

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 777**

51 Int. Cl.:
A01N 1/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05796386 .0**
96 Fecha de presentación: **07.09.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1796457**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.06.2007**

54 Título: **Aparato para prolongar la supervivencia de plaquetas**

30 Prioridad:
07.09.2004 US 607600 P
15.10.2004 US 619176 P
06.05.2005 US 678724 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2012

73 Titular/es:
VELICO MEDICAL, INC.
100 CUMMINGS CENTER, SUITE 436 H
BEVERLY MA 01915-6122, US

72 Inventor/es:
ROSIELLO, Keith y
CLAUSEN, Henrik

74 Agente/Representante:
Pérez Barquín, Eliana

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).

ES 2 376 777 T3

DESCRIPCIÓN

Aparato para prolongar la supervivencia de plaquetas

Campo de la invención

La invención se refiere a composiciones y métodos para reducir la eliminación de plaquetas, y prolongar la supervivencia de las plaquetas.

Antecedentes de la invención

Las plaquetas son células sanguíneas anucleadas derivadas de la médula ósea que protegen a mamíferos heridos de la pérdida de sangre adhiriéndose a sitios de daño vascular y promoviendo la formación de coágulos de fibrina en el plasma. Los seres humanos carentes de plaquetas circulantes por fallo de la médula ósea padecen sangrados espontáneos potencialmente mortales, y las deficiencias menos graves de plaquetas contribuyen a complicaciones de sangrado después de un traumatismo o una cirugía.

Una reducción en el número de plaquetas circulantes hasta por debajo de ~70.000 por μl supuestamente da como resultado una prolongación de una prueba de tiempo de sangrado cutáneo estandarizada, y el intervalo de sangrado se prolonga, extrapoliándose hasta casi el infinito, a medida que el recuento de plaquetas cae hasta cero. Se piensa que los pacientes con recuento de plaquetas de menos de 20.000 por μl son muy susceptibles a hemorragia espontánea de superficies mucosas, especialmente cuando la trombocitopenia está causada por fallo de la médula ósea y cuando los pacientes afectados sufren complicaciones con septicemia u otras agresiones. Las deficiencias plaquetarias asociadas con trastornos de la médula ósea tales como anemia aplásica, leucemias agudas y crónicas, cáncer metastático, pero que resultan especialmente de tratamientos para el cáncer con radiación ionizante y quimioterapia, representan un importante problema de salud pública. La trombocitopenia asociada a cirugía mayor, daño y septicemia también deriva en administración de cantidades significativas de transfusiones de plaquetas.

Un avance principal en cuidados médicos hace medio siglo fue el desarrollo de transfusiones de plaquetas para corregir tales deficiencias plaquetarias, y más de 9 millones de transfusiones de plaquetas tuvieron lugar sólo en EE.UU. en 1999 (Jacobs et al., 2001). Las plaquetas, sin embargo, a diferencia de todos los demás tejidos trasplantables, no toleran la refrigeración, debido a que desaparecen rápidamente de la circulación de los receptores si se someten a periodos de enfriamiento incluso muy cortos, y el efecto de refrigeración que acorta la supervivencia plaquetaria es irreversible (Becker et al., 1973; Berger et al., 1998).

La necesidad resultante de mantener estas células a temperatura ambiente antes de una transfusión ha impuesto un conjunto único de requisitos logísticos costosos y complejos para el almacenamiento de plaquetas. Debido a que las plaquetas son metabólicamente activas a temperatura ambiente, se requiere una agitación constante en recipientes porosos para permitir la liberación del CO_2 desprendido, para evitar las consecuencias tóxicas de la acidosis metabólica. Las condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente dan como resultado degradación macromolecular y funciones hemostáticas reducidas de las plaquetas, un conjunto de defectos conocido como "la lesión del almacenamiento" (Chemoff y Snyder, 1992). Pero el problema principal con el almacenamiento a temperatura ambiente, que conduce a su limitación corta (5 días), es el mayor riesgo de infección bacteriana. Actualmente, la contaminación bacteriana de los componentes de la sangre es la complicación infecciosa del uso de componentes de la sangre más frecuente, superando con mucho la producida por agentes virales (Engelfriet et al., 2000). En EE.UU. se dan anualmente 3000-4500 casos de septicemia bacteriana debido a componentes sanguíneos contaminados por bacterias (Yomtovian et al., 1993).

El mecanismo que subyace a la intolerancia única e irreversible al frío de plaquetas ha sido un misterio, como lo ha sido su significancia fisiológica. Las plaquetas circulantes son discos de superficie lisa que se convierten en formas complejas al reaccionar ante un daño vascular. Alrededor de 40 años atrás, los investigadores observaron que las plaquetas discoidales también cambian de forma a temperaturas de refrigeración (Zucker y Borrelli, 1954). La prueba subsiguiente de que una forma discoidal era el mejor vaticinador de la viabilidad para plaquetas almacenadas a temperatura ambiente (Schlichter y Harker, 1976) condujo a la conclusión de que el cambio de forma inducido por frío *per se* era responsable de la eliminación rápida de las plaquetas enfriadas. Presumiblemente, las plaquetas con forma irregular deformadas por enfriamiento quedaban atrapadas en la microcirculación.

Basándose en nuestros estudios que relacionaban la señalización con los mecanismos que conducen a los cambios en la forma de las plaquetas inducidos por ligandos (Hartwig et al., 1995), predijimos que el enfriamiento, inhibiendo la extrusión de calcio, podría elevar los niveles de calcio hasta un grado consistente con la activación de la proteína gelsolina, que corta los filamentos de actina y recubre los extremos positivos de los filamentos de actina. También argumentamos que una transición de la fase lipídica de membrana a temperaturas bajas agruparía los fosfoinosítidos. El agrupamiento de fosfoinosítidos destapa los extremos positivos de los filamentos de actina (Janmey y Stossel, 1989) para crear sitios de nucleación para el alargamiento de los filamentos. Aportamos pruebas experimentales para ambos mecanismos, documentando la activación de la gelsolina, el destape de los extremos positivos de los filamentos de actina, y el ensamblaje de la actina en plaquetas enfriadas (Hoffmeister et al., 2001; y

Winokur y Hartwig, 1995). Otros han dado a conocer cambios espectroscópicos en plaquetas enfriadas consistentes con una transición de fase de membrana (Tablin et al., 1996). Esta información sugirió un método para mantener la forma discoidal de las plaquetas enfriadas, usando un quelante de calcio permeable a las células para inhibir el aumento de calcio y citocalasina B para evitar el ensamblaje de la actina en extremos positivos. Aunque la adición de estos agentes conservó la forma discoidal de las plaquetas a 4°C (Winokur y Hartwig, 1995), tales plaquetas también se eliminan rápidamente de la circulación, como damos a conocer aquí. Por lo tanto, continúa existiendo el problema de la eliminación rápida de las plaquetas enfriadas, y son necesarios métodos para aumentar el tiempo de circulación así como el tiempo de almacenamiento para plaquetas.

SUMARIO DE LA INVENCION

Se ha descubierto ahora que el enfriamiento de plaquetas humanas causa el agrupamiento de los complejos de la subunidad α (GP1b α) del complejo del receptor del factor von Willebrand (vWf) en la superficie de las plaquetas. El agrupamiento de complejos de GP1b α en la superficie de las plaquetas provoca el reconocimiento por receptores del complemento de macrófagos tipo tres (α M β 2, CR3) *in vitro* e *in vivo*. Los receptores CR3 reconocen azúcares enlazados mediante N con β GlcNAc terminales en la superficie de las plaquetas, que han formado complejos GP1b α , y fagocitan las plaquetas, eliminándolas de la circulación y dando como resultado una pérdida concomitante de la función hemostática.

Los solicitantes han descubierto que el tratamiento de plaquetas con una cantidad efectiva de un azúcar nucleotídico, ácido citidin-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico (CMP-ácido siálico), que es un agente modificador de glucano, conduce a la sialilación en GP1b α de los restos de β GlcNAc expuestos. Las cantidades efectivas de un agente modificador de glucano varían de aproximadamente 1 micromolar a aproximadamente 10 milimolares, aproximadamente 1 micromolar a aproximadamente 1 milimolar y, lo más preferentemente, aproximadamente 200 micromolares a aproximadamente 600 micromolares del agente modificador de glucano. Esto tiene el efecto funcional de reducir la eliminación de plaquetas, bloquear la fagocitosis plaquetaria, aumentar el tiempo de circulación de las plaquetas, y aumentar tanto el tiempo de almacenamiento de las plaquetas como la tolerancia a los cambios en la temperatura. Adicionalmente, las plaquetas tomadas de un mamífero se pueden almacenar en frío durante periodos prolongados, es decir, a 4 grados C durante 24 horas, 2 días, 3 días, 5 días, 7 días, 12 días o 20 días o más, sin pérdida significativa de la función hemostática después del trasplante. El almacenamiento en frío proporciona una ventaja que inhibe el crecimiento de microorganismos contaminantes en la preparación de plaquetas, importante ya que las plaquetas se suministran típicamente a pacientes con cáncer y a otros pacientes inmunocomprometidos.

En un primer aspecto, la invención proporciona un aparato según la reivindicación 1. En una realización, la invención incluye un tercer recipiente estéril que tiene uno o más puertos adaptados al primer recipiente a través de un segundo conducto estéril unible reversiblemente al puerto del primer recipiente y al puerto del tercer recipiente, comprendiendo el conducto además una válvula. En otra realización, la invención incluye un filtro de leucocitos. En diversas realizaciones, algunas mostradas en las figuras, el primer recipiente, el segundo recipiente o el tercer recipiente son bolsas de sangre o una jeringuilla. Las plaquetas adecuadas para la modificación en el bioproceso incluyen una población de plaquetas obtenidas de sangre de donante aleatorio individual, sangre de varios donantes juntos aleatorios, o sangre de un solo donante. En otras diversas realizaciones, el conducto se adapta a un filtro en línea que tiene un diámetro medio de poros suficientemente pequeño para evitar sustancialmente el flujo de bacterias a través del filtro en línea. Los diámetros medios de poros preferidos para el filtro en línea tienen menos de aproximadamente 1 micrómetro, más preferiblemente menos de aproximadamente 0,50 micrómetros, y muy preferiblemente aproximadamente 0,22 micrómetros. En todavía otra realización, el puerto del segundo recipiente tiene una barrera frangible. En incluso otra realización, el primer conducto o el segundo conducto se une reversiblemente al puerto del primer recipiente, al puerto del segundo recipiente o al puerto del tercer recipiente a través de un alojamiento estéril.

En otro aspecto, la invención proporciona un aparato para procesar una muestra de plaquetas según la reivindicación 10. En una realización, las células sanguíneas comprenden además una población de plaquetas obtenidas de sangre de donante aleatorio individual, sangre de varios donantes aleatorios reunida, o sangre de un solo donante. En otra realización, el conjunto comprende además un filtro para leucocitos próximo al primer recipiente. En incluso otra realización, el CMP-ácido siálico está contenido en el primer recipiente. En otra realización, la invención incluye un segundo recipiente que tiene uno o más puertos y que contiene un CMP-ácido siálico que modifica la superficie de las plaquetas, el primer recipiente adaptado al segundo recipiente a través de un conducto estéril unible de forma reversible al puerto del primer recipiente y al puerto del segundo recipiente. En todavía aún otra realización, el segundo recipiente es una jeringuilla. En una realización, el conducto se adapta a un filtro en línea que tiene un diámetro medio de poros suficientemente pequeño para evitar sustancialmente el flujo de bacterias a través del filtro en línea. En otra realización, los diámetros medios de los poros para el filtro en línea son menores que aproximadamente 1 micrómetro, más preferiblemente menores que aproximadamente 0,50 micrómetros, y lo más preferible aproximadamente 0,22 micrómetros. En otra realización, el puerto del segundo recipiente tiene una barrera frangible.

