáticas 30 minutos después de la finalización de la recogida de plasma 5. Cierre de la pared abdominal y de la piel 30 minutos después de la inducción de las laceraciones hepáticas.

40 Grupo de Prueba: 1. Plasma deplecionado en plasminógeno y 4000 Unidades de Clexane: Se inyectaron a los cerdos 4000 Unidades de Clexane 10 horas antes de la cirugía. 2 inducción de anestesia general 3. Recogida de plasma - filtración con ClearPlasma™ (grupo del Dispositivo de Prueba) durante 90 minutos. 4. Inducción de laceraciones hepáticas 30 minutos después de la finalización de la recogida de plasma. 5. Cierre de la pared abdominal y de la piel 30 minutos después de la inducción de las laceraciones hepáticas

## 45 Procedimientos del estudio

Se inyectó a los cerdos Jeringas de Clexane® 4.000 UI (40 mg)/0,4 ml de solución inyectable en jeringas precargadas por vía intravenosa (IV) 10 horas antes del tratamiento con PEP o plasma normal.

50 Analgesia: Buprenorfina; anestesia: los animales fueron sedados con Ketamina, Xilacina y Atropina, posteriormente intubados con tubo endotraqueal; la anestesia se mantuvo con Isoflurano en oxígeno.

Se colocó un catéter para el acceso vascular en una vena auricular accesible. Se introdujo una cánula venosa central (CVC) en cada vena yugular para la aplicación de la recogida de plasma.

55 Se recogió plasma durante un periodo de 90 minutos. El plasma se transfundió tras el tratamiento con ClearPlasma™ o sin él.

60 Treinta minutos después de la aplicación de la recolección de plasma, se indujeron laceraciones hepáticas de la siguiente forma:

- Los cerdos se colocaron en posición supina,
- Clipaje y limpieza de la zona ventral.
- Se practicó una incisión en la línea media,

- Se expuso y exteriorizó el lóbulo derecho del hígado para permitir un campo de trabajo suficiente y se enjuagó con solución salina fisiológica.

- 5 - Se realizó una cuadrícula de laceraciones de 4 cm (longitud), separadas 1 cm y de 0,5 cm de profundidad, y se pesó el trozo de hígado,

La pérdida de sangre se midió determinando la diferencia de peso entre las esponjas secas y las manchadas de sangre tras la inducción del modelo. La diferencia de peso se expresó como pérdida de sangre en gramos.

- 10 Se midió el tiempo hasta la hemostasia (TTH), en caso necesario.

Treinta minutos después de la inducción de las laceraciones, se cerró el abdomen y, posteriormente, la piel.

- 15 Monitorización de los parámetros fisiológicos:

Antes de recogida de plasma:

- 20 Referencia, inmediatamente después de la extracción, justo antes de la inducción de las laceraciones hepáticas, durante la hemorragia e inmediatamente después del cierre de la piel.

Temperatura esofágica, presión arterial media, frecuencia cardíaca, saturación de oxígeno, tiempo de coagulación activado, muestra de sangre para hemograma.

- 25 Hematología, bioquímica y parámetros de coagulación, incluyendo el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo parcial de tromboplastina (TPT): antes de la aplicación de la recogida de plasma = referencia, 30 minutos después de la inducción hepática.

- 30 Laceraciones hepáticas (justo antes del cierre) y al final del estudio, 5 horas después del cierre.

Signos clínicos detallados: tras la recuperación de la anestesia.

Peso corporal: antes de la aplicación de la plasmaféresis.

- 35 Cuidados paliativos: Se administró buprenorfina antes de la inducción de la anestesia. Se colocaron mantas sobre los animales para calentar la piel durante la recuperación.

- 40 Investigación Terminal: Los animales fueron eutanasiados 5 horas después del cierre. Nota: Cualquier animal con hemorragia continua, durante más de 60 minutos, tras la inducción de las laceraciones hepáticas (es decir, justo antes del cierre) fue eutanasiado por razones humanitarias.

Periodo de Estudio: 8-9 horas por cerdo

- 45 Métodos de Observación Clínica: atributos de comportamiento que incluyen, entre otros, los siguientes: 1. Eliminación de sangre, orina y heces, orina decolorada (si procede), diarrea, ausencia de heces (estreñimiento). 2. Signos de enfermedad o lesión, letargo, vómitos, salivación excesiva, postura anormal, dolor, cojera, incomodidad, falta de voluntad o incapacidad para moverse. 3. Puntuación de gravedad neurológica (NSS) 4. Se realizaron evaluaciones adicionales siempre que lo justificaban las observaciones clínicas.

- 50 Instrumental: Haemonetics MCS® +, Jeringas, agujas y material de vidrio Equipo de cirugía, tensiómetro, monitores de oxígeno. Todos los diluyentes y soluciones para el lavado y enjuague de los dispositivos o conjuntos de inyección parenteral se trataron de forma que se garantizara su esterilidad y ausencia de pirógenos. Se garantizó que todas las soluciones de prueba estuvieran protegidas de la contaminación.

- 55 En todos los experimentos se recogió plasma de los cerdos utilizando el sistema Haemonetics MCS® +. Se extrajo sangre total, se centrifugó, los hematíes se devolvieron inmediatamente al cerdo y se recogieron hasta 700 ml de plasma que se filtró o no utilizando ClearPlasma™ tal y como se describe en la Figura 5. Se anestesió a los cerdos, se les extrajo sangre de la vena y se introdujo en el sistema de plasmaféresis. A continuación, se devolvieron los hematíes al animal y el plasma se filtró con ClearPlasma™ y finalmente se devolvió al animal.

60

## Resultados:

Tabla 14: Resultados de la evaluación de seguridad en los cerdos n.º 38 y n.º 171

Cerco n.º (♀)	Cuerpo P/KG	Trat.	Fórm. de sol. de citrato de dextrosa antig. (ml)	Sang. Recd. (ml)	Plasma recd. (ml)	T. de sangr. (min)	Cant. de sangr. (gr./ml)	Tam. del corte del hig. gr.	Eve. Clin.
38	42	Plasma Fresco y 4000 uds. de Clexane	295	2562	676	25	178	16	Sang. Alt. Pres.
171	45	Plasma deplecionado en plasminógeno y 4000 uds. de Clexane	282	2811	690	36	144	16	Nor.

Abreviaturas: trat. (tratamiento), cant. (cantidad), hemor. (hemorragia), Sang. (sangre), Alt. (alto), Nor. (normal), eve. (eventos), hig. (hígado), gr. (gramo), Pes. (peso), anticoag. (anticoagulante), sol. (solución), fórm. (fórmula), rec. (recoger), tam. (tamaño), T (tiempo), clin. (clínico).

Tabla 15: Resultados de la evaluación de seguridad en los cerdos n.º 202, n.º 204, n.º 203 y n.º 208

Cerco n.º (♀)	Cuerpo P/KG	Trat.	anticoag. solución fórm. de citrato de dextrosa (ml)	Sang. Recd. (ml)	Plas. Recd. (ml)	T. de sangr. (min)	Cant. de sangr. (gr./ml)	Tam. del corte del hig. gr.	Eve. clin.
202	41	Control (no tratado)	0	0	0	26	138	22	Nor.
204	42	4000 unidades de Clexane	0	0	0	30	300	18	Sang. pres. alt.
203	40	Plasma fresco y 4000 uds. de Clexane	307	2441	710	30	544	20	Cas. fall.
208	42	Plasma deplecionado en plasminógeno y 4000 unidades de Clexane.	320	2534	729	26	148	20	Nor.

Abreviaturas: trat. (tratamiento), anticoag. (anticoagulante), núm. (número), fórm. (fórmula), recd. (recogido), T. (tiempo), hemor. (hemorragia), Sang. (sangre), Alt. (alto), Nor. (normal), clin. (clínico), pres. (presión), gr. (gramo), sol. (solución), tam. (tamaño), plas. (plasma), hig. (hígado), eve. (evento), fall. (fallecido), cas. (casi)

5 Tabla 16: Resultados de la evaluación de seguridad en los cerdos n.º 223, n.º 222, n.º 224 y n.º 220

Cerco n.º (♀)	Cuerpo P/KG	Trat.	Sol. antig. de citrato de dextrosa fórm. (ml)	Sang. recd. (ml)	Plasma recd. (ml)	T. de sangr. (min)	Cant. de sangr. (gr./ml)	Tam. del corte del hig. (gr.)	Eve. clin.
223	24	Cont. (no trat.)	0	0	0	25	80	18	Nor.
222	43	4000 Uds. de Clex.	0	0	0	28	194	18	Nor.
224	45	Fre. Plasma y 4000 uds. de Clex.	160	1926	530	25	594	18	Cas. fall. alt. pu. y pres. sang.
220	44	Pla. dep. plas. Y 4000 uds. de Clex.	167	2106	550	21	94	22	Nor.

Abreviaturas: trat. (tratamiento), anticoag. (anticoagulante), núm. (número), fórm. (fórmula), recd. (recogido), T. (tiempo), hemor. (hemorragia), Sang. (sangre), Alt. (alto), Nor. (normal), clin. (clínico), eve. (evento), pres. (presión), gr. (gramo), plasm (plasma), plas. (plasminógeno), dep. (deplecionado), clex. (Clexane), notrat. (no tratado), sol. (solución), tam. (tamaño), plas. (plasma), hig. (hígado), eve. (evento), fall. (fallecido), cas. (casi).

Como era de esperar, el tratamiento de los animales con Clexane aumentó significativamente la cantidad de sangre extravertida de 187 cc a 274 cc. Los datos también muestran que proporcionar a los animales una unidad de plasma fresco (PF) aumentó la hemorragia de 274 cc a 596 cc. Además, la depleción del plasminógeno del PF disminuyó el tamaño de la hemorragia de 596 cc a 128,7 cc.

Los datos post mortem muestran que los animales tratados con PEP no desarrollan eventos trombóticos o tromboembólicos. No se hallaron coágulos en los pulmones, el corazón o el bazo de los animales tratados con PEP. La conclusión relativa a la ausencia de episodios tromboembólicos se ve corroborada por la ausencia de dímero D en los animales tratados con PEP.

Los datos muestran que el plasma deplecionado en plasminógeno es un tratamiento antihemorrágico eficaz incluso en animales tratados con Clexane. Los datos también indican que el plasminógeno PEP es eficaz incluso en animales tratados con Clexane. Por lo tanto, el PEP podría ser una buena solución en pacientes tratados con anticoagulantes que hay que intervenir de urgencia. Los datos también sugieren que los pacientes tratados con PEP pueden ser tratados con Clexane sin riesgo de aumentar la hemorragia; esta conclusión es relevante para aquellos pacientes que necesitan ser tratados con anticoagulantes en el periodo postoperatorio para prevenir o tratar la TVP. Los datos también muestran que es posible tratar conjuntamente a los pacientes con Clexane y PEP y, de este modo, prevenir las hemorragias y los episodios trombóticos al mismo tiempo.

#### Ejemplo 9

Propiedades in vitro del plasma deplecionado en plasminógeno (PEP) comparado con el PFC

Los parámetros de coagulación del plasma deplecionado en plasminógeno (PEP) y del plasma fresco congelado (PFC) se calcularon según el procedimiento experimental y se compararon según se muestra en la **Tabla 17**. Se hizo fluir un volumen de 215 ml de plasma fresco congelado (PFC) a través de ClearPlasma (denominado PEP en la **Tabla 17**; en contraste con el PFC relativo al plasma no tratado). Parece que la depleción del PLG en el PEP fue de hasta el 80 %.

Tabla 17: Parámetros de coagulación del PEP en comparación con el PFC.

Valor-P	PEP	PFC		Unidades	Parámetros
P<0,01	33,06	155,41		µg/mL	Plasminógeno
N/S	32,56	34,82		Segundos	TPT
N/S	317,8	360,2		mg/dl	Fibrinógeno
Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Las estadísticas se calcularon mediante la prueba t de Student (distribución de dos colas con igual varianza).					

Además, se realizaron múltiples pruebas de componentes sanguíneos específicos para determinar la coagulación y los estados bioquímicos del plasma tratado y no tratado (examen de la nutrición y el contacto proteínico). Las pruebas se realizaron en los laboratorios de hematología y bioquímica de Bnay-zion. Los resultados se presentan en la **Tabla 18**. Parece que no existen diferencias significativas en los parámetros bioquímicos del PFC y el PEP y, por tanto, que ClearPlasma no afectó a la nutrición ni a los niveles de contacto proteínico.

Tabla 18: Parámetros bioquímicos del PEP en comparación con el PFC.

Valor-P	PEP	PFC	Unidades	Parámetros
N/S	341,80	384,00	mg/dL	Glucosa
N/S	46,4	51,20	U/L	Fosfatasa alcalina
N/S	10,40	10,80	U/L	Alanina aminotransferasa
N/S	48,60	54,00	U/L	Amilasa
N/S	15,40	16,60	U/L	Aspartato aminotransferasa
N/S	9,60	9,40	U/L	Gamma glutamil transferasa
N/S	254,00	290,20	U/L	Lactato deshidrogenasa
N/S	162,8	168,6	mmol/L	Sodio
N/S	74,68	73,06	mmol/L	Cloruro
N/S	5,89	6,37	g/dL	Proteína total
N/S	2,30	2,33	g/dL	Globulina
N/S	19,80	22,80	mg/del	Urea
Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Las estadísticas se calcularon mediante la prueba t de Student (distribución de dos colas con igual varianza).				

Además, la lisis del coágulo se monitorizó mediante tromboelastografía (TEG) tanto en el PEP como en PFC, tal y como se detalla en la sección Procedimiento experimental. Los resultados se ilustran en la **Figura 7**. Parece que el PEP suprimió la actividad fibrinolítica en el plasma humano.

## 5 Ejemplo 10

Experimento de seguridad en ratones - evaluación de la tecnología anti-fibrinolítica en el test de sangrado de la cola

El estudio se realizó en Biocell Ltd. (Israel).

10

### Objetivo

El objetivo de dicho experimento fue examinar la seguridad de la inyección intravenosa de plasma sin plasminógeno en ratones.

15

### Criterios de valoración del estudio

La seguridad del plasma deplecionado en plasminógeno se evaluó mediante marcadores sanguíneos (hemograma, bioquímica) y observaciones clínicas (piel, pelaje, control de ojos/mucosas, sistema nervioso, actividad somática y comportamiento general). Los parámetros se midieron antes de la inyección, 48 horas después de la inyección y 7 días después de la inyección.