En otro aspecto, la invención proporciona un aparato para procesar una muestra de plaquetas según la reivindicación 8. En otra realización, los diámetros medios de poros para el filtro en línea son menores que aproximadamente 1 micrómetro, más preferiblemente menores que aproximadamente 0,50 micrómetros, y lo más preferible aproximadamente 0,22 micrómetros. En otra realización, el puerto del segundo recipiente tiene una barrera frangible. En otra realización, las células de la sangre comprenden además una población de sangre de donante aleatorio individual, sangre de varios donantes aleatorios reunida, o sangre de un solo donante. En otra realización, el conjunto comprende además un filtro para leucocitos próximo al primer recipiente.

En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar una plaqueta según la reivindicación 20. En otra realización, los diámetros medios de poros para el filtro en línea son menores que aproximadamente 1 micrómetro, más preferiblemente menores que aproximadamente 0,50 micrómetros, y lo más preferible aproximadamente 0,22 micrómetros. En otra realización, el puerto del segundo recipiente tiene una barrera frangible. En otra realización, las células de la sangre comprenden además una población de sangre de donante aleatorio individual, sangre de varios donantes aleatorios reunida, o sangre de un solo donante. En otra realización, el método proporciona el que las plaquetas estén en contacto con el CMP-ácido siálico antes de la infusión de las células sanguíneas tratadas a un paciente. En otra realización, el método proporciona el que las plaquetas estén en contacto con el CMP-ácido siálico antes del almacenamiento en frío de las células de la sangre. En otra realización, el método proporciona el que las plaquetas estén en contacto con el CMP-ácido siálico en el momento de la recogida de sangre de un donante de sangre. En otra realización, el método proporciona la separación de las células de la sangre en subpoblaciones de plaquetas, plasma, glóbulos rojos y glóbulos blancos. En otra realización, las plaquetas están en contacto con el CMP-ácido siálico después de que las células de la sangre se han separado mediante aféresis.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula sanguínea tratada obtenida a través de los métodos descritos. Las células sanguíneas tratadas, después del almacenamiento en frío, son adecuadas para la transfusión a un paciente. Estos y otros aspectos de la invención, así como diversas ventajas y utilidades, serán más manifiestos con referencia a la siguiente descripción detallada de la invención. Cada una de las limitaciones de la invención puede englobar diversas realizaciones de la invención. Por lo tanto, se anticipa que cada una de las limitaciones que implican cualquier elemento o combinación de elementos puede estar incluida en cada aspecto de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1A muestra el tiempo de circulación en ratones de plaquetas a temperatura ambiente y de plaquetas enfriadas y vueltas a calentar en presencia o ausencia de EGTA-AM y citocalasina B. Las curvas representan la supervivencia de las plaquetas a temperatura ambiente (RT) marcadas con diacetato de 5-clorometilfluoresceína (CMFDA), plaquetas enfriadas a una temperatura del baño de hielo (Frías) y vueltas a calentar hasta la temperatura ambiente antes de la inyección, y plaquetas enfriadas y vueltas a calentar tratadas con EGTA-AM y citocalasina B (Frías + CytoB/EGTA) para conservar su forma discoidal. Cada curva representa la media \pm SD de 6 ratones. Se observaron patrones de eliminación idénticos con plaquetas marcadas con 111 Indio.

La FIG. 1B muestra que las plaquetas enfriadas se agregan normalmente *in vitro*. Se estimularon plaquetas de tipo salvaje lavadas, enfriadas y vueltas a calentar (Frías), o a temperatura ambiente (RT) mediante adición de los agonistas indicados, a 37°C, y se registró la transmisión de luz en un agregómetro estándar. Las respuestas de agregación de las plaquetas enfriadas tratadas con EGTA-AM y citocalasina B fueron idénticas a las plaquetas enfriadas no tratadas.

La FIG. 1C muestra que la eliminación inducida por frío se produce predominantemente en el hígado de los ratones. El hígado es el órgano de eliminación principal de las plaquetas enfriadas, que contiene 60-90% de plaquetas inyectadas. Por el contrario, las plaquetas a RT se eliminaron de forma mucho más lenta en el bazo. Se inyectaron plaquetas marcadas con 111 Indio en ratones genéticamente idénticos, y los tejidos se recogieron a 0,5, 1 y 24 horas. Los datos se expresan por gramo de tejido. Cada barra representa los valores medios de 4 animales analizados \pm SD.

La FIG. 1D muestra que las plaquetas enfriadas se colocan con macrófagos sinusoidales hepáticos (células de Kupffer). Esta micrografía confocal representativa muestra la distribución hepática de plaquetas marcadas con CMFDA, enfriadas y vueltas a calentar (verde) después de 1 hora de transfusión, que se acumulan preferentemente en los campos periportal y de la zona central de los lóbulos hepáticos. Las células de Kupffer se visualizaron tras la inyección de esferas marcadas con rojo Nilo. La micrografía conjunta muestra la colocación de plaquetas enfriadas y macrófagos en amarillo. Se indica la organización de los lóbulos (CV: vena central; PV: vena porta, barra: 100 μ M).

La FIG. 2 muestra que las plaquetas enfriadas circulan normalmente en ratones con deficiencia de CR3, pero no en ratones con deficiencia del complemento 3 (C3) o vWf. Plaquetas de tipo salvaje marcadas con CMFDA enfriadas y vueltas a calentar (Frías) y a temperatura ambiente (RT) se transfundieron en cada uno de seis ratones receptores de tipo salvaje genéticamente idénticos (WT), con deficiencia de CR3 (A), con deficiencia de vWf (B) y con deficiencia de C3 (C), y se determinaron sus tiempos de supervivencia. Las plaquetas enfriadas circulan en animales

con deficiencia de CR3 con la misma cinética que las plaquetas a temperatura ambiente, pero se eliminan rápidamente de la circulación de ratones con deficiencia de C3 o vWf. Los datos son la media \pm SD para 6 ratones.

La FIG. 3 muestra que las plaquetas enfriadas se adhieren fuertemente *in vivo* a macrófagos de ratones que expresan CR3. FIG. 3A – Las plaquetas marcadas con TRITC enfriadas y vueltas a calentar (panel izquierdo) se adhieren con una frecuencia 3-4 x mayor a sinusoides hepáticos que las plaquetas a temperatura ambiente marcadas con CMFDA (panel derecho). Se obtuvieron micrografías de fluorescencia intravital 30 minutos después de la infusión de las plaquetas. FIG. 3B – Las plaquetas enfriadas y vueltas a calentar (Frías, barras en blanco) y a temperatura ambiente (RT, barras en negro) se adhieren a regiones sinusoidales con densidad de macrófagos elevada (zona central), con distribuciones similares en ratones de tipo salvaje. Fig. 3C – Las plaquetas enfriadas y vueltas a calentar se adhieren 3-4 x más a macrófagos en el hígado de tipo salvaje (barras en blanco) que las plaquetas a temperatura ambiente. Por el contrario, las plaquetas enfriadas y vueltas a calentar o a temperatura ambiente tienen una adherencia idéntica a macrófagos en ratones con deficiencia de CR3 (barras negras). Se muestran 9 experimentos con ratones de tipo salvaje y 4 experimentos con ratones con deficiencia de CR3 (media \pm SEM, *P < 0,05; **P < 0,01).

La FIG. 4 muestra que GP1b α media la eliminación de plaquetas enfriadas, se agrega en frío, pero se une a vWf activado normalmente en plaquetas enfriadas. Fig. 4A – Las plaquetas marcadas con CMFDA, eliminadas enzimáticamente del dominio extracelular de GP1b α (panel izquierdo, encarte, área rellena), o plaquetas de control se mantuvieron a temperatura ambiente (panel izquierdo) o se enfriaron y se volvieron a calentar (panel derecho), se infundieron en ratones de tipo salvaje genéticamente idénticos, y se determinaron las supervivencias de las plaquetas. Cada curva de supervivencia representa los valores medios \pm SD para 6 ratones. Fig. 4B – La plaqueta enfriada o a RT, rica en plasma, se trató con (área sombreada) o sin (área despejada) botrocetina. Se detectó unión de vWf usando anticuerpo anti-vWf marcado con FITC. Fig. 4C – El receptor de vWf se redistribuye desde conjuntos lineales (RT) en agregados (Enfriados) sobre la superficie de plaquetas murinas enfriadas. Se incubaron plaquetas fijas, enfriadas y vueltas a calentar, o a temperatura ambiente (RT) con anticuerpos monoclonales de rata anti-GP1b α de ratón, seguido de partículas de oro coloidal de 10 nm revestidas con anticuerpo de cabra anti-IgG de rata. Las barras son 100 nm. Encarte: aumento de baja resolución de plaquetas.

La FIG. 5 muestra que la interacción GP1b α -CR3 media la fagocitosis *in vitro* de plaquetas humanas enfriadas. Las FIGS. 5A y 5B muestran un resultado de ensayo representativo de células TFP-1 incubadas con plaquetas a temperatura ambiente (RT) (Fig. 5A) o enfriadas y vueltas a calentar (Frías) (Fig. 5B). Las plaquetas marcadas con CM-naranja asociadas con macrófagos se desplazan en la fluorescencia naranja hacia arriba del eje y. El porcentaje medio de los macrófagos nativos positivos a CM-naranja incubados con plaquetas mantenidas a temperatura ambiente se normalizó a 1. El enfriamiento de las plaquetas aumenta este desplazamiento de ~4% a 20%. Las plaquetas son predominantemente ingeridas, debido a que no se marcan de forma dual con el mAb conjugado a FITC para CD61. Fig. 5C Las células THP-1 no diferenciadas (barras en blanco) expresan ~50% menos CR3, e ingieren casi la mitad de las plaquetas enfriadas y vueltas a calentar. Sin embargo, la diferenciación (barras negras) de la expresión de CR3 no tuvo un efecto significativo sobre la captación de las plaquetas a RT. El tratamiento de plaquetas humanas con la metaloproteasa de veneno de serpiente, mocarhagina (Moc), que elimina el término N de GP1b α de la superficie de plaquetas humanas (encarte; control: línea continua, plaquetas tratadas con mocarhagina: área sombreada), redujo la fagocitosis de plaquetas enfriadas en un ~98%. Los datos mostrados son media \pm SD de 5 experimentos.

La FIG. 6 muestra plaquetas enfriadas circulantes que tienen función hemostática en ratones con deficiencia de CR3. Función normal *in vivo* de plaquetas a temperatura ambiente (RT) transfundidas en ratones de tipo salvaje (Fig. 6A y 6B), y de plaquetas enfriadas (Frías) transfundidas en ratones con deficiencia de CR3 (Fig. 6C y 6D), según se determina por su presencia equivalente en agregados plaquetarios que surgen de la herida 24 horas después de la infusión de plaquetas autólogas marcadas con CMFDA. La sangre periférica (Fig. 6A y 6C) y la sangre que surge de la herida (sangre derramada, Fig. 6B y 6D) se analizaron mediante citometría de flujo de sangre completa. Las plaquetas se identificaron mediante características de dispersión de luz directa y unión del mAb anti-GP1b α (pOp4) conjugado con PE. Las plaquetas infundidas (puntos) se identificaron por su fluorescencia de CMFDA, y las plaquetas no infundidas (líneas de contorno) por su falta de fluorescencia de CMFDA. En las muestras de sangre completa periférica, las regiones de análisis se representaron gráficamente alrededor de las partículas positivas a GP1b α para incluir el 95% de la población en el eje de dispersión directa (región 1), y el 5% de las partículas que aparecen por encima de este umbral de dispersión de luz directa se definió como agregados (región 2). Los porcentajes se refieren al número de agregados formados por plaquetas positivas a CMFDA. Este resultado mostrado es representativo de 4 experimentos. La Fig. 6E muestra la función *ex vivo* de las plaquetas a temperatura ambiente (RT) marcadas con CM-naranja, transfundidas en ratones de tipo salvaje, y plaquetas enfriadas y vueltas a calentar (Frías) marcadas con CM-naranja, transfundidas en ratones con deficiencia de CR3, según se determina mediante exposición de P-selectina y unión a fibrinógeno tras la activación con trombina (1 U/ml) de sangre extraída de los ratones después de 24 horas tras la infusión. Las plaquetas marcadas con CM-naranja tienen un tiempo de semivida de circulación comparable al de las plaquetas marcadas con CMFDA (no mostrado). Las plaquetas transfundidas se identificaron por su fluorescencia de CM-naranja (barras oscuras). Las

plaquetas analizadas no transfundidas (no marcadas) se representan como barras en blanco. Los resultados se expresan como el porcentaje de células presentes en las regiones positivas a P-selectina y fibrinógeno (región 2). Los datos son la media \pm SD para 4 ratones.