20

### Animales

25 12 animales

Especie/Cepa: Ratones, c57black

Género/Número/Edad: Macho 10-12 semanas

30

Fuente: Laboratorios Harlan, Israel

### Comité ético

35 Este estudio se llevó a cabo con la aprobación de la "Junta Israelí de Experimentos con Animales" y de conformidad con la "Ley Israelí de Bienestar Animal".

### Diseño del estudio

40 En este experimento se inyectó a cada ratón 200 µl de uno de los tratamientos.

1. Los ratones C57black sanos de 12 semanas de edad fueron anestesiados con una mezcla de ketamina y xilacina (a 100 y 10 mg/kg, respectivamente) y se midió su peso corporal.

45 2. Los ratones se dividieron aleatoriamente en tres grupos diferentes (cuatro ratones en cada grupo) y se les inyectaron 200 µl de:

1. Salino – grupo 1

50 2. Plasma normal – grupo 2

3. Plasma sin plasminógeno - grupo 3 (el plasma procedía de ratones C57black y filtrado por ClearPlasma™).

55 3. Cuarenta y ocho horas después de la inyección, se sacrificaron dos ratones de cada grupo para evaluar la seguridad de la inyección; se recogió sangre en tubos K3 con EDTA para su extracción y se envió a análisis de sangre (a 4 °C).

4. Siete días más tarde se sacrificaron dos ratones de cada grupo para evaluar la seguridad de la inyección; se recogió sangre en tubos K3 con EDTA para su extracción y se envió a análisis de sangre (a 4 °C).

60

5. Se analizó la sangre de los ratones para: recuento sanguíneo (CBC), LDH, AGT, ALT y un análisis bioquímico completo.

65 Los marcadores fisiológicos han demostrado que la inyección intravenosa de plasma deplecionado en plasminógeno no afectó a la fisiología de los ratones. Se examinaron el hemograma completo (CBC), la bioquímica sanguínea, el peso corporal, el aspecto morfológico y el comportamiento de los animales, que resultaron normales en todos los

grupos. Así pues, según a los resultados de este experimento, parece que el plasma deplecionado en plasminógeno es seguro de utilizar.

#### Prueba de hemorragia en ratones

La depleción de plasminógeno también se realizó en ratones: el plasma procedente de ratones C57black se sometió a ClearPlasma (el plasma de control no se trató). Los niveles de plasminógeno se evaluaron mediante ELISA [KIT: ab198511 - Plasminógeno Total (PLG) KIT ELISA Ratón] y mostraban un 97 % de depleción de plasminógeno (Tal y como se muestra en la tabla más abajo).

Tabla 19:

#### Concentración de PLG en las muestras

	Factor de dilución	D.O.	Promedio	Datos eliminados	* Concentración (uq/ml)
Plasma tratado	10 <sup>4</sup>	0.249	0.238	0.0365	4.1
	10 <sup>4</sup>	0.227			
Plasma no tratado	10 <sup>4</sup>	1.044	0.937	0.7355	118
	10 <sup>4</sup>	0.83			

La prueba de hemorragia tras el corte de la cola en ratones se realizó según a los procedimientos descritos en la sección Procedimientos experimentales. El objetivo de este estudio no-GLP fue investigar el uso del dispositivo ClearPlasma™ y el beneficio del plasma deplecionado en plasminógeno en comparación con el plasma normal. El estudio se realizó en Biocell Ltd. (Israel).

#### Objetivo

Comprobar el efecto del PEP en la tasa de hemorragia de los ratones.

#### Criterios de valoración del estudio

La cantidad de sangre perdida se clasificó utilizando el siguiente esquema de clasificación estándar:

Tabla 20: Esquema de clasificación de la hemorragia en el modelo de prueba de hemorragia de la cola

Categoría	Hemorragia mínima	Hemorragia moderada	Hemorragia masiva
Cantidad de sangre perdida	0-1 ml	1-3 ml	X>3 ml

Por un breve periodo de tiempo, los ratones fueron inyectados con solución salina o plasma no tratado (PFC) o plasma deplecionado en plasminógeno, (plasma tratado o PEP). Se colocó a los animales en posición decúbito prono. Se amputó un segmento distal de 10 mm de la cola con un bisturí. La cola se sumergió inmediatamente en un tubo de 50 mL que contenía solución salina isotónica precalentada en un baño de agua a 37 °C. La posición de la cola era vertical y con la punta situada unos 2 cm por debajo del horizonte corporal. Se monitorizó a cada animal durante 20 minutos (incluso si cesaba la hemorragia, para detectar cualquier posible resangrado).

#### Tiempo de sangrando

Se cortaron las colas de los ratones participantes a 7 mm y se midió el tiempo transcurrido hasta que se detuvo la hemorragia. La prueba se realizó en grupos de 3, con un ratón de cada grupo de tratamiento en cada iteración. Los resultados muestran que en todas las iteraciones de la prueba, excepto en la número 2, los ratones tratados con PEP presentaron la menor cantidad de hemorragia.

#### Cantidad de hemorragia

Se cortaron las colas de los ratones a 7 mm y se midió el tiempo transcurrido hasta que se detuvo la hemorragia. La prueba se realizó en grupos de 3, con un ratón de cada grupo de tratamiento en cada iteración. Se extrajo sangre, se centrifugó y se midió el tamaño con una regla. Los resultados muestran que en todas las iteraciones de la prueba, excepto en la número 2, los ratones tratados con PEP presentaron la menor cantidad de hemorragia (véase la **Figura 8**).

Tamaño de los pellets de células sanguíneas a las 24 horas de la prueba de hemorragia

El pellet de células sanguíneas de la prueba de hemorragia se centrifugó y se aspiró el sobrenadante. A continuación, se midió el tamaño del pellet con una regla. Las estadísticas se calcularon mediante un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido de las pruebas post hoc LSD/SCHLIF ( $p < 0,05$  se consideró significativo). La **Figura 9** muestra los resultados del tamaño de pellet de cada ratón. La **Figura 10** resume el análisis estadístico de la medición del tamaño de pellet. Parece que el PEP reduce el sangrado en un  $>40\%$  en los ratones. Estos resultados demuestran que la PEP (ClearPlasma™) acortó los tiempos de hemorragia y la cantidad de sangre perdida en los ratones tratados con ella, en comparación con los grupos de control.

#### Ejemplo 11

ClearPlasma reduce los niveles de plasminógeno y proteína tPA en cerdos

Las hembras de cerdo se sometieron a plasmaféresis con el sistema Haemonetics mcs+ bajo anestesia. Se examinaron dos grupos de cerdos: un grupo de control y un grupo de prueba. En el grupo de prueba, el plasma de los cerdos se filtró con ClearPlasma. Se llevaron a cabo procedimientos similares para ambos grupos, es decir, cantidad de sangre filtrada: 700 ml, tratamiento con anticoagulante [solución anticoagulante de citrato de dextrosa fórmula a], tiempo: unos 100 min y 2500 ml de sangre procesada: se recogieron unos 700 ml de plasma. Tras estos procedimientos, se devolvió el plasma al animal.

Las muestras de plasma de cada grupo se analizaron para la depleción de plasminógeno (KIT Elisa: ab108893 Plasminógeno humano, tal y como se detalla en la sección Procedimiento experimental) y para la depleción de tPA (Wild type-tPA Sandwich ELISA# Technozym T-PA AG EDTA Kit Elisa 96 TC12007). Tal y como se ilustra en la **Figura 11A-11B**, parece que las muestras de plasma que se filtraron con ClearPlasma estaban empobrecidas tanto en plasminógeno como en tPA.

#### Ejemplo 12

PH y conductividad del plasma Objetivo

Comparar el pH y la conductividad del PEP y del plasma donante.

Materiales

Plasma: plasma de donantes sanos

Dispositivo ClearPlasma™ final esterilizado

Instrumental: medidor de pH, conductímetro eléctrico

Se conectó una bolsa con plasma humano al dispositivo ClearPlasma™ y se hizo fluir todo el volumen (200 ml) a través del dispositivo hasta la bolsa receptora durante 1 hora. Se midieron el pH y la conductividad del PEP y del plasma. Se observaron cambios menores en los valores de pH y de la conductividad tras tratar el plasma con el dispositivo ClearPlasma™, tal y como se detalla en la **Tabla 21**.

Tabla 21: Comparación del pH y la conductividad del plasma tratado y no tratado

Plasma	Proceso	pH	Conductividad (µS/cm)
Plasma	Antes de la filtración	7,86	13,14
	Tras la filtración	7,88	12,44

#### EJEMPLO 13

Análisis relativo a la seguridad

- Hemocompatibilidad

El dispositivo final esterilizado ClearPlasma™ (partículas de polímero polisacárido encerradas en una carcasa de policarbonato) se ha sometido a una prueba de hemólisis in vitro: mediciones de la concentración total de hemoglobina en sangre (método de la cianometahemoglobina). La prueba fue realizada por Envigo (Israel). El estudio se llevó a cabo de conformidad con los Principios de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) de la OCDE (revisados en 1997), ENV/MC/CHEM(98)17.

La prueba de hemólisis in vitro mide la concentración total de hemoglobina en sangre mediante el método de la cianometemoglobina. La sangre extraída de 3 conejos se incubó con Controles Negativos (Vial de Vidrio, Lote: 16491)



y Positivos (Guantes de Examen de Nitrilo, Lote: 41010104), así como con el Objeto de la Prueba (ClearPlasma™). Tras 3 horas de incubación a  $37 \pm 1$  °C, se midió el contenido de hemoglobina en el plasma y se determinó la hemólisis

5 El % de Hemólisis del Control Negativo (Vial de Vidrio, Lote: 16491) fue de -0,5 %, por lo que se clasificó como No hemolítico.

El % de Hemólisis del Control Positivo (Guantes de Examen de Nitrilo, Lote: 41010104) fue de 91,1 %, por lo que se clasificó como hemolítico.

10 Los controles Negativo y Positivo cumplieron los criterios de aceptación, confirmando así la validez de la prueba.

El % de Índice de Hemólisis del Objeto de la Prueba ClearPlasma™ (N.º de lote: 18-0001) fue de -0,3 % y -0,1 % y se considera No Hemolítico.

15 Bajo las condiciones de este estudio, y según el contenido calculado de hemoglobina, la Parte A y la Parte B del Objeto de la Prueba ClearPlasma™ (N.º de lote: 18-0001) se consideran No Hemolíticas.

• **Prueba de pirogenicidad mediada por material**

20 El objetivo del presente estudio fue el de proporcionar información general sobre la detección de la pirogenicidad mediada por material del plasma deplecionado en plasminógeno.

La prueba fue realizada por American Preclinical Services, LLC (MN, EE.UU.).

25 El estudio se llevó a cabo de conformidad con:

- United States Pharmacopeia (USP) <151> Normas Reguladoras de las Pruebas de Pirógenos,
- ISO 10993-11:2017 - Evaluación Biológica de Dispositivos Médicos - Parte 11: Pruebas de Toxicidad Sistémica.

35 Se utilizaron un total de 3 animales. Se estableció una temperatura de control de referencia para cada animal no más de 30 minutos antes de la inyección. El artículo de ensayo (plasma deplecionado en plasminógeno, lote n.º 001) se calentó a  $37 \pm 2$  °C y se inyectó por vía intravenosa en 10 minutos a razón de 10 ml/kg en la vena auricular lateral de cada animal. La temperatura de cada animal se registró a intervalos de 30 minutos entre 1 y 3 horas después de la inyección. En base a los resultados de este estudio, el artículo de prueba no mostró evidencia de pirogenicidad en el conejo mediada por el material.

• **Prueba de endotoxina bacteriana**

40 El objetivo del presente estudio fue el de estimar la concentración de endotoxinas bacterianas (pirógenos) en el extracto acuoso preparado en el dispositivo estéril final ClearPlasma™ y las perlas.

La prueba fue realizada por los laboratorios Milouda & Migal (Israel).

45 El dispositivo y las perlas se estudiaron por separado.

50 El dispositivo sin perlas se incubó con 50 ml de agua reactiva de LAL por muestra durante 1 hora. El agua reactiva de LAL se calentó a 37 °C antes de la prueba. A continuación, se analizaron los extractos de las muestras para detectar endotoxinas bacterianas mediante el método de ensayo LAL Cinético-Turbidimétrico.

Los resultados de dos muestras analizadas fueron de 0,00860 EU/ml y 0,01380 EU/ml.

55 A continuación, se analizaron 3 viales de perlas en etanol al 30 % del siguiente modo: cada muestra se diluyó 1:10 con agua reactiva de LAL y se incubó a 15-30 °C durante 1 hora. La muestra se centrifugó durante 10 minutos a 5.000 RPM. Se analizó el sobrenadante (dilución 1:10) para detectar endotoxinas bacterianas mediante el método de ensayo LAL Cinético-Turbidimétrico. Los resultados fueron <0,05 EU/ml para cada prueba.

60 El resultado sumario máximo para [dispositivo+perlas] no fue superior a los límites establecidos por la USP <161> (20 EU/dispositivo):

$[0,01380 \text{ UE/ml} \times 50 \text{ ml}] + [<0,05 \text{ UE/ml} \times 27 \text{ ml (para rellenar el dispositivo)}] = 0,69 \text{ UE/dispositivo} + [<1,35] \text{ UE/dispositivo} = <2,04 \text{ UE/dispositivo}$

65 Se realizan pruebas de LAL para cada lote de productos como parte de las pruebas de liberación.

En las reivindicaciones del método que se presentan a continuación, los caracteres alfanuméricos y los números romanos utilizados para designar los pasos de la reivindicación se proporcionan únicamente por comodidad y no implican ningún orden concreto de realización de los pasos.

Por último, cabe señalar que la palabra “que comprende”, tal y como se utiliza en las reivindicaciones adjuntas, debe interpretarse en el sentido de “que incluye, pero no se limita a”.

Aunque se han mostrado y descrito ejemplos según la materia tratada en la presente descripción, se apreciará que pueden realizarse muchos cambios en la misma sin apartarse del alcance de las reivindicaciones.

#### Ejemplo 14

Estudio clínico para evaluar la eficacia y seguridad de ClearPlasma™ en pacientes con hemorragia digestiva alta aguda.