5 La FIG. 7 es un diagrama esquemático que representa dos rutas de eliminación de plaquetas. Las plaquetas atraviesan las circulaciones central y periférica, sufriendo un cebado reversible a menores temperaturas en la superficie corporal. El cebado repetido conduce a la reconfiguración y eliminación del complejo del receptor de GP1b-IX-V (vWfR) irreversible por macrófagos hepáticos que poseen el receptor del complemento tipo 3 (CR3). Las plaquetas también son eliminadas después de que participan en la coagulación microvascular.

La FIG. 8 muestra el efecto de monosacáridos sobre la fagocitosis de plaquetas enfriadas.

10 La FIG. 9 muestra los diagramas de puntos de la unión de WGA lectina a plaquetas a temperatura ambiente o plaquetas enfriadas.

La FIG. 10 muestra el análisis de diversas lectinas marcadas con FITC unidas a plaquetas a temperatura ambiente o enfriadas.

15 La FIG. 11A muestra el sumario de la unión de FITC-WGA a la superficie de plaquetas a temperatura ambiente o enfriadas obtenidas mediante citometría de flujo antes y después del tratamiento con β -hexosaminidasa.

La FIG. 11B muestra que la eliminación de GP1b α de la superficie de las plaquetas reduce la unión de FITC-WGA a plaquetas enfriadas.

20 La FIG. 12 muestra con fines ilustrativos que la transferencia de galactosa sobre oligosacáridos plaquetarios reduce la fagocitosis de plaquetas enfriadas (Frías), pero no afecta a la fagocitosis de plaquetas a temperatura ambiente (RT).

La FIG. 13 muestra con fines ilustrativos la supervivencia de plaquetas murinas enfriadas galactosiladas con relación a plaquetas sin tratar.

25 La FIG. 14 muestra con fines ilustrativos que las plaquetas que contienen galactosa transferasas sobre su superficie transfieren galactosa sin la adición de transferasas externas, según se juzga mediante la unión de WGA (Fig. 14A) y los resultados de fagocitosis *in vitro* para plaquetas humanas (Fig. 14B). La Fig. 14C muestra con fines ilustrativos que de UDP-galactosa con o sin galactosa transferasa (GalT) sobre la supervivencia de plaquetas murinas. Se añadió UDP-galactosa con o sin GalT a plaquetas murinas antes de enfriar durante 30 minutos a 37°C. Las plaquetas se enfriaron durante 2 horas en un baño de hielo, y después se transfundieron (10^8 plaquetas/ratón) en ratones y se determinó su supervivencia.

30 La FIG. 15 muestra con fines ilustrativos el transcurso de tiempo de la incorporación de UDP-galactosa marcada con 14 C en plaquetas humanas.

La FIG. 16 muestra con fines ilustrativos la galactosilación de plaquetas en cuatro muestras de concentrado de plaquetas a diferentes concentraciones de UDP-galactosa.

La FIG. 17 muestra que el receptor del complemento media la fagocitosis y la eliminación de plaquetas enfriadas.

35 La FIG. 18 muestra que la subunidad GP1b α del receptor del factor de von Willebrand de plaquetas se une al dominio I de α M de α M/ β 2 integrina.

La FIG. 19 muestra que las plaquetas enfriadas circulan y funcionan normalmente en ratones a los que se les ha desactivado α M.

La FIG. 20 ilustra la inactivación del receptor de vWf.

40 La FIG. 21 muestra que α M/ β 2 reconoce la punta exterior de GP1b α y media la eliminación de las plaquetas enfriadas, demostrando así que GP1b α tiene funciones coagulantes (unión de vWf) y no coagulantes (eliminación).

La FIG. 22 ilustra la estructura primaria de α M (CD11b).

La FIG. 23 muestra que α M tiene un sitio de afinidad de lectina.

45 La FIG. 24 muestra que el dominio de lectina de los receptores de α M/ β 2 de macrófagos reconoce los restos de β GlcNAc en GP1b α agrupada.

La FIG. 25 muestra que un dominio de α M-lectina soluble inhibe la fagocitosis de plaquetas humanas enfriadas por

macrófagos.

La FIG. 26 muestra la construcción de células CHO que expresan proteínas quiméricas $\alpha M\alpha X$.

La FIG. 27 ilustra un ensayo fagocítico para la superficie de plaquetas alterada inducido por enfriamiento.

La FIG. 28 muestra que el dominio de αM -lectina media la fagocitosis de plaquetas humanas enfriadas.

- 5 La FIG. 29 muestra que los receptores de $\alpha M/\beta 2$ de macrófagos reconocen restos de βGlcNAc en receptores de $\text{GP1b}\alpha$ agrupados de plaquetas enfriadas.

La FIG. 30 ilustra la galactosilación de plaquetas a través de $\text{GP1b}\alpha$.

La FIG. 31 muestra la expresión de $\beta 4\text{GalT1}$ sobre la superficie de plaquetas.

La FIG. 32 ilustra que las plaquetas murinas enfriadas galactosiladas pueden circular in vivo.

- 10 La FIG. 33 ilustra que las plaquetas murinas enfriadas galactosiladas pueden funcionar normalmente en modelos murinos.

La FIG. 34 muestra con fines ilustrativos que los concentrados de plaquetas humanas se pueden galactosilar, lo que conserva la función de las plaquetas.

La FIG. 35 ilustra un método para la galactosilación de concentrados de plaquetas humanas.

- 15 La FIG. 36 muestra con fines ilustrativos que la galactosa de la superficie en los concentrados de plaquetas es estable.

La FIG. 37 muestra con fines ilustrativos que la galactosilación inhibe la fagocitosis de plaquetas enfriadas humanas por macrófagos THP-1.

- 20 La FIG. 38 muestra con fines ilustrativos que los recuentos plaquetarios y el pH permanecen sin cambios en concentrados de plaquetas refrigeradas.

La FIG. 39 muestra con fines ilustrativos los efectos de la refrigeración y galactosilación sobre la retención de respuestas plaquetarias a agonistas durante el almacenamiento de concentrados.

La FIG. 40 muestra con fines ilustrativos el efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el cambio de forma (extensión) y aglomeración de las plaquetas en concentrados.

- 25 La FIG. 41 ilustra un bioproceso para recolectar, tratar y almacenar plaquetas. Las plaquetas derivan de una diversidad de fuentes de sangre, incluyendo IRDP - plaquetas de donantes aleatorios individuales, PRDP - plaquetas de un conjunto de donantes aleatorios, y SDP - plaquetas de un único donante. El recipiente que tiene el agente modificador de glucano, por ejemplo una disolución de UDP-Gal y/o CMP-NeuAc, está acoplado de forma estéril a la bolsa que contiene las plaquetas. Un acoplamiento estéril también se denomina como un dispositivo de conexión estéril (SCD) o como un dispositivo de contención total (TCD). El acoplamiento estéril permite la conexión de dos piezas de conducto manteniendo mientras la esterilidad del sistema. El agente modificador de glucano se mezcla con las plaquetas, y entonces las plaquetas modificadas se transfirieron a una bolsa no transpirable. El agente modificador de glucano se puede introducir en las plaquetas en diversos momentos, por ejemplo antes de la infusión, antes del almacenamiento, después de los componentes, o directamente a sangre completa, o durante el procedimiento de aféresis de las plaquetas en el momento de la donación. Igualmente, la disolución modificadora de glucano se puede proporcionar en una variedad de formas, tal como un líquido de concentración de fuerza completa, un líquido concentrado – diluido antes del uso, deshidratada, secada por congelación, liofilizada, en polvo, congelada, fluido viscoso, suspensión, base y activador, o agente reaccionante y catalizador. En esta realización, la sangre se hace pasar a través de un filtro para leucocitos. En la técnica se conocen diversos métodos para agotar los leucocitos, por ejemplo lana de vidrio u otros métodos de separación por afinidad para eliminar fracciones leucocitarias de sangre completa, y proporcionan ejemplos de medios para filtrar los leucocitos del resto de la sangre, y específicamente de las plaquetas.
- 30
- 35
- 40

La FIG. 42 ilustra otra realización de la invención en la que se describe un bioproceso para recoger, tratar y almacenar plaquetas. Esta ilustración es similar a la FIG. 41, pero no incluye un filtro para leucocitos.

- 45 La FIG. 43 ilustra otra realización de la invención en la que se describe un bioproceso para recoger, tratar y almacenar plaquetas. La bolsa que contiene las plaquetas está unida de forma estéril a la bolsa que contiene la disolución de plaquetas. La disolución modificadora de glucanos, también denominada una disolución plaquetaria, se mezcla con las plaquetas y después se transfiere a una bolsa no transpirable y a través de un filtro para leucocitos.

La FIG. 44 ilustra una variación de la FIG. 43, que no incluye un filtro para leucocitos.

La FIG. 45 ilustra otro bioproceso para recoger, tratar y almacenar plaquetas. La jeringuilla que contiene la disolución plaquetaria (UDP-Gal y/o CMP-NeuAc) está unida de forma estéril a la bolsa que contiene las plaquetas. La disolución plaquetaria se mezcla con las plaquetas y después se transfiere a una bolsa no transpirable y a través de un filtro para leucocitos.

La FIG. 46 ilustra una variación de la FIG. 45, que no incluye un filtro para leucocitos.

La FIG. 47 ilustra otro bioproceso para recoger, tratar y almacenar plaquetas. La bolsa que contiene la disolución plaquetaria (UDP-Gal y/o CMP-NeuAc) se conecta al puerto del recipiente usando un espigón de bolsa a través de un filtro de 0,22 micrómetros a la bolsa que contiene las plaquetas. La disolución plaquetaria se mezcla con las plaquetas y después se transfiere a una bolsa no transpirable y a través de un filtro para leucocitos. Se ilustra un filtro de 0,22 micrómetros, pero los filtros de diámetros más grandes de poros son adecuados para proporcionar un mayor caudal. Los tamaños medios de poros mayores que aproximadamente 1 micrómetro no son adecuados para la filtración estéril. Los tamaños preferidos son menores que aproximadamente 0,75 micrómetros, más preferiblemente menores que aproximadamente 0,5 micrómetros, y muy preferiblemente aproximadamente 0,22 micrómetros.

La FIG. 48 ilustra una variación de la FIG. 47, que no incluye un filtro para leucocitos.

La FIG. 49 ilustra otra realización de la invención en la que se describe un bioproceso para recoger, tratar y almacenar plaquetas. La bolsa que contiene la disolución plaquetaria (ya sea monodosis o a granel) se conecta usando un cierre de tipo Luer a través de un filtro de 0,22 micrómetros a la bolsa que contiene las plaquetas. La disolución plaquetaria se mezcla con las plaquetas y se transfiere entonces a una bolsa no transpirable y a través de un filtro para leucocitos.

La FIG. 50 ilustra una variación de la FIG. 49, que no incluye un filtro para leucocitos.

La FIG. 51 ilustra otra realización de la invención en la que se describe un bioproceso para recoger, tratar y almacenar plaquetas. La jeringuilla que contiene la disolución plaquetaria se conecta, usando un cierre de tipo Luer, a través de un filtro de 0,22 micrómetros a la bolsa que contiene las plaquetas. La disolución plaquetaria se mezcla con las plaquetas y se transfiere entonces a una bolsa no transpirable y a través de un filtro para leucocitos. También mostrado, la IRDP se puede reunir para formar PRDP.

La FIG. 52 ilustra una variación de la FIG. 51, que no incluye un filtro para leucocitos.