Se realiza un ensayo aleatorizado, doble ciego y controlado para evaluar la seguridad y eficacia del PEP filtrado mediante el dispositivo ClearPlasma™ en pacientes que presentan una hemorragia digestiva alta aguda. Se trata de un estudio de no inferioridad. El resultado principal es la seguridad: eventos tromboembólicos (venosos o arteriales). El objetivo del estudio es evaluar los siguientes parámetros:

1) La pérdida total de sangre tras la transfusión de plasma [Marco Temporal: Las primeras 48 h postoperatorias]. La pérdida de sangre se evaluó mediante: Unidades transfundidas de hematíes [Marco Temporal: 2 semanas], unidades transfundidas de plasma [Marco Temporal: 2 semanas], descenso de hemoglobina - comparado con el valor de referencia, unidades transfundidas de plaquetas [Marco Temporal: 2 semanas] y episodios de resangrado durante las dos semanas de seguimiento;

2) la duración de la estancia hospitalaria [Marco Temporal: durante dos semanas de seguimiento];

3) la mortalidad asociada a la transfusión de plasma.

El estudio se realiza en distintos centros (multicéntrico) en fase 1/2, con una duración total de 12 meses (la duración del estudio para cada paciente es de dos semanas). El estudio incluye los dos brazos:

a) transfusión de 250-500 ml de PEP, más plasma normal si fuese necesario;

b) transfusión de plasma normal.

La población de pacientes se refiere a pacientes con hemorragia digestiva alta aguda (HDA), **diagnosticada por melena/presencia de sangre en el lavado gástrico/hematémesis**. El tamaño de la muestra es de 30 pacientes (15 de cada grupo). El cálculo del tamaño de la muestra se basa en la revisión de artículos médicos en indicaciones y proyectos clínicos similares e implica un análisis descriptivo.

Se examinó a los pacientes para determinar su idoneidad para el estudio mediante la evaluación de los criterios de inclusión y exclusión. Los procedimientos de cribado incluyen la recogida de datos demográficos, historia clínica, exploración física y constantes vitales.

Para su inclusión en el estudio, los pacientes deben tener una edad de  $\geq 18$  años, presentar una hemorragia digestiva alta aguda ( $< 24$  h) diagnosticada por un médico y proporcionar un consentimiento informado por escrito. El proceso de consentimiento informado cumple las recomendaciones de la norma ISO 14155:2011.

Los siguientes parámetros excluyen a los pacientes del estudio: embarazo, infusión de plasma administrada el mes anterior, insuficiencia renal conocida por aclaramiento de creatinina  $< 30$  ml/min, trombosis arterial o venosa en los 3 meses anteriores, reacción alérgica previa al plasma, participación en otro estudio clínico y tratamiento anticoagulante como warfarina, apixabán, rivaroxabán, dabigatrán, heparina de bajo peso molecular.

El programa de visitas/evaluaciones es la referencia, tras 8-12 horas (incluida la muestra de sangre), a la mañana siguiente (día 2), 72 horas y 14 días después de la transfusión. La evaluación de la referencia incluye tensión arterial, pulso, análisis de sangre, incluyendo hemograma completo (CBC), TP, INR, TPT y bioquímica. El programa de tratamiento es una transfusión única y el programa de seguimiento es de 12 h, 24 h, 72 h y 2 semanas después de la transfusión.

La administración de ClearPlasma™ debe basarse en la compatibilidad ABO-grupo sanguíneo. En casos de emergencia, el ClearPlasma™ del grupo sanguíneo AB puede considerarse plasma universal. ClearPlasma™ debe administrarse mediante infusión intravenosa tras la descongelación utilizando un equipo de infusión con filtro. Debe mantenerse una técnica aséptica durante toda la infusión.

Los efectos adversos esperados son reacciones alérgicas y fiebre. El paciente puede abandonar si se produce un evento adverso grave que requiera una modificación del tratamiento, la retirada del consentimiento o la decisión del investigador.

5 Los datos del presente estudio se registran en un formulario de informe de casos (CRF) según el Código de Reglamentos Federales de EE.UU., para permitir que los datos de la investigación clínica sean sistemáticamente recopilados, revisados, gestionados, almacenados, analizados y comunicados.

10 El lugar del estudio se monitoriza:

a) antes del inicio del estudio (es decir, la visita de inicio del estudio);

15 b) al principio del estudio, después de que se hayan inscrito los primeros pacientes y se hayan completado los CRFs;

c) una vez se hayan inscrito entre 10 y 15 pacientes durante el transcurso del estudio;

20 d) tras la inscripción del último paciente (es decir, la visita de finalización del estudio).

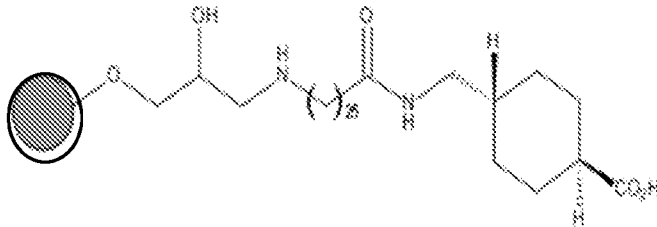
Puede haber visitas de control in situ adicionales debidas a la presentación de un CRF deficiente, la mala calidad de los datos o un número excesivo de retiradas o desviaciones de pacientes.


25 El estudio puede estar sujeto a auditoría por parte del Patrocinador o sus designados, así como a inspección por parte de las autoridades reguladoras responsables. El Investigador deberá aceptar la auditoría o inspección de los registros relacionados con el estudio y permitir el acceso directo a los documentos fuente, teniendo debidamente en cuenta la protección de datos y la confidencialidad médica.

30 Los datos del estudio se recogen en el CRF incluyendo todas las variables según el protocolo final aprobado. Los datos se recogen, se introducen, se limpian y se comunican según las normas ICH-GCP (Buenas Prácticas Clínicas), ISO 14155:2011 Investigación clínica de productos sanitarios para seres humanos -- Buenas prácticas clínicas, y las normas de la FDA, como los requisitos del US 21 CFR Parte 11.

# REIVINDICACIONES

1. Una variedad de conjugados o cualquier composición que comprenda la variedad de conjugados, en donde cada conjugado comprende una partícula, al menos un enlace y al menos un ácido 4-(aminometil)-ciclohexano-carboxílico (ácido tranexámico) en donde el conjugado es:

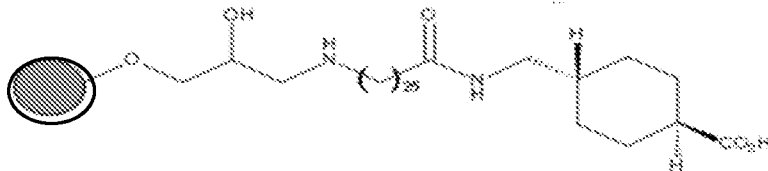



en donde  representa una partícula;  
y en donde la variedad de conjugados comprende al menos dos conjugados diferentes.

2. La variedad de conjugados o composición según la reivindicación 1, en donde las partículas de los al menos dos conjugados diferentes son diferentes, y opcionalmente al menos una de

- (a) en donde las partículas tienen un tamaño medio de partícula de entre aproximadamente 90  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 150  $\mu\text{m}$ ;
- (b) en donde la relación entre la partícula y la cobertura de enlace de la superficie de la partícula es de aproximadamente 9 a 23  $\mu\text{mol}$  perlas /ml de medio escurrido;
- (c) en donde la partícula es al menos una de perla de polisacárido, perlas de vidrio, perla de algodón, perla de plástico, perla de agarosa, perlas de sepharose, perla de nailon, perla de látex, perla magnética, perla paramagnética, perla super paramagnética, perla de almidón y similares, perla de silicio, perla de PTFE, perla de poliestireno, perla de arseniuro de galio, perla de oro o perla de plata, y
- (d) en donde la partícula es una perla de agarosa o una perla de sepharose.

3. Un conjugado que comprende una partícula, al menos un enlace y al menos un aminoácido, derivado del mismo o análogo del mismo, dicho conjugado es



en donde  representa una partícula, opcionalmente  
en donde la partícula es una perla de agarosa o una perla de sepharose y tiene un tamaño medio de partícula de entre aproximadamente 90  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 150  $\mu\text{m}$ .

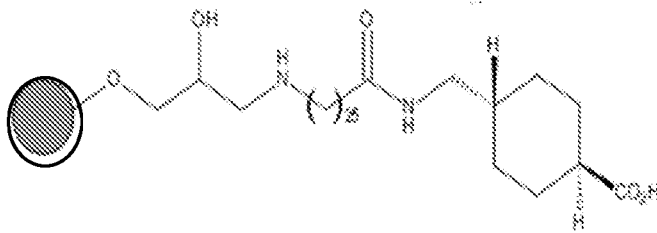
4. Un dispositivo para deplecionar al menos una proteína fibrinolítica del (de los) fluido(s) corporal(es) de mamífero, que comprende:


- una carcasa que tiene con al menos un puerto de entrada de fluido y al menos un puerto de salida de fluido;
- la carcasa que incluye al menos una cámara, dicha al menos una cámara define un volumen de control en comunicación fluida con al menos un puerto de entrada de fluido y el al menos un puerto de salida de fluido;

dicho volumen de control aloja al menos uno de una variedad de conjugados o composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y un conjugado como se define en la reivindicación 3.

5. Un dispositivo para deplecionar al menos una proteína fibrinolítica del (de los) fluido(s) corporal(es) de mamífero, que comprende:

-una carcasa que tiene al menos un puerto de entrada de fluido y al menos un puerto de salida de fluido;  
 -la carcasa que incluye al menos una cámara, dicha al menos una cámara define un volumen de control en comunicación fluida con al menos un puerto de entrada de fluido y el al menos un puerto de salida de fluido;  
 -dicho volumen de control aloja una variedad de grupos de partículas, incluyendo al menos un primer grupo de primeras partículas y un segundo grupo de segundas partículas;  
 -en donde dichas primeras partículas son dimensionalmente diferentes de dichas segundas partículas;  
 en donde al menos una de dichas primeras partículas y dichas segundas partículas son partículas conjugadas, estando conjugadas con al menos un ácido (ácido tranexámico), y en donde dicho ácido (ácido tranexámico), y en donde dicho conjugado comprende al menos un enlace, en donde dicho conjugado es



en donde  representa una partícula.

6. El dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, en donde dicha carcasa comprende un eje longitudinal, y comprende una parte del cuerpo principal, y un par de tapones de extremo, incluyendo un tapón de extremo de entrada que tiene dicho al menos un puerto de entrada de fluido, y un tapón en de extremo de salida que tiene dicho al menos un puerto de salida de fluido, opcionalmente dicho volumen de control está definido por miembros de barrera correspondientes proporcionados en extremos longitudinales opuestos de la parte de cuerpo principal, y opcionalmente, al menos uno de:

(i)dichos miembros de barrera están configurados para impedir que dichas partículas salgan de dicho volumen de control y, opcionalmente, uno de:

(a)dichos miembros de barrera están configurados para permitir simultáneamente el paso del (de los) fluido(s) corporal(es) de mamífero a través del volumen de control; o  
 (b)dichos miembros de barrera están configurados para permitir simultáneamente el paso del (de los) fluido(s) corporal(es) de mamífero a través del volumen de control, en donde en el uso del dispositivo, el(los) fluido(s) corporal(es) de mamífero entran en el volumen de control a través del tapón de entrada y el puerto de entrada de fluido, y después de salir del volumen de control, fluyen a través del tapón de salida y el puerto de salida de fluido; y

(ii)en donde dichos miembros de barrera comprenden cada uno una variedad de aberturas para permitir el flujo del (de los) fluido(s) corporal(es) de mamífero a través de las aberturas, siendo las aberturas de un tamaño menor que dichas partículas.

7. Una batería para su uso en la depleción de al menos una proteína fibrinolítica a partir del (de los) fluido(s) corporal(es) de mamífero, que comprende una variedad de dispositivos, en donde cada dispositivo es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde dichos dispositivos de la variedad de dispositivos están interconectados para proporcionar comunicación de fluidos entre los respectivos volúmenes de control de dicha variedad de dispositivos, en donde opcionalmente uno de:

(a)al menos una parte de dicha variedad de dispositivos están interconectados en serie, en donde para cada par de dichos dispositivos interconectados en serie, el respectivo puerto de entrada de fluido de uno de dichos dispositivos de dicho par está conectado y en comunicación fluida con dicha salida de fluido respectiva puerto de otro de dichos dispositivos de dicho par;  
 (b)al menos una parte de dicha variedad de dispositivos están interconectados en paralelo, en donde para dichos dispositivos interconectados en paralelo, dichos puertos de entrada de fluido respectivos están interconectados y en comunicación fluida entre sí, y en donde dichos puertos de salida de fluido respectivos están interconectados y en comunicación fluida entre sí; o  
 (c)al menos una parte de dicha variedad de dispositivos están interconectados en paralelo, en donde para dichos dispositivos interconectados en paralelo, dichos puertos de entrada de fluido respectivos

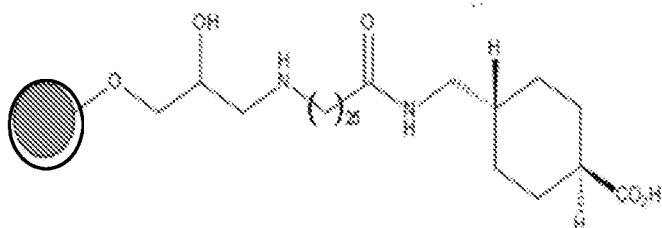
están conectados y en comunicación fluida con al menos un reservorio de plasma donante, y en donde dichos puertos de salida de fluido respectivos están conectados y en comunicación fluida con al menos un reservorio de plasma receptor.

- 5 8. Un kit para deplecionar al menos una(s) proteína(s) fibrinolítica(s) del (de los) fluido(s) corporal(es) de mamífero, que comprende:  
  
-al menos un dispositivo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6,  
-un reservorio salino en comunicación fluida selectiva con dicho al menos un puerto de entrada;  
10 -un reservorio de plasma receptor y un reservorio de residuos de lavado, en donde dicho reservorio de plasma receptor y dicho reservorio de residuos de lavado están en comunicación fluida selectiva y no concurrente con dicho al menos un puerto de salida de fluido.
- 15 9. Un sistema para deplecionar al menos una(s) proteína(s) fibrinolítica(s) del (de los) fluido(s) corporal(es) de mamífero, que comprende:  
  
-al menos un dispositivo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6,  
-un reservorio salino y un reservorio donante, en donde dicho reservorio salino y dicho reservorio donante están en comunicación selectiva y no concurrente de fluidos con dicho al menos un puerto de entrada de fluido;  
20  
  
un reservorio de plasma receptor y un reservorio de residuos de lavado, en donde dicho reservorio de plasma receptor y dicho reservorio de residuos de lavado están en comunicación fluida selectiva y no concurrente con dicho al menos un puerto de salida de fluido.  
25
10. Un método *ex vivo* o *in vitro* para deplecionar al menos una proteína fibrinolítica a partir del (de los) fluido(s) corporal(es) de mamífero o cualquier producto, comprendiendo el método los siguientes pasos:  
  
(i)someter dicho fluido/s corporal/es a un procedimiento concreto de depleción por afinidad para dicha/s proteína/s fibrinolítica/s; y  
30 (ii)recuperar el al menos un fluido corporal deplecionado en proteínas fibrinolíticas obtenido en la etapa (i).  
  
en donde dicho procedimiento de depleción por afinidad comprende poner en contacto dicho fluido corporal con una cantidad eficaz de una variedad de conjugados o con una composición que comprende dicha variedad de conjugados, o aplicar dicho fluido corporal sobre un dispositivo, batería, kit o sistema que comprende dicha variedad de conjugados o composición, en donde cada conjugado comprende una partícula, al menos un enlace y al menos un ácido 4-(aminometil)-ciclo-hexano-carboxílico (ácido tranexámico), y en donde la variedad de conjugados comprende al menos dos conjugados diferentes, en donde dicha variedad de conjugados o composición es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, dichos conjugados son como se definen en la reivindicación 3, dicho dispositivo es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, dicha batería es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 7, dicho kit es como se define en la reivindicación 8, y dicho sistema es como se define en la reivindicación 9.  
40
- 45 11. El método según la reivindicación 10, en donde al menos uno de:  
  
(a)dicho fluido corporal es al menos uno de sangre total, plasma o producto derivado de la sangre que comprende al menos un factor de coagulación, opcionalmente, dicho producto derivado de la sangre es al menos uno de sangre total, plasma, plasma fresco congelado (PFC), plasma rico en plaquetas (PRP) y crioprecipitado;  
50 (b)dicha proteína fibrinolítica es al menos una de las siguientes: plasminógeno y activador tisular del plasminógeno (tPA);  
(c)dicho método comprende además el paso de medir la cantidad de plasminógeno en el fluido corporal deplecionado en proteínas fibrinolíticas resultado del paso (ii), determinando al menos uno de los tiempos de coagulación y de lisis total del coágulo en dicho fluido corporal deplecionado en proteínas fibrinolíticas; y  
55 (d)dicho método se utiliza en la preparación de al menos un producto sanguíneo y/o derivado de la sangre que tenga una actividad fibrinolítica reducida.
- 60 12. Una cantidad eficaz de una variedad de conjugados o una composición de los mismos comprendida dentro de un dispositivo extracorpóreo, o dentro de un dispositivo, batería, kit o sistema conectado a dicho dispositivo extracorpóreo, para su uso en un método para deplecionar al menos una proteína fibrinolítica del (de los) fluido(s) corporal(es) de un sujeto que lo necesite mediante un procedimiento extracorpóreo, comprendiendo el método los siguientes pasos de  
65  
(i)transferir fluidos corporales de dicho sujeto a un aparato extracorpóreo;

(ii) someter dicho fluido corporal a un procedimiento de depleción por afinidad concreto para al menos una proteína o proteínas fibrinolíticas, en donde dicha depleción se realiza antes, durante o después de que la sangre se transfiera dentro y fuera de dicho aparato, obteniendo de esta forma un fluido corporal extracorpóreo deplecionado de dicho sujeto en al menos una proteína fibrinolítica; y

(iii) reintroducir o devolver dicho fluido corporal obtenido en el paso (ii) a dicho sujeto;

en donde dicho procedimiento de depleción por afinidad comprende poner en contacto dicho fluido corporal con dicha cantidad eficaz de una variedad de conjugados o una composición de los mismos comprendida dentro de dicho dispositivo extracorpóreo, o dentro de un dispositivo, batería, kit o sistema conectado a dicho dispositivo extracorpóreo, en donde cada conjugado comprende una partícula, al menos un enlace y al menos un aminoácido, derivado del mismo o análogo del mismo, en donde dicho conjugado es:



en donde  representa una partícula;

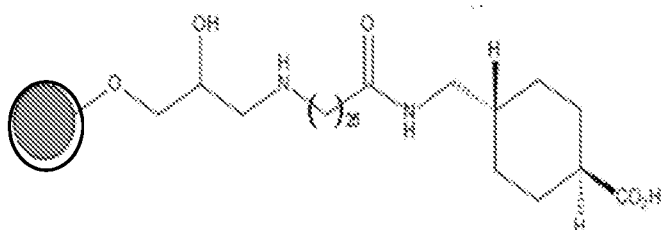
en donde dicha variedad de conjugados comprende al menos dos conjugados diferentes, y en donde dicho aminoácido, derivado del mismo o análogo del mismo es ácido 4-(aminometil)-ciclo-hexano-carboxílico (ácido tranexámico), en donde dicho fluido corporal es al menos uno de sangre total y plasma; opcionalmente, en donde dicha variedad de conjugados o composición es como se define en la reivindicación 2, dichos conjugados son como se define en la reivindicación 3, dicho dispositivo es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, dicha batería es como se define en la reivindicación 7, dicho kit es como se define en la reivindicación 8, y dicho sistema es como se define en la reivindicación 9.

13. Una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un producto sanguíneo y/o derivado de la sangre que tiene una actividad fibrinolítica reducida para su uso en un método para el tratamiento, prevención, profilaxis, mejora, inhibición de hemorragias, trastornos hemostáticos y cualquier hemorragia o condición patológica asociada a los mismos en un sujeto que lo necesite, en donde dicho producto se prepara mediante un método que comprende los siguientes pasos de

(i) someter el fluido/s corporal/es del sujeto mamífero a un procedimiento concreto de depleción por afinidad para al menos una(s) proteína(s) o fibrinolítica(s); y

(ii) recuperar el al menos un fluido corporal deplecionado en proteínas fibrinolíticas obtenido en la etapa (i).

en donde dicho procedimiento de depleción por afinidad comprende poner en contacto dicho fluido corporal con una cantidad eficaz de una variedad de conjugados o con una composición que comprende dicha variedad de conjugados, o aplicar dicho fluido corporal sobre un dispositivo, batería, kit o sistema que comprende dicha variedad de conjugados o composición, en donde cada conjugado comprende una partícula, al menos un enlace y al menos un aminoácido, derivado del mismo o análogo del mismo, en donde dicho conjugado es:



en donde  representa una partícula;

en donde dicha variedad de conjugados incluye al menos dos conjugados diferentes, y donde dicho aminoácido, derivado del mismo o análogo del mismo es ácido 4-(aminometil)-ciclo-hexano-carboxílico (ácido tranexámico).

5 14. La cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un producto sanguíneo y/o derivado de la sangre que posea una actividad fibrinolítica reducida para su uso según la reivindicación 13, en donde dicho trastorno hemostático sea un trastorno hemorrágico hereditario o adquirido, opcionalmente en donde:

10 (i)dicho trastorno hemostático hereditario es un trastorno resultante de al menos una deficiencia de al menos un factor de coagulación y una tendencia indefinida a la hemorragia, opcionalmente, en donde dicha deficiencia de al menos un factor de coagulación es una deficiencia de al menos uno del factor XI, factor X, factor V, factor VII, factor II (protrombina) y factor I (fibrinógeno); o

15 (ii)dicho trastorno hemostático adquirido es al menos uno de los siguientes: hemorragia inducida por cirugía, hemorragia inducida por traumatismo, hemorragia gastrointestinal aguda, hemorragia asociada a quemaduras, accidente cerebrovascular hemorrágico, lesión pulmonar debida a enfisema y EPOC, hemorragia asociada al parto y hemorragias resultantes de la terapia fibrinolítica o trombolítica.