La FIG. 53 ilustra otra realización de la invención en la que se describe un bioproceso para recoger, tratar y almacenar plaquetas. La jeringuilla que contiene la disolución plaquetaria se conecta, usando un cierre de tipo Luer, a través de un filtro de 0,22 micrómetros a la bolsa que contiene las plaquetas. La disolución plaquetaria se mezcla con las plaquetas y se transfiere entonces a una bolsa no transpirable y a través de un filtro para leucocitos. La jeringuilla se puede rellenar asépticamente desde la disolución plaquetaria a granel debido al dispositivo de filtración en línea.

La FIG. 54 ilustra una variación de la FIG. 53, que no incluye un filtro para leucocitos.

La FIG. 55 ilustra otra realización de la invención en la que se describe un bioproceso para recoger, tratar y almacenar plaquetas. La gran bolsa no transpirable (bolsa de almacenamiento final) que contiene la disolución plaquetaria incluye un conjunto que comprende un gran trozo de conducto y una pluralidad de puertos para permitir el alojamiento estéril de múltiples bolsas de IRDP secuencialmente desde el extremo distal del tubo (representado por #8) hasta el extremo próximo (representado por #1) a través de un filtro de 0,22 micrómetros a la bolsa que contiene la disolución plaquetaria. La disolución plaquetaria se mezcla con las plaquetas reunidas.

La FIG. 56 ilustra una variación de la FIG. 55, que no incluye un filtro para leucocitos.

La FIG. 57 ilustra otra realización de la invención en la que se describe un bioproceso para recoger, tratar y almacenar plaquetas. El suministro de la disolución plaquetaria a la bolsa de contención se facilita por un SCD en la bolsa.

La FIG. 58 ilustra una variación de la FIG. 57, que no incluye un filtro para leucocitos.

La FIG. 59 ilustra una variación de la FIG. 57. La gran bolsa no transpirable (bolsa de almacenamiento final) tiene la disolución plaquetaria, almacenada en una jeringuilla, conectada asépticamente y añadida a través de un filtro de 0,22 micrómetros.

La FIG. 60 ilustra una variación de la FIG. 59, que no incluye un filtro para leucocitos.

La FIG. 61 ilustra una variación de la invención, en la que un recipiente que tiene disolución plaquetaria se adapta al recipiente que tiene células sanguíneas a través de un conducto fijable vía una conexión de cierre tipo Luer. El conducto tiene una espiga de bolsa para perforar una barrera en el recipiente, permitiendo de ese modo la extracción de la disolución modificadora de glucanos.

5 La FIG. 62 ilustra una variación de la FIG. 61, que no incluye un filtro para leucocitos.

La FIG. 63 ilustra otra realización de la invención, en la que se describe un bioproceso para recoger, tratar y almacenar plaquetas. La gran bolsa no transpirable (bolsa de almacenamiento final) tiene la disolución plaquetaria, almacenada en una bolsa, conectada con un tapón frangible que se puede abrir para suministrar la disolución plaquetaria.

10 La FIG. 64 ilustra una variación de la FIG. 63, que no incluye un filtro para leucocitos.

La FIG. 65 ilustra otra realización de la invención, en la que se describe un bioproceso para recoger, tratar y almacenar plaquetas. La gran bolsa no transpirable (bolsa de almacenamiento final) incluye una bolsa integrada de disolución plaquetaria que tiene un tapón frangible que se puede abrir para suministrar la disolución plaquetaria directamente en el recipiente de almacenamiento de plaquetas.

15 La FIG. 66 ilustra una variación de la realización ilustrada como FIG. 65. La bolsa que tiene la disolución modificadora de plaquetas se integra en la bolsa de almacenamiento. La disolución plaquetaria se libera al romper el tapón frangible con la membrana de separación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 La invención utiliza una población de plaquetas modificadas que tienen propiedades de circulación mejoradas y que mantienen una actividad hemostática sustancialmente normal *in vivo*. La actividad hemostática se refiere de forma general a la capacidad de una población de plaquetas para mediar el cese del sangrado. Diversos ensayos están disponibles para determinar la actividad hemostática plaquetaria (Bennett, J. S. y Shattil, S. J., 1990, "Platelet function", Hematology, Williams, W. J., et al., Eds. McGraw Hill, páginas 1233-12250). Sin embargo, la demostración de "hemostasis" o "actividad hemostática" requiere en última instancia una demostración de que las plaquetas

25 infundidas en un ser humano o un animal trombocitopénico o trombopático (es decir, plaquetas no funcionales) circulan y detienen el sangrado natural o inducido experimentalmente.

Para llevar a cabo dicha demostración, los laboratorios usan pruebas *in vitro* como sustitutos para determinar la actividad hemostática. Estas pruebas, que incluyen ensayos de agregación, secreción, morfología plaquetaria y cambios metabólicos, miden una amplia diversidad de respuestas funcionales plaquetarias a la activación. Se acepta

30 generalmente en la técnica que las pruebas *in vitro* son indicadores razonables de función hemostática *in vivo*.

La actividad hemostática sustancialmente normal se refiere a una cantidad de actividad hemostática observada en las plaquetas modificadas, que es funcionalmente equivalente o sustancialmente similar a la actividad hemostática de plaquetas no tratadas *in vivo*, en un individuo sano (mamífero no trombocitopénico o no trombopático) o funcionalmente equivalente o sustancialmente similar a la actividad hemostática de una población de plaquetas recién aislada *in vitro*.

35

Se describen métodos para almacenamiento a temperatura reducida de plaquetas que aumentan el tiempo de almacenamiento de las plaquetas, así como métodos para reducir la eliminación de o aumentar el tiempo de circulación de una población de plaquetas en un mamífero. También se proporcionan métodos para composiciones de plaquetas y composiciones para la conservación de plaquetas con actividad hemostática conservada, así como

40 métodos para obtener una composición farmacéutica que contiene las plaquetas conservadas y para administrar la composición farmacéutica a un mamífero para mediar la hemostasis. También se proporcionan kits para tratar una preparación de plaquetas para su almacenamiento, y recipientes para almacenar la misma.

El método para aumentar el tiempo de circulación de una población de plaquetas aislada implica poner en contacto una población de plaquetas aislada con al menos un agente modificador de glucano en una cantidad eficaz para

45 reducir la eliminación de la población de plaquetas. Como se usa en el presente documento, una población de plaquetas se refiere a una muestra que tiene una o más plaquetas. Una población de plaquetas incluye un concentrado de plaquetas. El término "aislado" quiere decir separado de su ambiente nativo y presente en cantidad suficiente para permitir su identificación o uso. Como se usa en el presente documento con respecto a una población de plaquetas, aislado quiere decir retirado o eliminado de la circulación sanguínea de un mamífero. El tiempo de

50 circulación de una población de plaquetas se define como el tiempo en el que una mitad de las plaquetas de esa población deja de circular en un mamífero después del trasplante en ese mamífero. Como se usa en el presente documento, "eliminación" quiere decir la retirada de las plaquetas modificadas de la circulación sanguínea de un mamífero (tal como, pero sin limitarse a fagocitosis por macrófagos). Como se usa en el presente documento, la eliminación de una población de plaquetas se refiere a la retirada de una población de plaquetas a partir de una

55 unidad de volumen de sangre o suero por unidad de tiempo. Reducir la eliminación de una población de plaquetas

se refiere a evitar, retardar o reducir la eliminación de la población de plaquetas. Reducir la eliminación de plaquetas también puede querer decir reducir la velocidad de eliminación de plaquetas.

Un agente modificador de glucano se refiere a un agente que modifica restos de glucano en la plaqueta. Como se usa en el presente documento, un "glucano" o "resto de glucano" es un resto polisacárido en la superficie de la plaqueta, ejemplificado mediante el polisacárido GP1b α . Un resto de glucano o glucano "terminal" es el glucano en el extremo distal del polisacárido, que típicamente está unido a polipéptidos en la superficie de la plaqueta. Preferentemente, el agente modificador de glucano altera GP1b α sobre la superficie de la plaqueta.

Una cantidad eficaz de un agente modificador de glucano es aquella cantidad del agente modificador de glucano que altera un número suficiente de restos de glucano sobre la superficie de las plaquetas, que cuando se introduce en una población de plaquetas, aumenta el tiempo de circulación y/o reduce la eliminación de la población de plaquetas en un mamífero después del trasplante de las plaquetas en el mamífero. Una cantidad efectiva de un agente modificador de glucano es una concentración de aproximadamente 1 micromolar a aproximadamente 1200 micromolares, preferentemente de aproximadamente 10 micromolares a aproximadamente 1000 micromolares, más preferentemente de aproximadamente 100 micromolares a aproximadamente 750 micromolares, y lo más preferentemente de aproximadamente 200 micromolares a aproximadamente 600 micromolares.

La modificación de plaquetas con agentes modificadores de glucano se puede llevar a cabo como sigue. La población de plaquetas se incuba con el agente modificador de glucano seleccionado (concentraciones de 1-1200 μ M) durante al menos 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 120, 180, 240 o 300 min. a 22°C-37°C. Múltiples agentes modificadores de glucano (es decir, dos, tres, cuatro o más) se pueden usar simultánea o secuencialmente. En algunos ejemplos, que no están abarcados por la invención, se añaden 0,1-500 mU/ml de galactosa transferasa o sialil transferasa a la población de plaquetas. La transferencia de galactosa se puede monitorizar funcionalmente usando una unión a FITC-WGA (aglutinina de germen de trigo). El objetivo de la reacción de modificación de glucano es reducir la unión a WGA hasta niveles de unión a WGA en reposo a temperatura ambiente. La transferencia de galactosa se puede cuantificar usando 14 C-UDP-galactosa. La UDP-galactosa no radiactiva se mezcla con 14 C-UDP-galactosa para obtener la transferencia adecuada de galactosa. Las plaquetas se lavan abundantemente, y la radiactividad incorporada se mide usando un contador γ . La cpm medida permite el cálculo de la galactosa incorporada. Técnicas similares son aplicables para monitorizar la transferencia de ácido siálico.

Reducir la eliminación de una plaqueta comprende reducir la eliminación de plaquetas después del almacenamiento a temperatura ambiente, o después del enfriamiento, así como la "activación plaquetaria inducida por frío". La activación plaquetaria inducida por frío es una expresión que tiene un significado concreto para un experto en la técnica. La activación plaquetaria inducida por frío puede manifestarse por cambios en la morfología de las plaquetas, algunos de los cuales son similares a los cambios que se producen después de la activación plaquetaria mediante, por ejemplo, contacto con vidrio. Los cambios estructurales que indican la activación plaquetaria inducida por frío se identifican más fácilmente usando técnicas tales como microscopía óptica o electrónica. En una escala molecular, la activación plaquetaria inducida por frío da como resultado la formación de haces de actina y un subsiguiente aumento en la concentración de calcio intracelular. La formación de haces de actina se detecta usando, por ejemplo, microscopía electrónica. Un aumento en la concentración de calcio intracelular se determina, por ejemplo, empleando quelantes de calcio fluorescentes en el medio intracelular. Muchos de los quelantes anteriormente descritos para inhibir el corte de filamentos de actina también son útiles para determinar la concentración de calcio intracelular (Tsien, R, 1980, supra). De acuerdo con ello, diversas técnicas están disponibles para determinar si las plaquetas han experimentado activación inducida por frío o no.

El efecto de la adición de ácido siálico a los restos de glucano en plaquetas, dando como resultado la eliminación disminuida de plaquetas modificadas, puede medirse por ejemplo usando bien un sistema *in vitro* empleando células THP-1 diferenciadas o macrófagos murinos, aislados a partir de la cavidad peritoneal después de estimulación por inyección de tioglicolato. Se determina la velocidad de eliminación de plaquetas modificadas en comparación con plaquetas no modificadas. Para someter a prueba las velocidades de eliminación, las plaquetas modificadas se suministran a los macrófagos y se monitoriza la ingestión de las plaquetas por los macrófagos. La ingestión reducida de plaquetas modificadas en relación con plaquetas no modificadas (el doble o más) indica una modificación exitosa del resto de glucano para los propósitos descritos en el presente documento.

De acuerdo con la invención, la población de plaquetas modificadas se puede enfriar sin los efectos perjudiciales (activación plaquetaria inducida por frío) experimentados normalmente en el enfriamiento de plaquetas no tratadas. La población de plaquetas modificadas se puede enfriar antes de, simultáneamente con, o después de poner en contacto las plaquetas con el al menos un agente modificador de glucano. La modificación selectiva de restos de glucano reduce la eliminación después del enfriamiento (también si no se enfrían), permitiendo así un almacenamiento a más largo plazo que el que es posible actualmente. Como se usa en el presente documento, enfriar se refiere a disminuir la temperatura de la población de plaquetas hasta una temperatura que es menor que aproximadamente 37°C. En algunas realizaciones, las plaquetas se enfrían hasta una temperatura que es menor que aproximadamente 15°C. En algunas realizaciones preferidas, las plaquetas se enfrían hasta una temperatura que varía desde entre aproximadamente 0°C hasta aproximadamente 4°C. Enfríar también engloba congelar la

preparación de plaquetas, es decir, hasta temperaturas menores que 0°C, -20°C, -50°C y -80°C o más frías. Los procesos para la criopreservación de células son bien conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, la población de plaquetas se almacena enfriada durante al menos 3 días. En algunas realizaciones, la población de plaquetas se almacena enfriada durante al menos 5, 7, 10, 14, 21 y 28 días o más.

- 5 En algunas realizaciones, el tiempo de circulación de la población de plaquetas se aumenta en al menos aproximadamente un 10%. En algunas otras realizaciones, el tiempo de circulación de la población de plaquetas se aumenta en al menos aproximadamente un 25%. En algunas otras realizaciones más, el tiempo de circulación de la población de plaquetas se aumenta en al menos de aproximadamente un 50% a aproximadamente un 100%. En otras realizaciones más, el tiempo de circulación de la población de plaquetas se aumenta en aproximadamente un 150% o más.

También se describe un método para aumentar el tiempo de almacenamiento de plaquetas. Tal como se usa en el presente documento, el tiempo de almacenamiento de plaquetas se define como el tiempo que las plaquetas se pueden almacenar sin pérdida sustancial de la función plaquetaria o actividad hemostática tal como la pérdida de la capacidad para circular o el aumento en la eliminación de plaquetas.

- 15 Las plaquetas se recogen de sangre periférica mediante técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo por aislamiento a partir de sangre completa o mediante procesos de aféresis. En algunas realizaciones, las plaquetas están contenidas en un vehículo farmacéuticamente aceptable antes del tratamiento con un agente modificador de glucano.

- 20 También se proporciona una plaqueta modificada o una población de plaquetas modificadas. La plaqueta modificada comprende una pluralidad de moléculas de glucano modificadas sobre la superficie de la plaqueta. En algunas realizaciones, los restos de glucano modificados son moléculas de GP1b α . También se proporciona una composición plaquetaria en un medio de almacenamiento. En algunas realizaciones, el medio de almacenamiento comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 25 La expresión “farmacéuticamente aceptable” quiere decir un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de las plaquetas y que es un material no tóxico que es compatible con un sistema biológico tal como una célula, cultivo celular, tejido u organismo. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizadores, solubilizantes y otros materiales que se conocen bien en la técnica, por ejemplo un tampón que estabiliza la preparación de plaquetas a un pH de 7,4, el pH fisiológico de la sangre, es una composición farmacéuticamente aceptable adecuada para usar con la presente invención.

- 30 También se proporciona un método para obtener una composición farmacéutica para la administración a un mamífero. El método comprende preparar la preparación plaquetaria descrita anteriormente, y calentar la preparación plaquetaria. En algunas realizaciones, el método comprende neutralizar, eliminar o diluir el agente o agentes modificadores de glucano y/o la enzima o enzimas que catalizan la modificación del resto de glucano, y colocar la preparación plaquetaria modificada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, las plaquetas enfriadas se calientan hasta la temperatura ambiente (alrededor de 22°C) antes de la neutralización o dilución. En algunas realizaciones, las plaquetas están contenidas en un vehículo farmacéuticamente aceptable antes de entrar en contacto con el agente o agentes modificadores de glucano con o sin la enzima o enzimas que catalizan la modificación del resto de glucano, y no es necesario colocar la preparación plaquetaria en un vehículo farmacéuticamente aceptable tras la neutralización o dilución.

- 40 Como se usa aquí, los términos “neutralizar” o “neutralización” se refieren a un proceso mediante el cual el agente o agentes modificadores de glucano y/o la enzima o enzimas que catalizan la modificación del resto de glucano se hacen sustancialmente incapaces de modificar los restos de glucano en las plaquetas, o su concentración en la disolución plaquetaria se reduce hasta niveles que no son dañinos para un mamífero, por ejemplo menores que 50 micromolar del agente modificador de glucano. En algunas realizaciones, las plaquetas enfriadas se neutralizan mediante dilución, por ejemplo con una suspensión de glóbulos rojos. Como alternativa, las plaquetas tratadas se pueden infundir en el recipiente, que es equivalente a la dilución en una suspensión de glóbulos rojos. Este método de neutralización mantiene ventajosamente un sistema cerrado, y minimiza el daño a las plaquetas. En una realización preferida de los agentes modificadores de glucano, no es necesaria la neutralización.

- 50 Un método alternativo para reducir la toxicidad es insertando un filtro en la línea de infusión, conteniendo el filtro, por ejemplo, carbón activado o un anticuerpo inmovilizado, para eliminar el agente o agentes modificadores de glucano y/o la enzima o enzimas que catalizan la modificación del resto de glucano.

Tanto uno o ambos del agente o agentes modificadores de glucano como la enzima o enzimas que catalizan la modificación del resto de glucano también se pueden eliminar o diluir sustancialmente lavando las plaquetas modificadas según técnicas de lavado de células clínicas estándar.

- 55 También se proporciona un método para mediar la hemostasis en un mamífero. El método incluye administrar la

preparación farmacéutica anteriormente descrita al mamífero. La administración de las plaquetas modificadas puede ser de acuerdo con métodos estándar conocidos en la técnica. De acuerdo con una realización, un paciente humano es transfundido con glóbulos rojos antes de, después de o durante la administración de las plaquetas modificadas. La transfusión de glóbulos rojos sirve para diluir las plaquetas modificadas administradas, neutralizando de esta forma el/los agente(s) modificador(es) de glucano y la(s) enzima(s) que cataliza(n) la modificación del resto glucano.

El régimen de dosificación para mediar la hemostasis usando las plaquetas modificadas se selecciona de acuerdo con una diversidad de factores, incluyendo el tipo, edad, peso, sexo y estado médico del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la vía y frecuencia de administración. Un médico o médico práctico de pericia normal puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de plaquetas modificadas requerida para mediar la hemostasis.

El régimen de dosificación puede determinarse, por ejemplo, siguiendo la respuesta al tratamiento en términos de signos clínicos y ensayos de laboratorio. Ejemplos de tales signos clínicos y ensayos de laboratorio se conocen bien en la técnica y se describen en, véase, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15a ed., Fauci AS et al., eds., McGraw-Hill, Nueva York, 2001.

También se proporcionan composiciones de almacenamiento y composiciones farmacéuticas para mediar la hemostasis. En una realización, las composiciones comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable, una pluralidad de plaquetas modificadas, una pluralidad de agente o agentes modificadores de glucano, y opcionalmente la enzima o enzimas que catalizan la modificación del resto de glucano. El agente o agentes modificadores de glucano y la enzima o enzimas que catalizan la modificación del resto de glucano están presentes en la composición en cantidades suficientes para reducir la eliminación de plaquetas. Preferiblemente, el agente o agentes modificadores de glucano (y opcionalmente la enzima o enzimas que catalizan la modificación del resto de glucano) están presentes en cantidades mediante las cuales, tras el enfriamiento y la neutralización, las plaquetas mantienen sustancialmente la actividad hemostática normal. Las cantidades de agente o agentes modificadores de glucano (y opcionalmente la enzima o enzimas que catalizan la modificación del resto de glucano) que reducen la eliminación plaquetaria se pueden seleccionar exponiendo una preparación de plaquetas a cantidades crecientes de estos agentes, exponiendo las plaquetas tratadas a una temperatura de enfriamiento, y determinando (por ejemplo, mediante microscopía) si se ha producido o no la activación plaquetaria inducida por frío. Preferiblemente, las cantidades de agente o agentes modificadores de glucano y de la enzima o enzimas que catalizan la modificación del resto de glucano se pueden determinar funcionalmente exponiendo las plaquetas a cantidades variables de agente o agentes modificadores de glucano y de la enzima o enzimas que catalizan la modificación del resto de glucano, enfriando las plaquetas como se describe aquí, calentando las plaquetas (enfriadas) tratadas, neutralizando opcionalmente las plaquetas, y ensayando las plaquetas en un ensayo de actividad hemostática para determinar si las plaquetas tratadas han mantenido sustancialmente la actividad hemostática normal.

Por ejemplo, para determinar las concentraciones y condiciones óptimas para evitar la activación de plaquetas inducida por frío modificándolas con un agente o agentes modificadores de glucano (y opcionalmente la enzima o enzimas que catalizan la modificación del resto de glucano), se ponen en contacto cantidades crecientes de estos agentes con las plaquetas antes de exponer las plaquetas a una temperatura de enfriamiento. Las concentraciones óptimas del agente o agentes modificadores de glucano y de la enzima o enzimas que catalizan la modificación del resto de glucano son las concentraciones mínimas efectivas que conservan intacta la función plaquetaria según se determina mediante ensayos in vitro (por ejemplo, observando cambios morfológicos en respuesta a vidrio, trombina, temperaturas de crioconservación; agregación inducida por ADP), seguido de ensayos in vivo que indican la función hemostática (por ejemplo, recuperación, supervivencia y acortamiento del tiempo de sangrado en un animal trombocitopénico, o recuperación y supervivencia de plaquetas marcadas con ⁵¹Cr en sujetos humanos).

También se proporciona una composición para añadir a plaquetas para reducir la eliminación plaquetaria, o incrementar el tiempo de almacenamiento de las plaquetas. La composición incluye uno o más agentes modificadores de glucano. En ciertas realizaciones, la composición también incluye una enzima o enzimas que catalizan la modificación del resto de glucano. El agente modificador de glucano y la enzima o enzimas que catalizan la modificación del resto de glucano están presentes en la composición en cantidades que evitan la activación plaquetaria inducida por frío.

También se proporciona una composición de almacenamiento para conservar las plaquetas. La composición de almacenamiento comprende al menos un agente modificador de glucano en una cantidad suficiente para reducir la eliminación plaquetaria. En algunas realizaciones, la composición de almacenamiento comprende además una enzima que cataliza la modificación del resto de glucano en la plaqueta. El agente modificador de glucano se añade a la población de plaquetas, que se mantiene preferiblemente entre aproximadamente la temperatura ambiente y 37°C. En algunas realizaciones, después del tratamiento, la población de plaquetas se enfría hasta aproximadamente 4°C. En algunas realizaciones, las plaquetas se recogen en un envase, bolsa o recipiente para plaquetas, según métodos estándar conocidos por el experto en la técnica. Típicamente, la sangre de un donante se extrae a un recipiente primario que se puede unir a al menos un recipiente satélite, recipientes los cuales están conectados y esterilizados antes del uso. En algunas realizaciones, el recipiente satélite está conectado al recipiente para recoger las plaquetas mediante un cierre rompible. En algunas realizaciones, el recipiente primario comprende

además plasma que contiene una pluralidad de plaquetas.

En algunas realizaciones, las plaquetas se concentran (por ejemplo, mediante centrifugación), y el plasma y los glóbulos rojos se extraen a bolsas satélite separadas (para evitar la modificación de estas fracciones clínicamente valiosas) antes de añadir el agente modificador de glucano con o sin la enzima que cataliza la modificación del resto de glucano en la plaqueta. La concentración de plaquetas antes del tratamiento también puede minimizar las cantidades de agentes modificadores de glucano requeridos para reducir la eliminación de las plaquetas, minimizando de ese modo las cantidades de estos agentes que son infundidos eventualmente en el paciente.