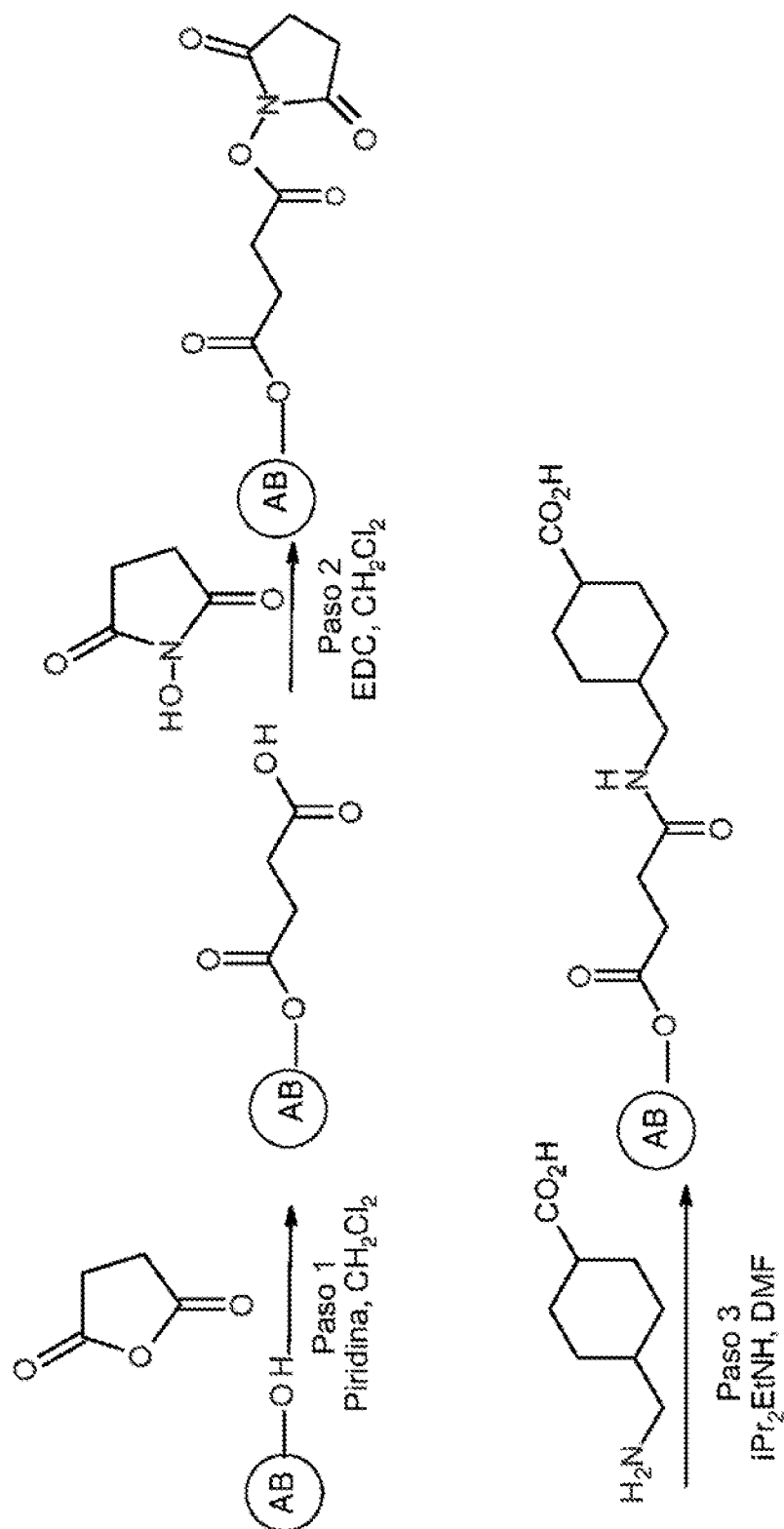


Figura 1

Figura 2

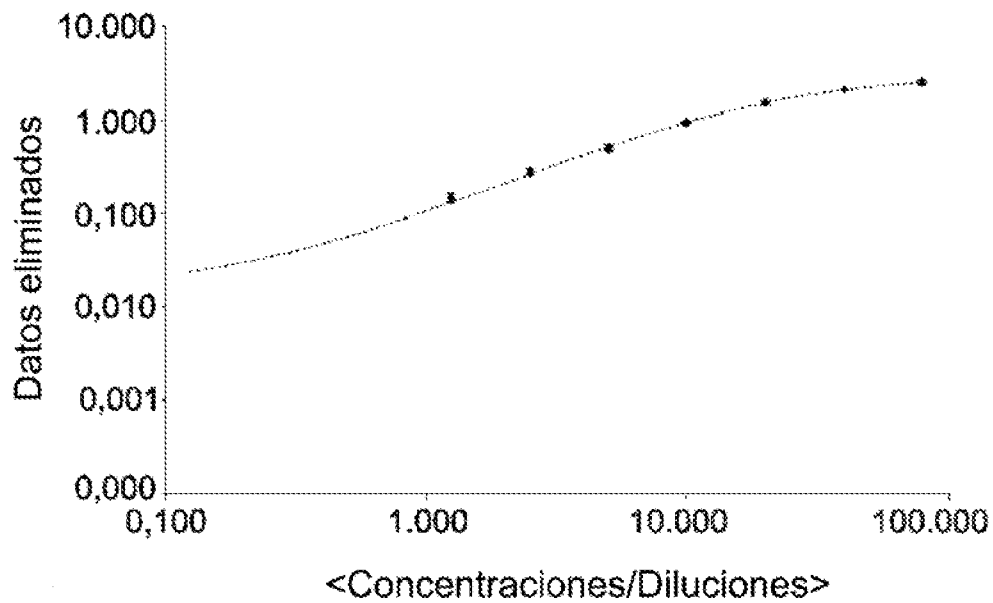


Figura 3

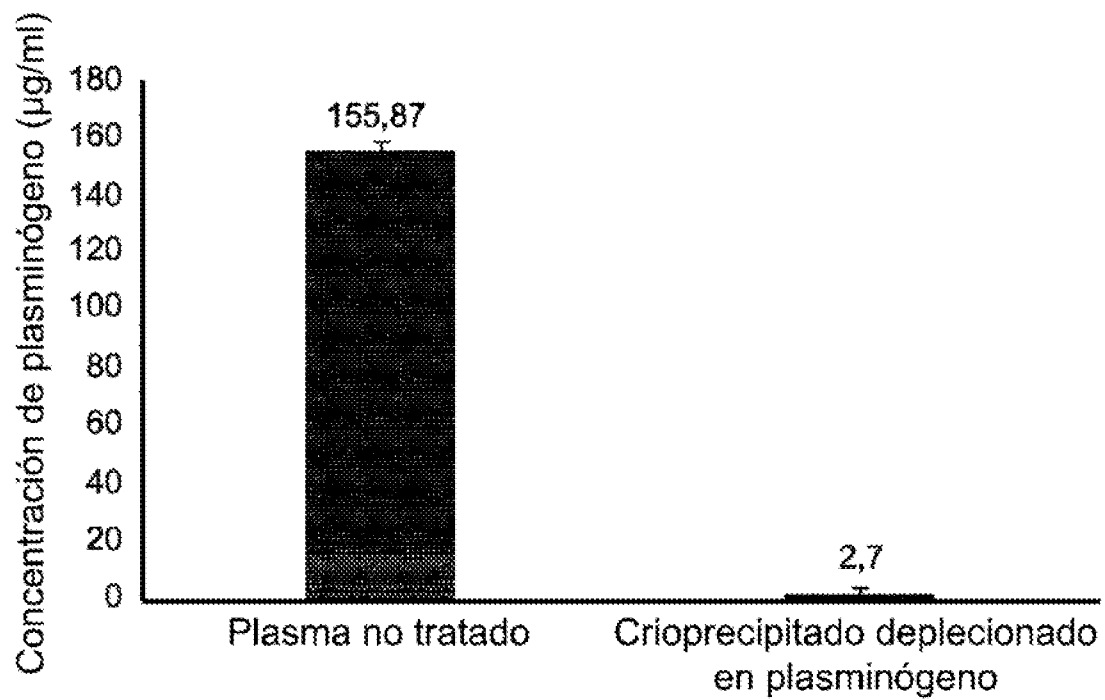


Figura 4

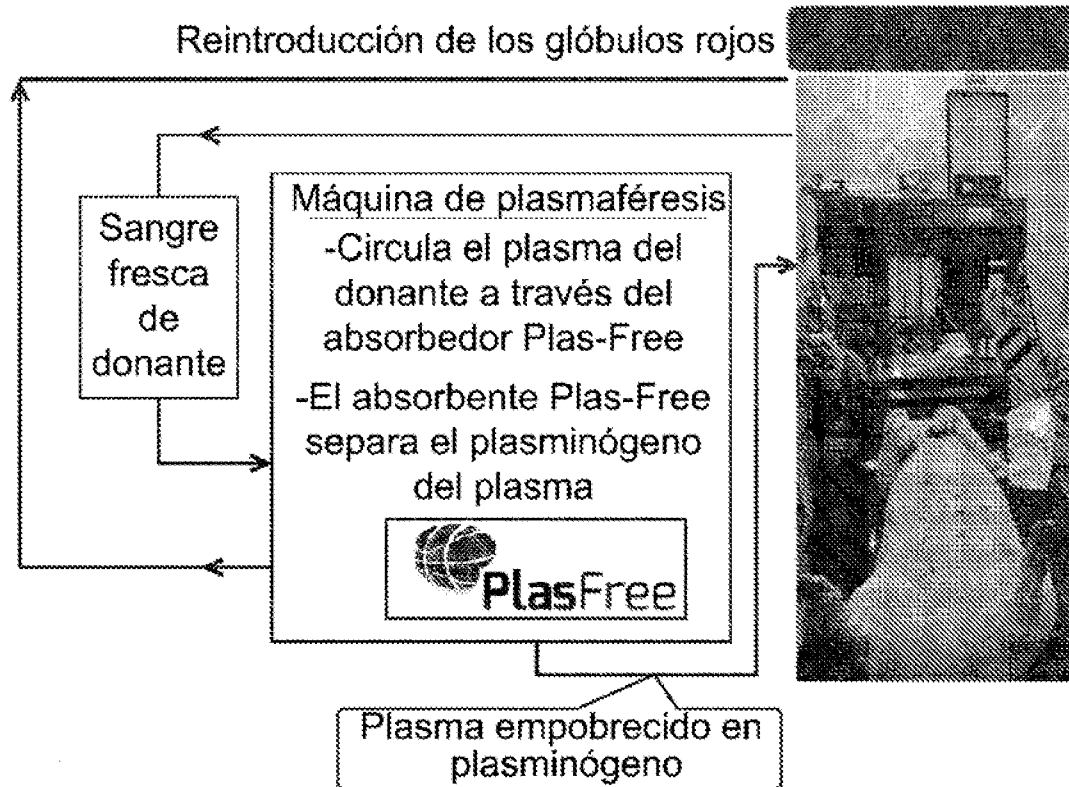
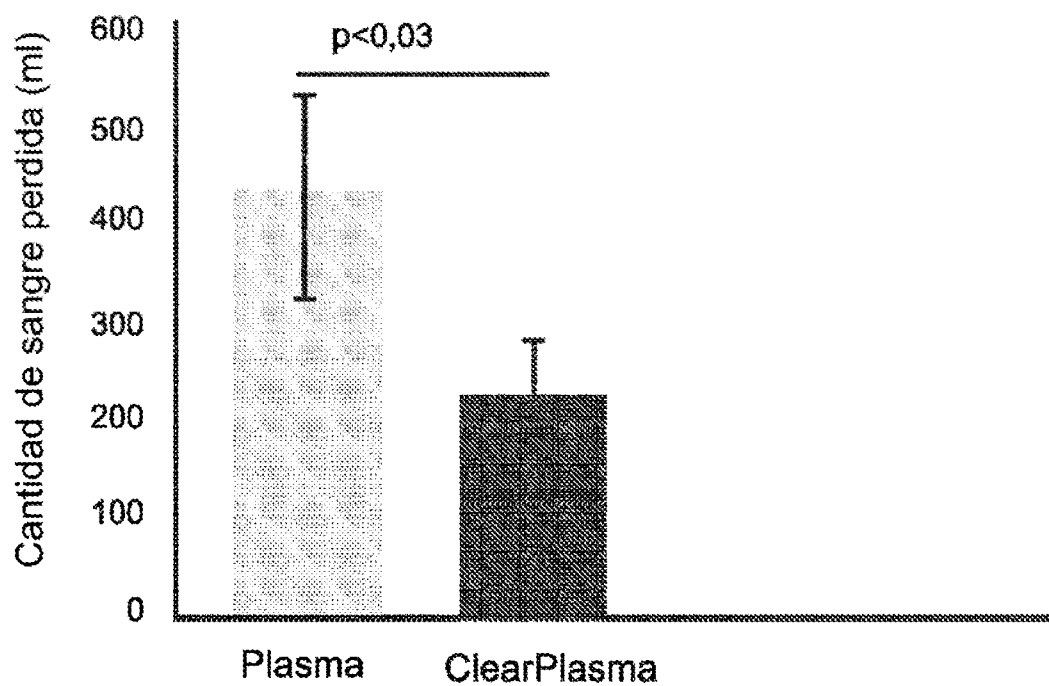


Figura 5



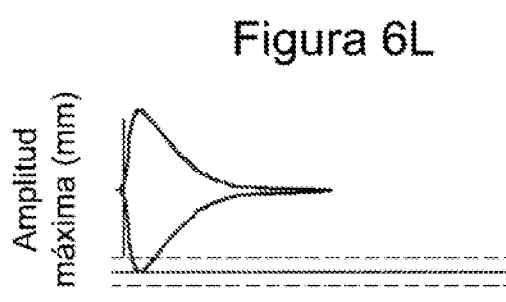
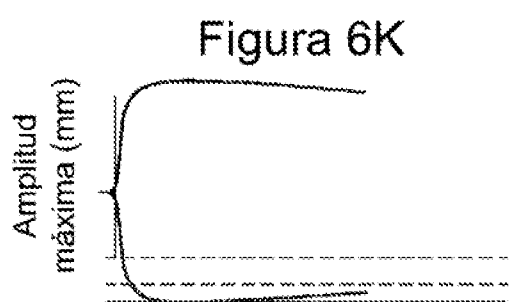
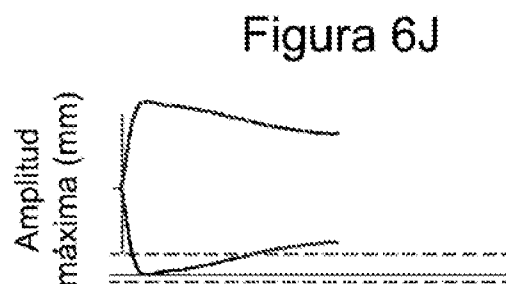
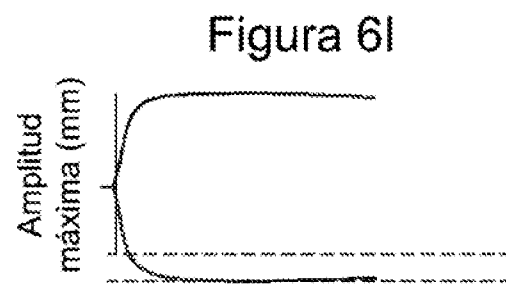
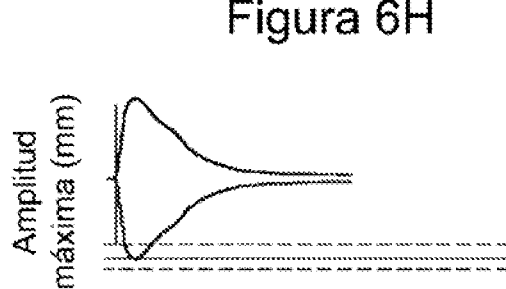
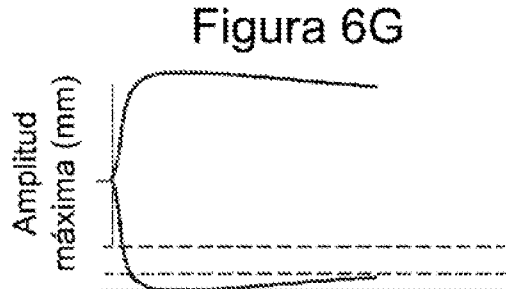
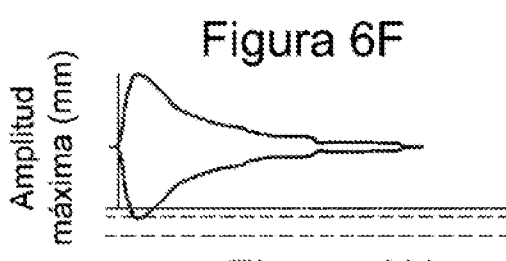
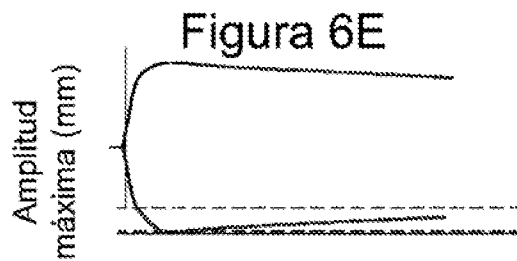
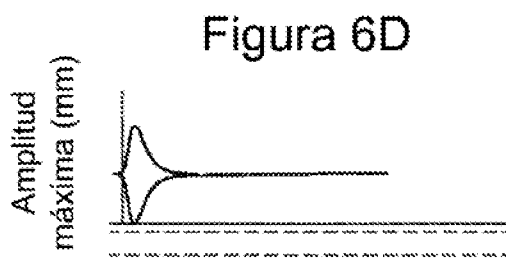
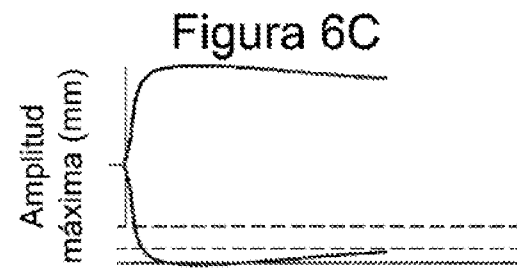
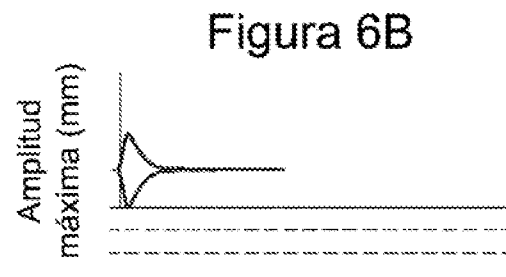
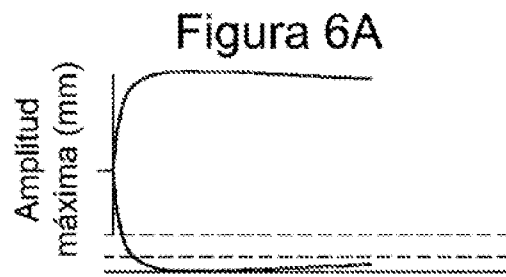