En una realización, el/los agente(s) modificador(es) de glucano se pone(n) en contacto con las plaquetas en un sistema cerrado, por ejemplo un envase de plaquetas estéril sellado, para evitar contaminación microbiana. Típicamente, un conducto para venopunción es la única abertura del envase durante el aporte o transfusión de plaquetas. De acuerdo con ello, para mantener un sistema cerrado durante el tratamiento de las plaquetas con el/los agente(s) modificador(es) de glucano, el/los agente(s) se sitúa(n) en un recipiente estéril relativamente pequeño que está unido al envase de plaquetas a través de un tubo de conexión estéril (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.412.835, cuyo contenido se incorpora en el presente documento como referencia). El tubo de conexión puede estar sellado reversiblemente, o tener un sellado rompible, como se conocerá por los expertos en la técnica. Después de que las plaquetas se concentren, por ejemplo permitiendo que las plaquetas sedimenten y sacando el plasma fuera del envase primario y metiéndolo en una segunda bolsa de acuerdo con la práctica estándar, el sellado del/de los recipiente(s) que incluye(n) el/los agente(s) modificador(es) de glucano se abre y los agentes se introducen dentro del envase de plaquetas. En una realización, los agentes modificadores de glucano están contenidos en recipientes separados que tienen tubos de conexión resellables separados para permitir la adición secuencial de los agentes modificadores de glucano al concentrado de plaquetas.

Después del contacto con el/los agente(s) modificador(es) de glucano, las plaquetas tratadas se enfrían. En contraste con las plaquetas almacenadas a, por ejemplo, 22°C, las plaquetas almacenadas a temperaturas de criopreservación tienen una actividad metabólica sustancialmente reducida. Así, las plaquetas almacenadas a 4°C son metabólicamente menos activas y por lo tanto no generan grandes cantidades de CO₂ en comparación con plaquetas almacenadas a, por ejemplo, 22°C. (Slichter, S. J., 1981, Vox Sang 40 (Supl. 1), págs. 72-86, Clinical Testing and Laboratory-Clinical correlations). La disolución de CO₂ en la matriz plaquetaria da como resultado una reducción del pH y una reducción concomitante en la viabilidad plaquetaria (Slichter, S., 1981, supra). Esto puede resolverse añadiendo tampones a la población de plaquetas, los tampones seleccionados para mantener la población de plaquetas al pH fisiológico de la sangre o cerca de él. Asimismo, los envases de plaquetas convencionales se hacen de materiales que están diseñados y contruidos de un material suficientemente permeable para maximizar el transporte de gas al interior y al exterior del envase (O₂ hacia el interior y CO₂ al exterior). Las limitaciones de la técnica previa en el diseño y construcción de envases de plaquetas son obviadas por la presente invención, que permite el almacenamiento de plaquetas a temperaturas de criopreservación, reduciendo así sustancialmente el metabolismo plaquetario y disminuyendo la cantidad de CO₂ generada por las plaquetas durante el almacenamiento. También se proporcionan recipientes de plaquetas que son sustancialmente no permeables a CO₂ y/o O₂, recipientes que son útiles en particular para el almacenamiento de plaquetas en frío. Tanto en las realizaciones permeables a gases como en las no permeables, la invención proporciona un recipiente de almacenamiento de sangre que contiene en él una cantidad de agente modificador de glucano suficiente para modificar sustancialmente los carbohidratos de las plaquetas introducidas en él, de tal forma que las plaquetas se hacen aptas para el almacenamiento en frío y la subsiguiente circulación in vivo.

También se proporcionan kits que se usan para la recogida, procesamiento y almacenamiento de plaquetas, incluyendo además materiales de envasado adecuados e instrucciones para usar los contenidos del kit. Se prefiere que todos los reactivos y suministros del kit sean estériles, de acuerdo con las prácticas médicas estándar que implican el manejo y almacenamiento de sangre y productos sanguíneos. Los métodos para esterilizar los contenidos del kit se conocen en la técnica, por ejemplo etileno gaseoso, irradiación y similares. En ciertas realizaciones, el kit puede incluir suministros para venopunción y/o suministros de recogida de sangre, por ejemplo un set de aguja, disolución para esterilizar la piel de un donante de plaquetas, y una bolsa o recipiente para la recogida de sangre. Preferentemente, el recipiente está "cerrado", es decir, sustancialmente sellado respecto del entorno. Tales recipientes cerrados para recogida de sangre se conocen bien en la técnica, y proporcionan un medio para evitar la contaminación microbiana de la preparación de plaquetas contenida en ellos. Otras realizaciones incluyen kits que contienen suministros para la recogida de sangre y aféresis plaquetaria. Los kits pueden incluir además una cantidad del agente modificador de glucano, suficiente para modificar el volumen de plaquetas recogido y almacenado en el recipiente. En ciertas realizaciones, el kit incluye reactivos por modificar el glucano terminal de plaquetas con un segundo o tercer resto químico, por ejemplo para PEGilar las plaquetas recogidas. En otras realizaciones, el kit incluye un sistema de recogida de sangre que tiene un recipiente de almacenamiento de sangre en el que se proporciona el agente modificador de glucano dentro del recipiente en una cantidad suficiente para tratar el volumen de sangre o plaquetas alojadas por el recipiente. La cantidad de agente modificador de glucano dependerá del volumen del recipiente. Se prefiere que se proporcione el agente modificador de glucano en forma de una disolución estéril no pirógena, pero también puede suministrarse en forma de polvo liofilizado. Por ejemplo, se proporciona una bolsa de sangre que tiene una capacidad de 250 ml. Contenida en la bolsa de sangre hay una

cantidad de agente modificador de glucano, de forma que, cuando se añaden 250 ml de sangre, la concentración final del agente modificador de glucano es aproximadamente 200 micromolar. Otras realizaciones contienen diferentes concentraciones de agentes modificadores de glucano, por ejemplo, pero no limitado a, cantidades que dan como resultado concentraciones finales de 10 micromolar a 10 milimolar, y preferentemente de 100 micromolar a 1 milimolar de los agentes modificadores de glucano. Otras realizaciones emplean combinaciones de agentes modificadores de glucano, por ejemplo, para provocar la sialilación o galactosilación de glucoproteínas enlazadas mediante N en productos sanguíneos introducidos en el interior del recipiente.

La invención será entendida con mayor profundidad mediante referencia a los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Introducción

El enfriamiento modesto ceba a las plaquetas para la activación, pero la refrigeración provoca cambios de forma y eliminación rápida, comprometiendo el almacenamiento de plaquetas para transfusiones terapéuticas. Se encontró que la inhibición del cambio de forma no normaliza la eliminación inducida por frío. También se encontró que el enfriamiento de las plaquetas reordena la configuración de la superficie de la subunidad α del complejo del receptor del factor de von Willebrand (vWf) (GP1b α), de manera que se convierte en una diana para el reconocimiento por receptores de tipo receptor 3 del complemento (CR3) expresados predominantemente en macrófagos hepáticos, conduciendo a la fagocitosis y eliminación de las plaquetas. La eliminación de GP1b α prolonga la supervivencia de las plaquetas no enfriadas. Las plaquetas enfriadas se unen a vWf y funcionan normalmente *in vitro* y *ex vivo* después de la transfusión en ratones con deficiencia de CR3. Sin embargo, las plaquetas enfriadas no están "activadas" como las plaquetas expuestas a trombina o ADP, y su complejo del receptor de vWf reacciona normalmente con vWf activado.

A medida que la temperatura cae por debajo de 37°C, las plaquetas son más susceptibles a la activación por estímulos trombóticos, un fenómeno conocido como "cebado" (Faraday y Rosenfeld, 1998; Hoffmeister et al., 2001). El cebado puede ser una adaptación para limitar el sangrado a menores temperaturas de las superficies corporales en las que se produce la mayoría de las lesiones. Se propone que el fin del sistema de eliminación hepático es eliminar las plaquetas cebadas repetidamente, y que los cambios conformacionales en GP1b α que promueven esta eliminación no afecten a la unión hemostáticamente importante de GP1b α a vWf. Por lo tanto, la modificación selectiva de GP1b α puede adecuar el almacenamiento en frío de las plaquetas para transfusión.

Materiales y Métodos

Se obtuvo anexina V conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC), anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CD11b/Mac-1 humano conjugados con ficoeritrina (PE), mAb anti-IgM de ratón y anti-IgM humana conjugado con FITC, mAb anti-CD62P de ratón y anti-CD62P humano conjugado con FITC de Pharmingen (San Diego, CA); mAb anti-IgG de ratón y anti-IgG humana de rata conjugado con FITC de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA); mAbs anti-CD61 humano conjugado con FITC (clon BL-E6) de Accurate Scientific Corp. (Westbury, NY); mAb anti-GP1b α humana conjugado con FITC (clon SZ2) de Immunotech (Marsella, Francia); y anticuerpo policlonal de conejo anti-vWf conjugado con FITC de DAKOCytomation (Glostrup, Dinamarca). Se adquirió éster acetoximetílico (AM) de EGTA, fibrinógeno procedente de plasma humano acoplado a Verde de Oregón, CMTMR naranja CellTrackerTM, CMFDA verde CellTracker, microesferas de 1 μ m modificadas con carboxilato y acopladas a rojo Nilo (535/575)/FluoSpheres de Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR) y ¹¹¹Indio de NEN Life Science Products (Boston, MA). Se adquirió citocalasina B, dimetilsulfóxido (DMSO), isotiocianato de trisodio (TRITC), trombina humana, prostaglandina E1 (PGE₁), éster de forbol 12-tetradecanoilforbol-13-acetato (PMA), ionóforo A23187 de Sigma (St. Louis, MO); botrocetina de Centerchem Inc. (Norwalk, CT); y O-sialoglucoproteína-endopeptidasa de Cerladane (Hornby, Canadá). HBSS que contiene Ca²⁺ y Mg²⁺, pH 6,4; RPMI 1640; 0,05% de tripsina-EDTA (0,53 mM) en HBSS sin Ca²⁺ y Mg²⁺; y otros suplementos (penicilina, estreptomycin y suero fetal bovino) se adquirieron de GIBCO Invitrogen Corp. (Grand Island, NY). TGF- β 1 de Oncogene Research Products (Cambridge, MA); 1,25-(OH)₂ vitamina D3 de Calbiochem (San Diego, CA); y adenosin-5'-difosfato (ADP) se obtuvieron de USB (Cleveland, OH). La avertina (2,2,2-tribromoetanol) se adquirió de Fluka Chemie (Steinheim, Alemania). El péptido relacionado con colágeno (CRP) se sintetizó en Tufts Core Facility, Departamento de Fisiología (Boston, MA) y se reticuló como se describió previamente (Morton et al., 1995). La mocarhagina, una metaloproteasa de veneno de serpiente, fue proporcionada por Dr. M. Berndt, Baker Medical Research Institute, Melbourne Victoria 318 1, Australia. Los mAbs anti-GP1b α de ratón no conjugado adicionales y un mAb anti-GP1b α de ratón conjugado con PE pOp4 se proporcionaron por Dr. B. Nieswandt (Witten/Herdecke University, Wuppertal, Alemania). Se obtuvieron células THP-1 de la American Type Culture Collection (Manassas, VA).