Figura 7A

No tratado

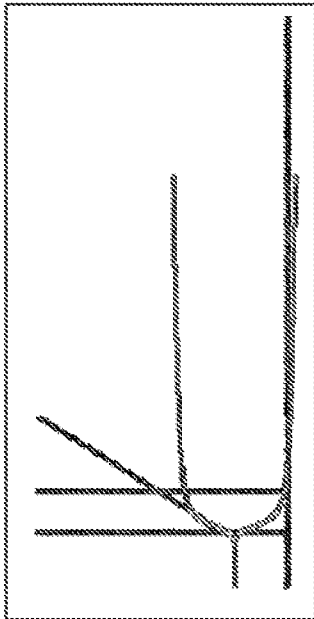


Figura 7B

+ WT t-PA

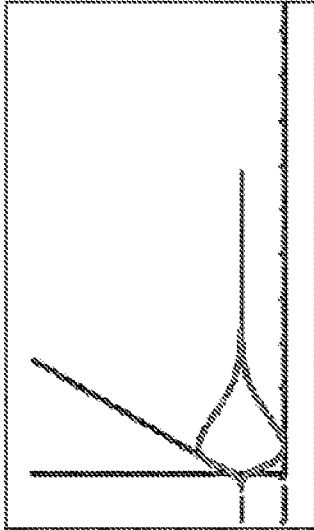


Figura 7C

Superposición

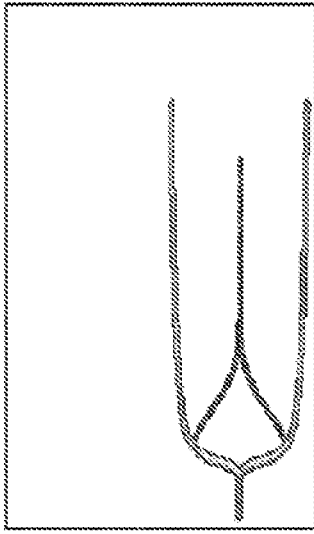


Figura 7D

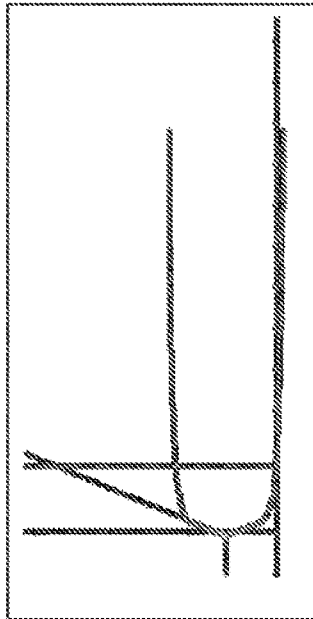


Figura 7E

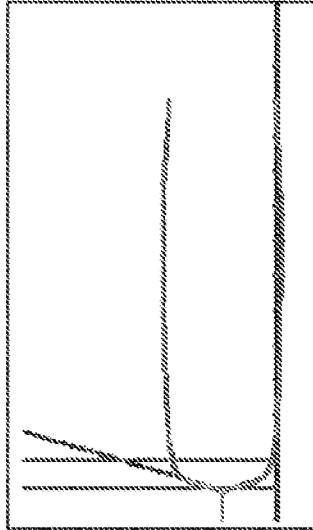


Figura 7F



Figura 8

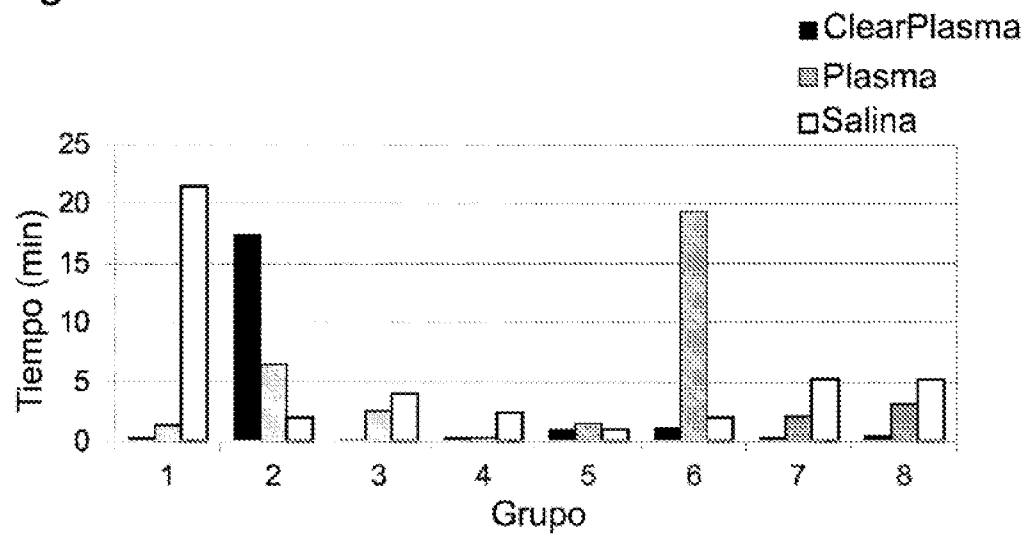


Figura 9

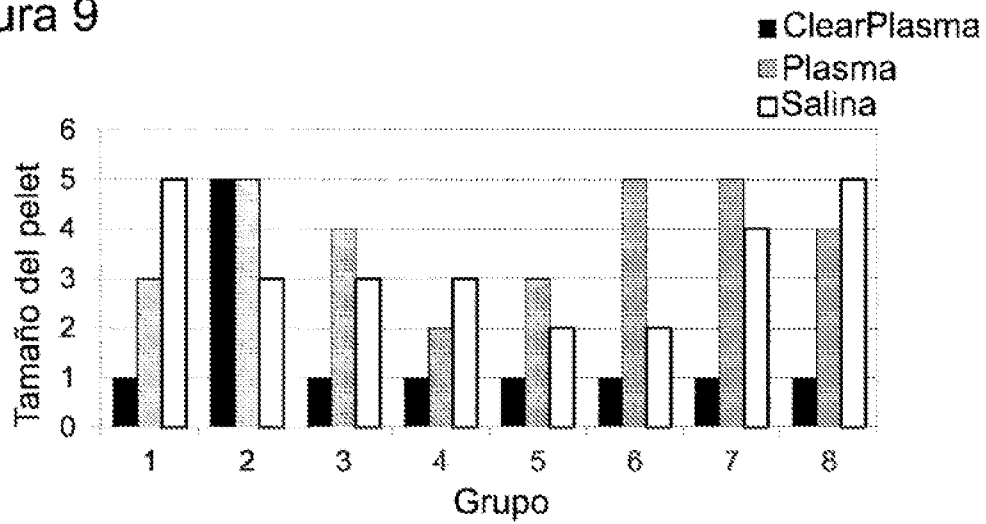


Figura 10

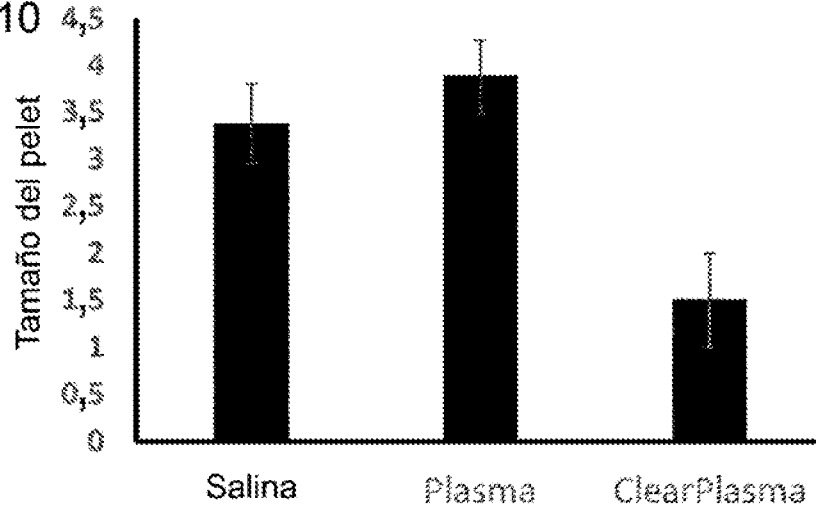


Figura 11A

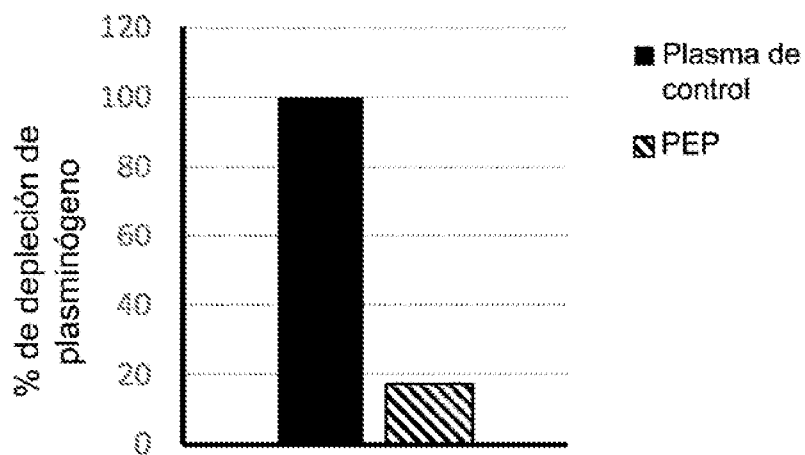
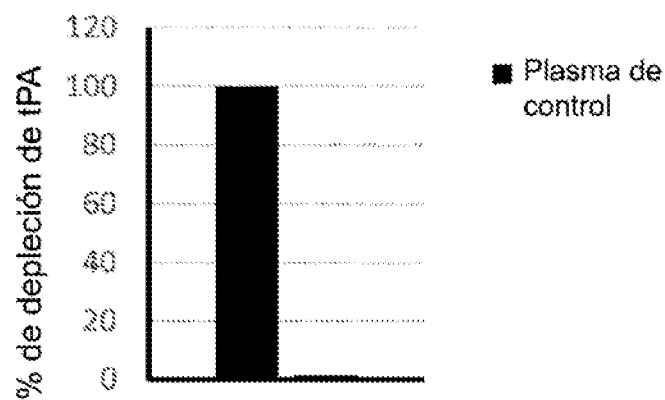