Animales

Para los ensayos de eliminación y estudios de supervivencia, se usaron ratones de tipo salvaje C57BL/6 y C57BL/6 x 129/sv de edad, raza y sexo parecidos, obtenidos de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Los ratones C57BL/6 x 129/sv con deficiencia en el componente del complemento C3 (Wessels et al., 1995) fueron proporcionados por Dr. M. C. Carroll (Center for Blood Research and Department of Pediatrics, Harvard Medical School, Boston, MA). Los ratones C57BL/6 con deficiencia en CR3 (Coxon et al., 1996) fueron proporcionados por Dr. T Mayadas, y los ratones C57BL/6 con deficiencia en vWf (Denis et al., 1998) fueron proporcionados por Dr. D. Wagner. Los ratones se mantuvieron y se trataron como se aprobó por el Harvard Medical Area Standing Committee on Animals, según los estándares de NIH como se expone en The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Plaquetas humanas

- Se extrajo sangre de voluntarios humanos normales que dieron su autorización (la aprobación se obtuvo del Institutional Review Boards tanto del Brigham and Women's Hospital como el Center for Blood Research (Harvard Medical School)) mediante venipunción en un volumen de 0,1 de anticoagulante a base de citrato de Aster-Jandl (Hartwig y DeSisto, 1991), y se preparó plasma rico en plaquetas (PRP) mediante centrifugación de la sangre anticoagulada a 300 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las plaquetas se separaron de las proteínas plasmáticas mediante filtración en gel a temperatura ambiente a través de una pequeña columna de Sepharose 2B (Hoffmeister et al., 2001). Las plaquetas usadas en el ensayo de fagocitosis *in vitro* descrito más abajo se marcaron con 1,8 μ M de CMTMR naranja CellTracker™ (CM-naranja) durante 20 minutos a 37°C (Brown et al., 2000), y el colorante sin incorporar se eliminó mediante centrifugación (850 x g, 5 min.) con 5 volúmenes de tampón de lavado que contiene 140 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 12 mM de citrato trisódico, 10 mM de glucosa, y 12,5 mM de sacarosa, 1 μ g/ml de PGE₁, pH 6,0 (tampón A). Las plaquetas se resuspendieron a 3×10^8 /ml en una disolución que contiene 140 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 0,5 mM de MgCl₂, 5 mM de NaHCO₃, 10 mM de glucosa y 10 mM de Hepes, pH 7,4 (tampón B).

- El término N de GP1b α se eliminó enzimáticamente de la superficie de plaquetas marcadas y enfriadas o mantenidas a temperatura ambiente en tampón B, que también contiene 1 mM de Ca²⁺ y 10 μ g/ml de la metaloproteasa de veneno de serpiente mocoarhagina (Ward et al., 1996). Después de la digestión enzimática, las plaquetas se lavaron mediante centrifugación con 5 x volúmenes de tampón A, y se comprobaron según la manera habitual mediante microscopía en busca de agregados. La eliminación del término N de GP1b α se monitorizó incubando suspensiones de plaquetas con 5 μ g/ml de mAb anti-GP1b α humana (SZ2) conjugado con FITC durante 10 minutos a temperatura ambiente, y fue seguido por el análisis inmediato mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA). Las plaquetas se encerraron en ventanas mediante características de dispersión directa/lateral, y se adquirieron 50.000 sucesos.

Plaquetas murinas

- Los ratones se anestesiaron con 3,75 mg/g (2,5%) de avertina, y se obtuvo 1 ml de sangre del plexo ocular retroorbital en un volumen de 0,1 de anticoagulante de Aster-Jandl. El PRP se preparó mediante centrifugación de sangre anticoagulada a 300 x g durante 8 min. a temperatura ambiente. Las plaquetas se separaron de las proteínas plasmáticas mediante centrifugación a 1200 x g durante 5 minutos, y se lavaron dos veces mediante centrifugación (1200 x g durante 5 minutos) usando 5 x volúmenes de tampón de lavado (tampón A). A este procedimiento se hace referencia mediante el uso subsiguiente de la expresión "lavado". Las plaquetas se resuspendieron a una concentración de 1×10^9 /ml en una disolución que contiene 140 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 0,5 mM de MgCl₂, 5 mM de NaHCO₃, 10 mM de glucosa y 10 mM de Hepes, pH 7,4 (tampón B). El recuento plaquetario se determinó usando un Bright Line Hemocytometer (Hausser Scientific, Horsham, PA) bajo un microscopio de contraste de fases a un aumento de 400 x. Se llevaron a cabo algunos estudios de eliminación de plaquetas radioactivas con ¹¹¹Indio, y se marcaron plaquetas de ratón usando un método descrito para plaquetas de primate (Kotze et al., 1985). Las plaquetas se resuspendieron a una concentración de 2×10^9 /ml en 0,9% de NaCl, pH 6,5 (ajustado con 0,1 M de citrato de sodio), seguido de la adición de 500 μ Ci de cloruro de ¹¹¹Indio durante 30 minutos a 37°C y se lavaron como se describe anteriormente y se resuspendieron en tampón B a una concentración de 1×10^9 /ml.

- Para la microscopía intravital u otros experimentos de supervivencia de las plaquetas, las plaquetas lavadas se marcaron con 2,5 μ M de CMFDA verde CellTracker (diacetato de 5-clorometilfluoresceína) (CMFDA) durante 20 minutos a 37°C (Baker et al., 1997), o con 0,15 μ M de TRITC durante 20 minutos a 37°C en tampón B, que también contiene 0,001% de DMSO, 20 mM de HEPES. El colorante sin incorporar se eliminó mediante centrifugación como se describe anteriormente, y las plaquetas se suspendieron a una concentración de 1×10^9 /ml en tampón B.

- El término N de GP1b α se eliminó enzimáticamente de la superficie de plaquetas marcadas enfriadas o a temperatura ambiente con 100 μ g/ml de O-sialogluproteína endopeptidasa en tampón B que contiene 1 mM de Ca²⁺ durante 20 minutos a 37°C (Bergmeier et al., 2001). Tras la digestión enzimática, las plaquetas se lavaron mediante centrifugación y se comprobaron mediante microscopía óptica en busca de agregados. La eliminación enzimática del término N de GP1b α se monitorizó incubando las suspensiones plaquetarias con 5 μ g/ml de mAb anti-GP1b α de ratón conjugado con PE pOp4 durante 10 minutos a temperatura ambiente, y la PE unida se analizó

mediante citometría de flujo.

Para inhibir los cambios de forma de las plaquetas inducidos por frío, se cargaron 10^9 /ml de plaquetas en tampón B con 2 μ M de EGTA-AM, seguido de 2 μ M de citocalasina B, como se describe previamente (Winokur y Hartwig, 1995), se marcaron con 2,5 μ M de CMFDA durante 30 minutos a 37°C, y después se enfriaron o se mantuvieron a temperatura ambiente. Las plaquetas se sometieron a lavado estándar, y se suspendieron a una concentración de 1×10^9 /ml en tampón B antes de la inyección en ratones.

Protocolos de temperatura de las plaquetas

Para estudiar los efectos de la temperatura sobre la supervivencias o función de las plaquetas, se incubaron plaquetas de ratón o humanas no marcadas, marcadas radiactivamente, o marcadas fluorescentemente, durante 2 horas a temperatura ambiente (25-27°C) o a temperaturas de baño de hielo, y después se volvieron a calentar durante 15 minutos a 37°C antes de la transfusión en ratones o el análisis *in vitro*. Las plaquetas sometidas a estos tratamientos se denominan plaquetas enfriadas o refrigeradas (o enfriadas, vueltas a calentar) y a temperatura ambiente, respectivamente.

Recuperación, supervivencia y destino de plaquetas murinas

Las plaquetas murinas marcadas con CMFDA enfriadas o a temperatura ambiente (10^8) fueron inyectadas en ratones genéticamente idénticos vía la vena lateral de la cola usando una aguja de calibre 27. Para la determinación de la recuperación y supervivencia, las muestras de sangre se recogieron inmediatamente (< 2 min.) y 0,5, 2, 24, 48, 72 horas después de la transfusión en un volumen de 0,1 de coagulante de Aster-Jandl. Se llevó a cabo el análisis de la sangre completa usando citometría de flujo, y el porcentaje de plaquetas positivas a CMFDA se determinó encerrando en una ventana todas las plaquetas según sus características de dispersión directa y lateral (Baker et al., 1997). En cada muestra se recogieron 50.000 sucesos. Las plaquetas positivas a CMFDA medidas a un tiempo < 2 minutos se establecieron como 100%. La entrada de plaquetas transfundidas por ratón fue ~2,5-3% de toda la población plaquetaria.

Para evaluar el destino de las plaquetas, se recogieron tejidos (corazón, pulmón, hígado, bazo, músculo, y fémur) a 0,5, 1 y 24 horas después de la inyección de 10^8 plaquetas marcadas con 111 Indio enfriadas o a temperatura ambiente en ratones. El peso de los órganos y su radioactividad se determinó usando un contador gamma automático Wallac 1470 Wizard (Wallac Inc., Gaithersburg, MD). Los datos se expresaron como recuento gamma por gramo de órgano. Para la determinación de la recuperación y supervivencia de plaquetas radioactivas, se recogieron muestras de sangre inmediatamente (< 2 min.) y 0,5 y horas después de la transfusión en un volumen de 0,1 de anticoagulante de Aster-Jandl, y se determinó sus recuentos gamma (Kotze et al., 1985).

Agregación plaquetaria

Se llevaron a cabo ensayos convencionales y se monitorizaron en un agregómetro de Bio/Data (Horsham, PA). Las muestras de 0,3 ml de plaquetas murinas lavadas y agitadas se expusieron a 1 U/ml de trombina, 10 μ M de DP, o 3 μ g/ml de CRP a 37°C. La transmisión de luz se registró durante 3 minutos.

Unión de vWf activado

El plasma rico en plaquetas se trató con o sin 2 U/ml de botrocetina durante 5 minutos a 37°C (Bergmeier et al., 2001). El vWf unido se detectó mediante citometría de flujo usando anticuerpo policlonal de conejo anti-vWf conjugado con FITC.

Marcado superficial de GP1b α plaquetaria

Plaquetas de ratón en reposo, mantenidas a temperatura ambiente o enfriadas 2 horas, se diluyeron hasta una concentración de 2×10^6 /ml en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene 0,05% de glutaraldehído. Las disoluciones plaquetarias (200 μ l) se colocaron en un cubreobjetos de vidrio revestido con polilisina contenido en pocillos de placa de 96 pocillos, y las plaquetas se adhirieron a cada cubreobjetos mediante centrifugación a 1.500 x g durante 5 min. a temperatura ambiente. Entonces, el fluido sobrenadante se retiró, y las plaquetas unidas al cubreobjetos se fijaron con 0,5% de glutaraldehído en PBS durante 10 min. El fijante se eliminó, los aldehídos sin reaccionar se paralizaron con una disolución que contiene 0,1% de borohidruro de sodio en PBS, seguido del lavado con PBS que contiene 10% de BSA. GP1b α en la superficie de las plaquetas se marcó con una mezcla de tres anticuerpos monoclonales de rata anti-GP1b α de ratón, cada uno a 10 μ g/ml (Bergmeier et al., 2000) durante 1 hora, seguido de oro de 10 nm revestido con anticuerpo de cabra anti-IgG de rata. Los cubreobjetos se lavaron a conciencia con PBS, se fijaron posteriormente con 1% de glutaraldehído, se lavaron nuevamente con agua destilada, se congelaron rápidamente, se liofilizaron, y se revistieron mediante rotación con 1,2 nm de platino, seguido de 4 nm de carbono sin rotación en un Cressington CFE-60 (Cressington, Watford, UK). Las plaquetas se visualizaron a 100 kV en un microscopio electrónico JEOL 1200-EX (Hartwig et al., 1996; Kovacsovich y Hartwig,

1996).