Figura 11B



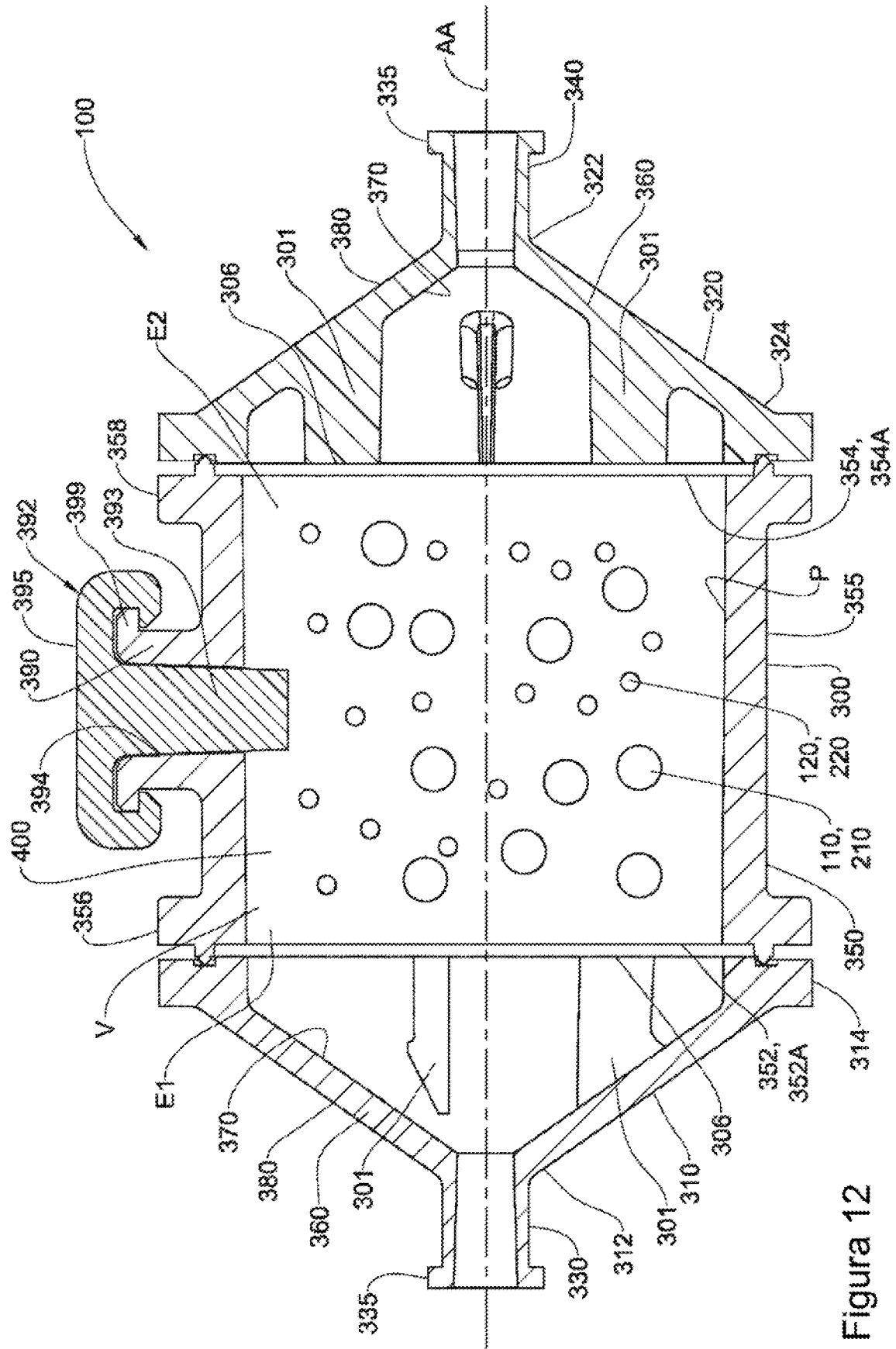


Figura 12



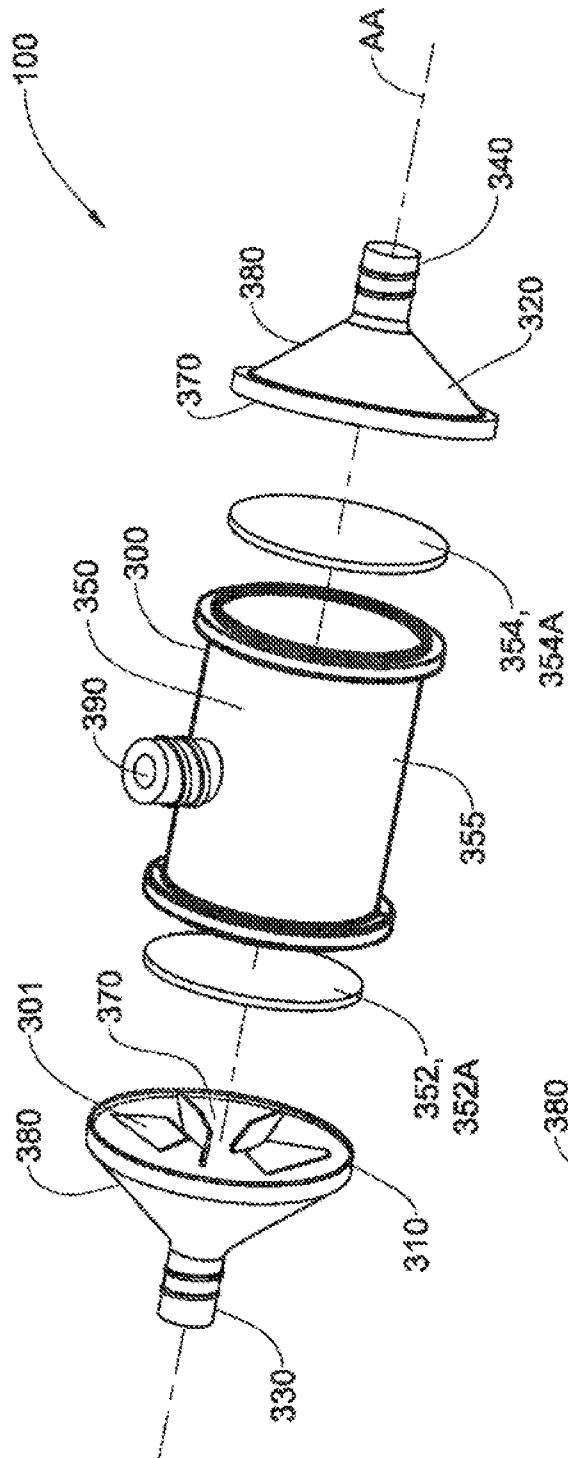


Figura 12A

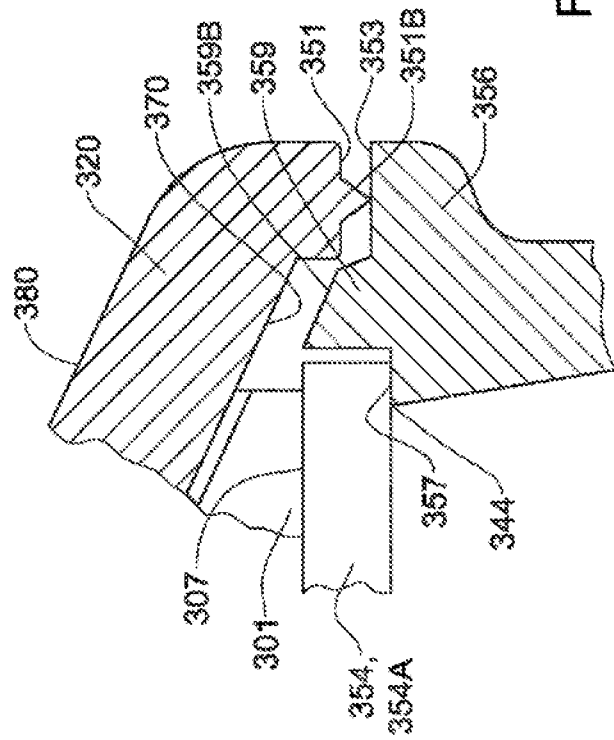


Figura 12B

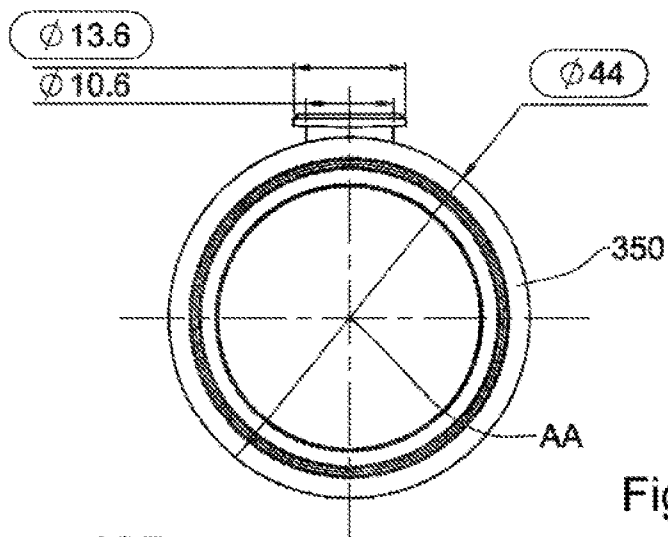


Figura 13A

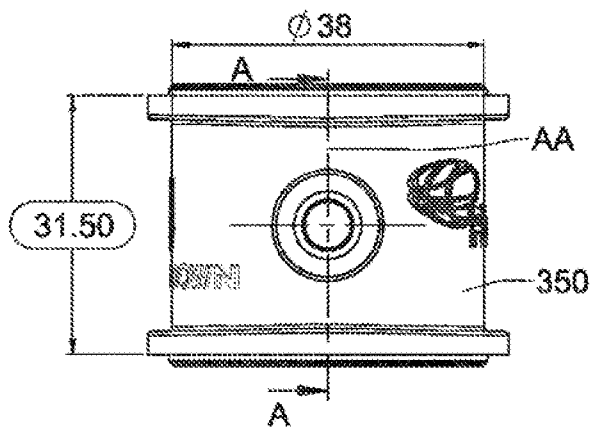
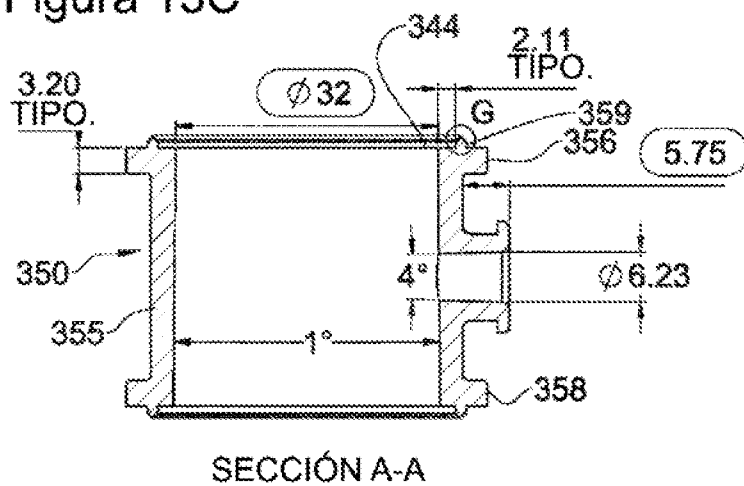


Figura 13C



SECCIÓN A-A

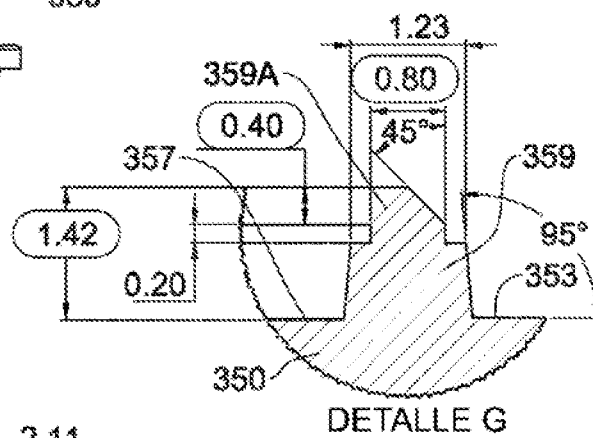


Figura 13D

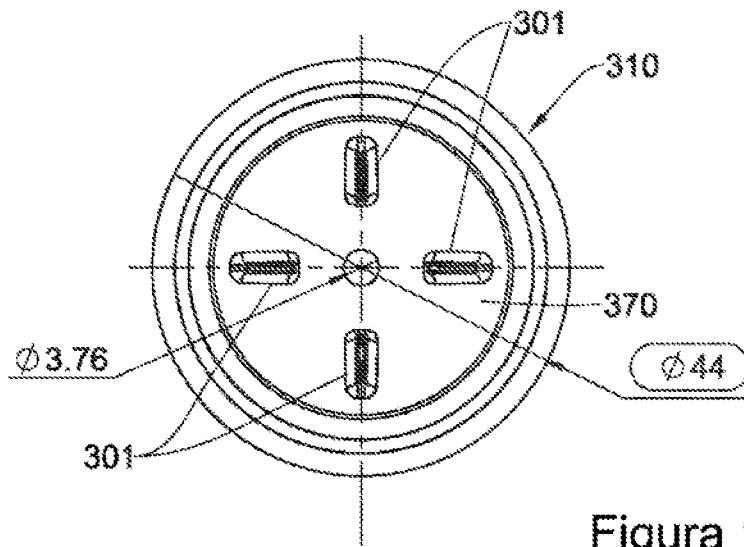


Figura 14A

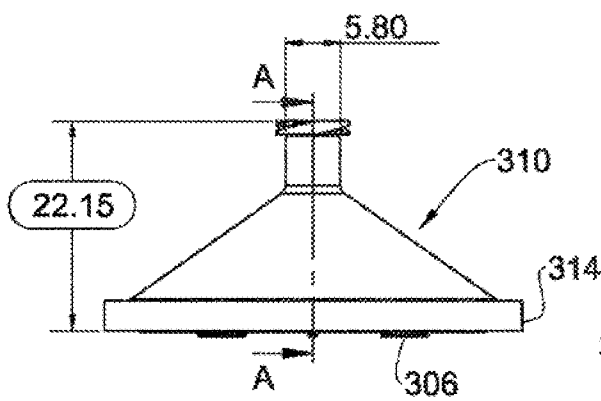


Figura 14B

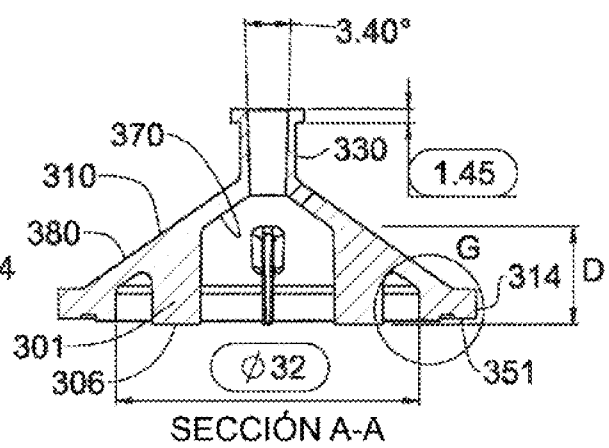


Figura 14C

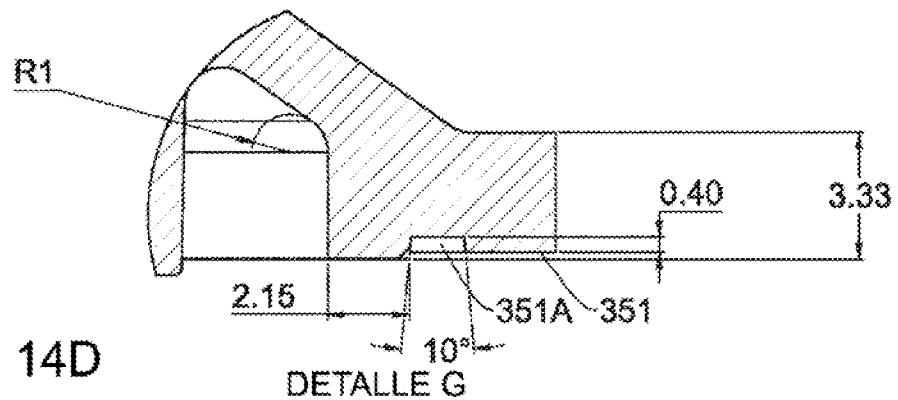
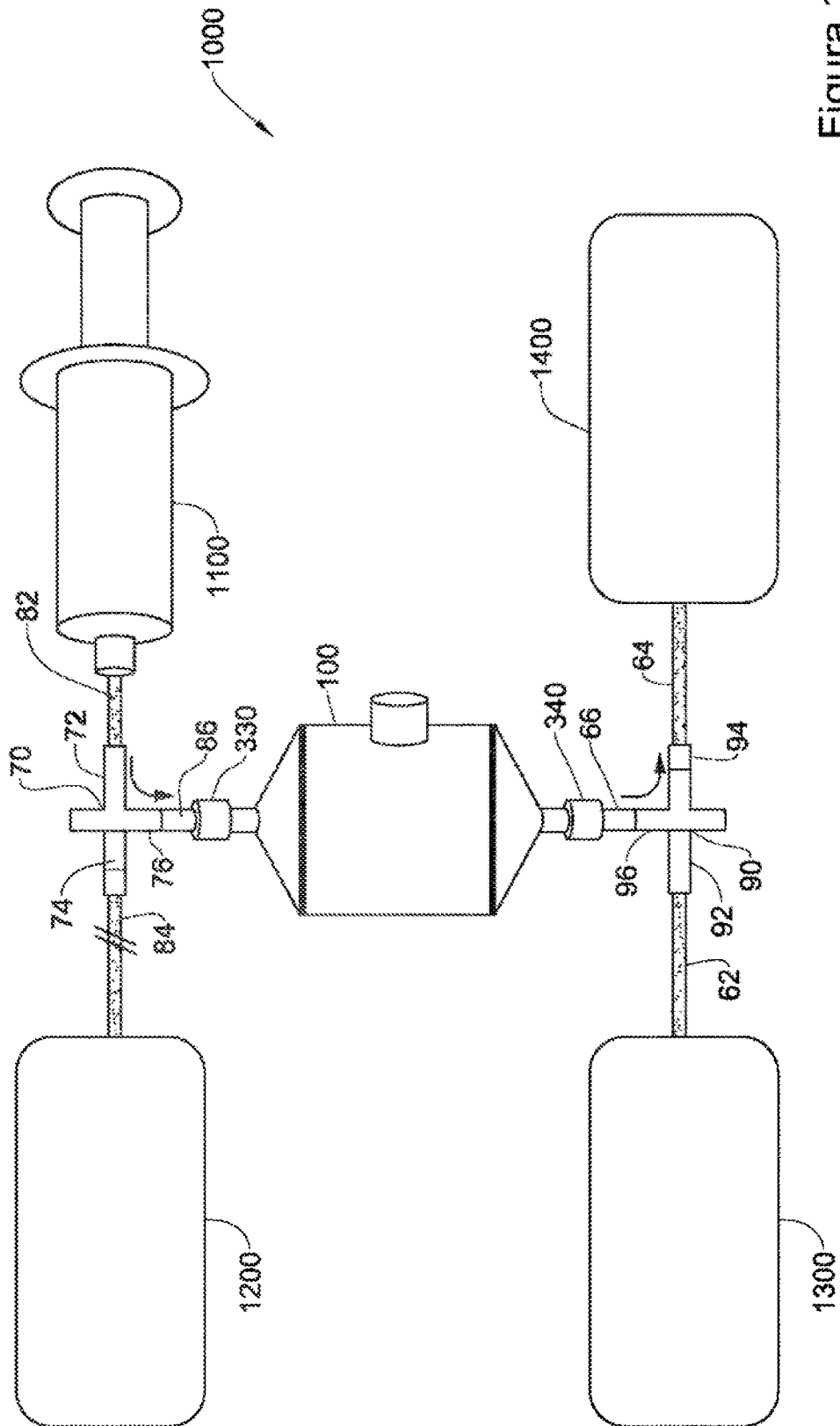


Figura 14D



**Figura 15**

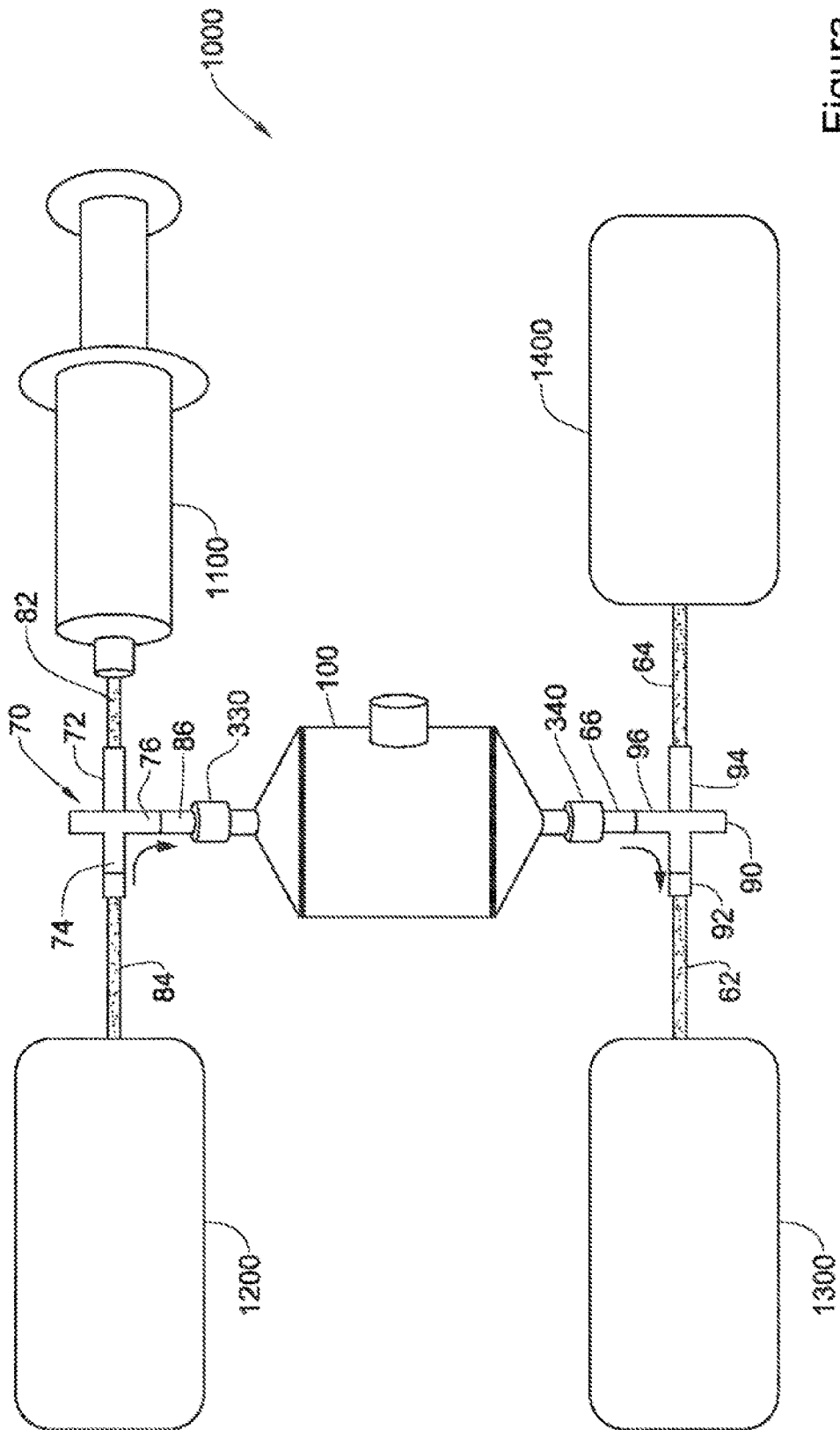


Figura 16

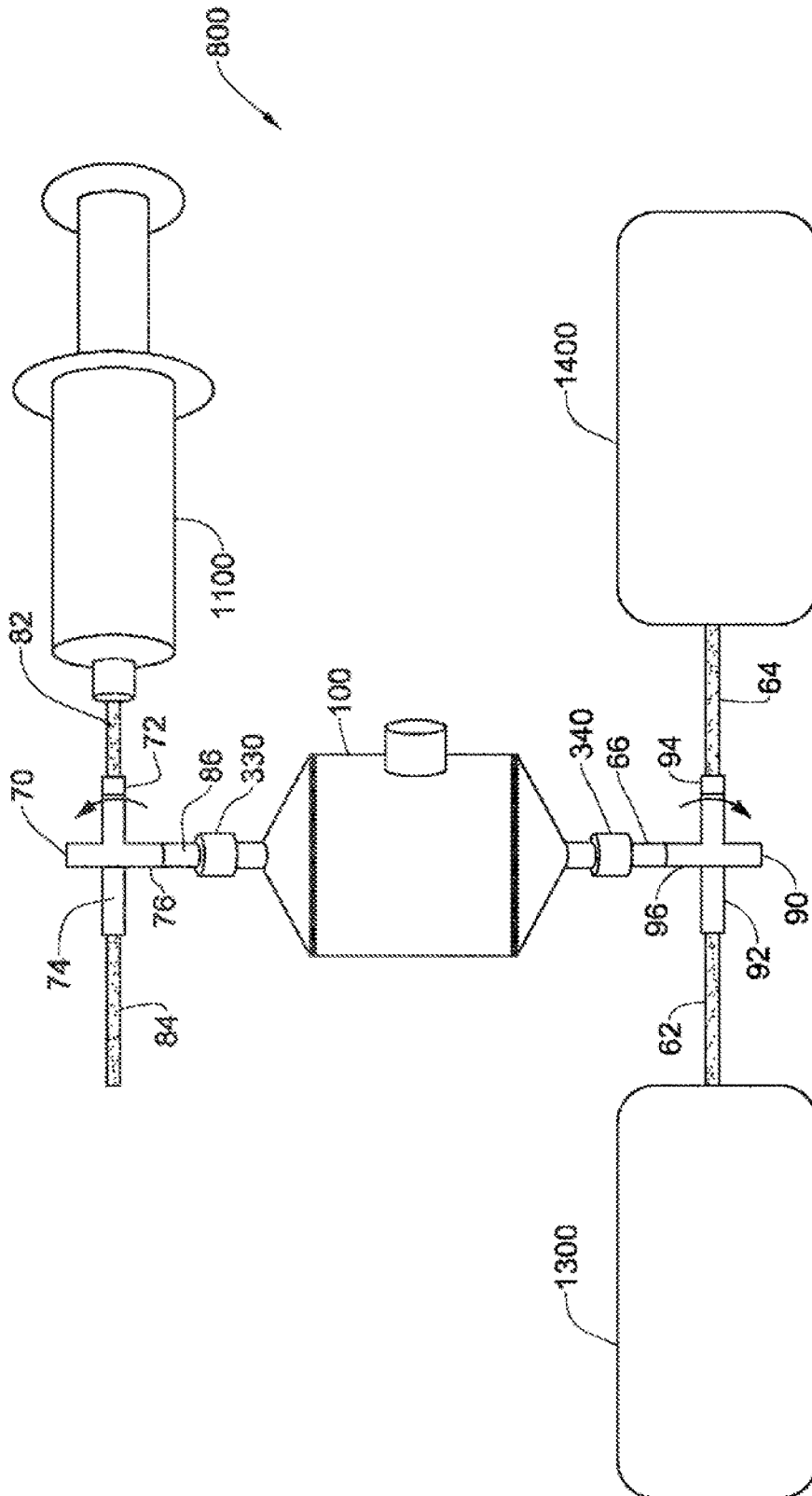


Figura 17

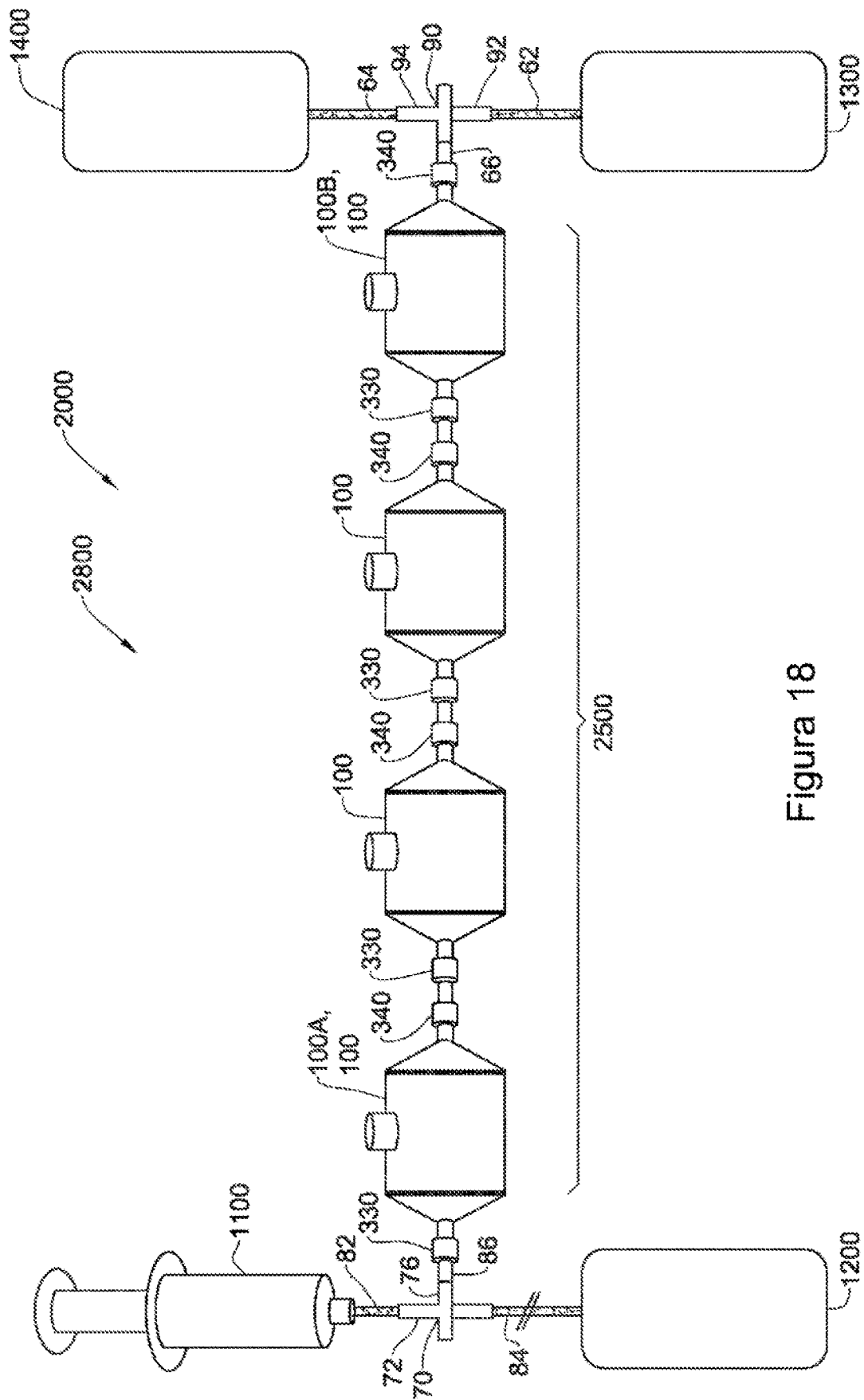


Figura 18

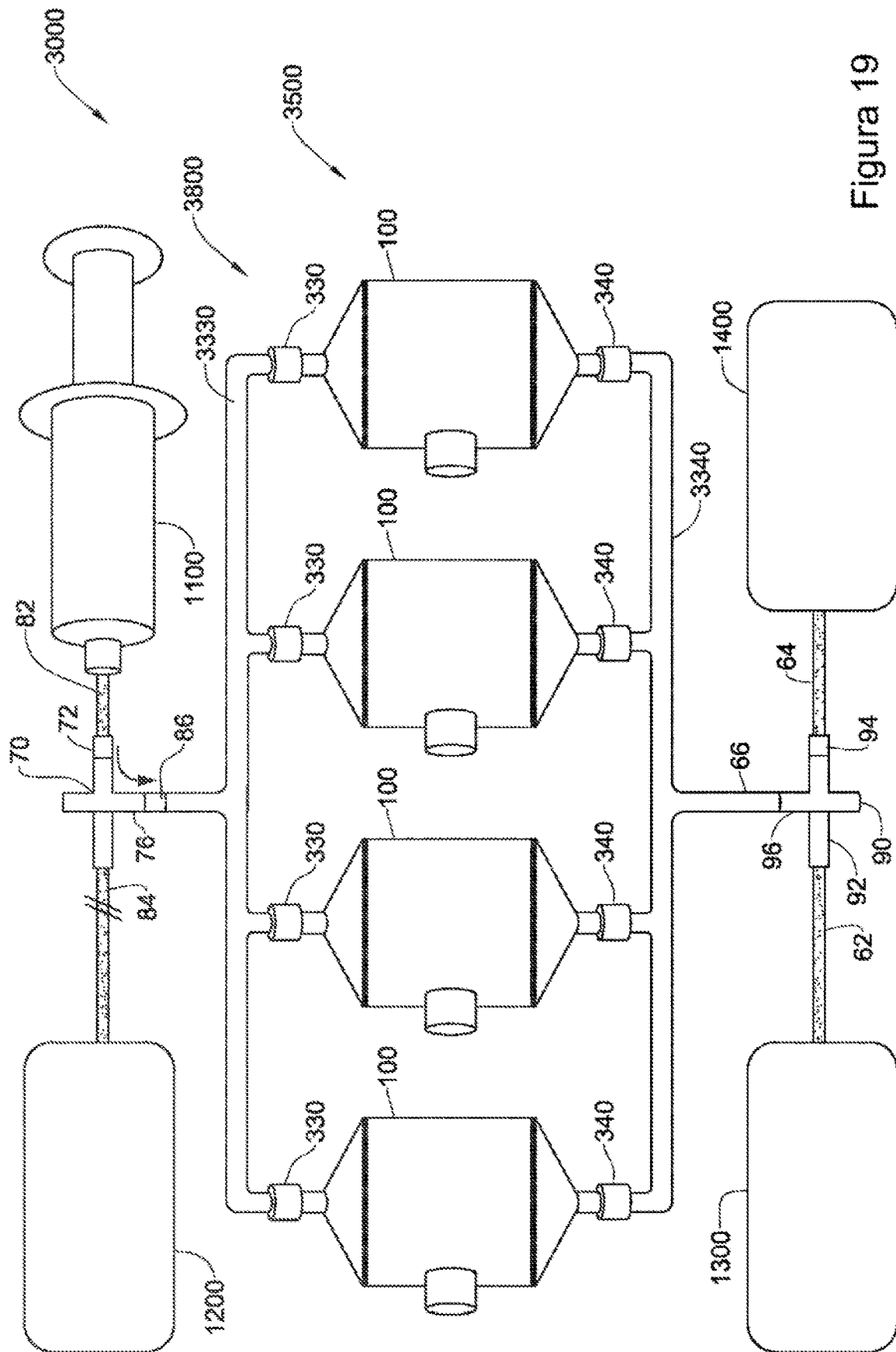


Figura 19