Ensayo fagocítico in vitro

Se cultivaron células monocíticas THP-1 durante 7 días en medio de cultivo celular RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 25 mM de Hepes, 2 mM de glutamina, y se diferenciaron usando 1 ng/ml de TGFP y 50 nM de 1,25-(OH)₂ vitamina D3 durante 24 horas, lo que vino acompañado de la expresión incrementada de CR3 (Simon et al., 2000). La expresión de CR3 se monitorizó mediante citometría de flujo usando un mAb anti-CD11b/Mac-1 humano conjugado con PE. Las células THP-1 sin diferenciar y diferenciadas (2×10^6 /ml) se colocaron en placas de 24 pocillos y se dejó que se adhiriesen durante 45 minutos a 37°C. Los macrófagos adherentes diferenciados o no diferenciados se activaron mediante adición de 15 ng/ml de PMA durante 15 min. Las plaquetas marcadas con CM-naranja, enfriadas o a temperatura ambiente (10^7 /pocillo), previamente sometidas a diferentes tratamientos, se añadieron a los fagocitos diferenciados o no diferenciados en HBSS que contiene Ca²⁺ y Mg²⁺, y se incubaron durante 30 min. a 37°C. Después del período de incubación, la monocapa de fagocitos se lavó con HBSS durante 3 veces, y las plaquetas adherentes se eliminaron mediante tratamiento con 0,05% de tripsina/0,53 mM de EDTA en HBSS a 37°C durante 5 min., seguido de 5 mM de EDTA a 4°C para despegar los macrófagos para el análisis de citometría de flujo de adhesión o ingestión de plaquetas (Brown et al., 2000). Todas las plaquetas humanas marcadas con CM-naranja, enfriadas o a temperatura ambiente, expresaron la misma cantidad del marcador específico de plaquetas CD61 como plaquetas sin marcar recientemente aisladas (no mostradas). Las plaquetas marcadas con CM-naranja, incubadas con macrófagos, se resolvieron de los fagocitos según sus propiedades de dispersión directa y lateral. Los macrófagos se encerraron en ventanas, se adquirieron 10.000 sucesos para cada muestra, y los datos se analizaron con el software CELLQuest (Becton Dickinson). Las plaquetas marcadas con CM-naranja que se asocian con la población de fagocitos tienen un desplazamiento en la fluorescencia naranja (Fig. 6a y Fig. 6b, ingeridas, eje y). Estas plaquetas se ingirieron en lugar de ser meramente adherentes, debido a que fracasaron en el marcaje dual con mAb conjugado con FITC para CD61.

Inmunomarcado y citometría de flujo de plaquetas

Las plaquetas murinas o humanas lavadas (2×10^6) se analizaron para determinar la expresión en superficie de CD62P, CD61, o IgM e IgG unidas a la superficie después de enfriar o del almacenamiento a temperatura ambiente tiñendo con Abs conjugados con fluoróforos (5 µg/ml) durante 10 minutos a 37°C. La exposición a fosfatidilserina por las plaquetas enfriadas o a temperatura ambiente se determinó resuspendiendo 5 µl de plaquetas en 400 µl de HBSS que contiene 10 mM de Ca²⁺ con 10 µg/ml de anexina V conjugada con FITC. Como control positivo para la exposición a PS, las suspensiones plaquetarias se estimularon con 1 µM de A23187. La unión a fibrinógeno se determinó mediante adición de fibrinógeno con verde de Oregón durante 20 minutos a temperatura ambiente. Todas las muestras de plaquetas se analizaron inmediatamente mediante citometría de flujo. Las plaquetas se encerraron en una ventana mediante características de dispersión directa y lateral.

Experimentos de microscopía intravital

Se han descrito la preparación de los animales, los aspectos técnicos y experimentales del montaje de la microscopía de video intravital (von Adrian, 1996). Se anestesiaron ratones de seis a ocho semanas de ambos sexos mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de xilazina y quetamina. La vena yugular derecha se cateterizó con un tubo de polietileno PE-10. La superficie inferior del lóbulo hepático izquierdo se preparó quirúrgicamente y se cubrió por un cubreobjetos de vidrio para la microscopía *in vivo* posterior como se describe (McCuskey, 1986). Se mezclaron 1:1 y se administraron intravenosamente 10^8 plaquetas enfriadas y plaquetas a temperatura ambiente marcadas con CMFDA y TRITC, respectivamente. La circulación de las plaquetas marcadas en sinusoides hepáticos fue seguida por epi-iluminación estroboscópica accionada por video. Se registraron diez escenas de video de 3 zonas centrilobulares en cada punto de tiempo indicado. Se calculó la relación de plaquetas adherentes enfriadas (CMFDA)/a RT (TRITC) en el campo visualizado idéntico. La microscopía confocal se llevó a cabo usando un sistema de formación de imágenes multifotónico confocal Radiance 2000 MP conectado a un microscopio en dirección vertical Olympus BX 50 WJ (Biorad, Hercules, CA), usando un objetivo de inmersión de agua de 10 x. Las imágenes se capturaron y se analizaron con el software Laser Sharp 2000 (Biorad) (von Adrian, 2002).

Agregación plaquetaria en sangre desprendida

Se usó un método de citometría de flujo para analizar la formación de agregados por plaquetas en sangre completa que sale de una herida, como se describe para primates (Michelson et al., 1994). Se inyectaron 10^8 plaquetas murinas marcadas con CMFDA a temperatura ambiente en ratones de tipo salvaje genéticamente idénticos, y 10^8 plaquetas marcadas con CMFDA, enfriadas, en ratones con deficiencia de CR3. Veinticuatro horas después de la infusión de las plaquetas, se llevó a cabo un ensayo estándar de tiempo de sangrado, cortando un segmento de 3 mm de la cola de ratón (Denis et al., 1998). La cola amputada se sumergió en 100 µl de disolución salina isotónica a 0,9% a 37°C. La sangre que sale se recogió durante 2 min., y se añadió un volumen de 0,1 de anticoagulante de Aster-Jandl, seguido inmediatamente de 1% de paraformaldehído (concentración final). La sangre periférica se

obtuvo mediante sangrado del plexo ocular retroorbital en paralelo, como se describe anteriormente, y se fijó inmediatamente con 1% de paraformaldehído (concentración final). Para analizar el número de agregados *in vivo* mediante citometría de flujo, la sangre desprendida que sale de la herida del tiempo de sangrado, así como una muestra de sangre completa periférica, se diluyó y se marcó con mAb anti-GP1b α murina conjugado con PE pOp4 (5 μ g/ml, 10 min.) Las plaquetas se discriminaron de los glóbulos rojos y glóbulos blancos encerrándolas en ventanas según sus características de dispersión directa y positividad a GP1b α . Entonces se generó un histograma del log de dispersión de luz directa (tamaño de plaqueta reflectante) frente a la unión a GP1b α . En las muestras de sangre periférica completa, las regiones del análisis se representaron gráficamente alrededor de las partículas positivas a GP1b α para incluir el 95% de la población en el eje de dispersión directa (región 1) y el 5% de las partículas que aparecen por encima de este umbral de dispersión de luz directa (región 2). Para las muestras de sangre desprendida, se usaron regiones idénticas. El número de agregados plaquetarios en la sangre desprendida, como un porcentaje del número de plaquetas individuales, se calculó a partir de la siguiente fórmula: [(número de partículas en la región 2 de sangre desprendida) – (número de partículas en la región 2 de sangre periférica)] \div [(número de partículas en la región 1 de sangre desprendida) \times 100%]. Las plaquetas infundidas se identificaron por su marcaje con CMFDA, y se discriminaron de las plaquetas no infundidas negativas a CMFDA.

Análisis de citometría de flujo de la unión a fibrinógeno de plaquetas murinas y exposición a selectina P de plaquetas circulantes

Plaquetas a temperatura ambiente marcadas con CM-naranja (10^8) se inyectaron en ratones de tipo salvaje, y plaquetas marcadas con CM-naranja enfriadas (10^8) se inyectaron en ratones con deficiencia de CR3. Veinticuatro horas después de la infusión de las plaquetas, los ratones se sangraron y se aislaron las plaquetas. Las suspensiones plaquetarias (2×10^8) en reposo o activadas con trombina (1 U/ml, 5 ml) se diluyeron en PBS y se tiñeron con mAb anti-selectina P de ratón conjugado con FITC o con 50 μ g/ml de fibrinógeno conjugado con verde de Oregón, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las muestras plaquetarias se analizaron inmediatamente mediante citometría de flujo. Las plaquetas transfundidas y no transfundidas se encerraron en ventanas por sus características de dispersión directa y de fluorescencia de CM-naranja. La expresión de selectina P y la unión a fibrinógeno se midieron para cada población positiva y negativa a CM-naranja, antes y después de la estimulación con trombina.

Estadísticas

Los datos de microscopía intravital se expresan como medias \pm SEM. Los grupos se compararon usando la prueba de la *t* no pareada. Los valores de *P* < 0,05 se consideraron significativos. Todos los otros datos se presentan como la media \pm SD.

Resultados

La eliminación de plaquetas enfriadas se produce predominantemente en el hígado y es independiente de la forma de las plaquetas.

Las plaquetas de ratón mantenidas a temperatura ambiente (RT) e infundidas en ratones genéticamente idénticos desaparecen a una velocidad bastante constante a lo largo del tiempo durante aproximadamente 80 horas (Fig. 1A). Por el contrario, aproximadamente dos tercios de las plaquetas de ratón enfriadas a la temperatura de un baño de hielo y vueltas a calentar (Frías) antes de la inyección desaparecen rápidamente de la circulación como se observa previamente en seres humanos y en ratones (Becker et al., 1973; Berger et al., 1998). Las plaquetas enfriadas y vueltas a calentar, tratadas con el quelante de calcio permeable a células EGTA-AM y el agente de cubrimiento del extremo positivo de filamentos de actina citocalasina B (Frías + CytoB/EGTA) para conservar su forma discoidal (Winokur y Hartwig, 1995), abandonaron la circulación igual de rápido que las plaquetas enfriadas no tratadas, a pesar del hecho de que estas plaquetas fueron completamente funcionales según se determina mediante la agregación *in vitro* inducida por trombina, ADP o péptido relacionado con colágeno (CRP) (Fig. 1B). Las recuperaciones de plaquetas infundidas inmediatamente después de la transfusión fueron 50-70%, y las cinéticas de la desaparición de plaquetas fueron indistinguibles tanto si se usó 111 Indio o CMFDA para marcar las plaquetas. Las velocidades de supervivencia relativas de las plaquetas de ratón a temperatura ambiente y enfriadas se asemejan a los valores dados previamente para plaquetas idénticamente tratadas de ratón (Berger et al., 1998) y humanas (Becker et al., 1973).

La Fig. 1C muestra que los destinos de órganos de las plaquetas de ratón a temperatura ambiente y enfriadas difieren. Mientras que las plaquetas a temperatura ambiente terminan principalmente en el bazo, el hígado es la residencia principal de las plaquetas enfriadas retiradas de la circulación. Una mayor fracción de radionúclidos detectada en los riñones de animales que reciben plaquetas enfriadas marcadas con 111 Indio en comparación con plaquetas a temperatura ambiente a las 24 horas puede reflejar una degradación más rápida de las plaquetas enfriadas, y un suministro del radionúclido libre al sistema urinario. Una hora después de la inyección, la distribución de órganos de las plaquetas marcadas con CMFDA fue comparable a la de las plaquetas marcadas con 111 Indio. En ambos casos, el 60-90% de la población de plaquetas enfriadas marcadas se depositó en el hígado, ~20% en el

bazo, y ~15% en el pulmón. Por el contrario, un cuarto de las plaquetas a temperatura ambiente infundidas se distribuyeron de forma por igual entre el hígado, el bazo y el pulmón.

Las plaquetas enfriadas se colocan con macrófagos hepáticos (células de Kupffer).

La eliminación de plaquetas enfriadas por el hígado y las pruebas de la degradación de plaquetas es consistente con el reconocimiento e ingestión de plaquetas enfriadas por células de Kupffer, las principales células depuradoras fagocíticas del hígado. La Fig. 1D muestra la localización de células de Kupffer fagocíticas y plaquetas marcadas con CMFDA enfriadas adherentes en una micrografía confocal representativa de una sección de hígado de ratón 1 hora después de la transfusión. Los macrófagos sinusoidales se visualizaron mediante inyección de microesferas de poliestireno modificado con carboxilo de 1 µm marcadas con rojo Nilo. La colocación de las plaquetas transfundidas y los macrófagos se indica en amarillo en la micrografía asociada de ambas emisiones de fluorescencia. Las plaquetas enfriadas se localizan con células marcadas con rojo Nilo preferentemente en los dominios periportal y zona media de ácinos hepáticos, sitios ricos en macrófagos sinusoidales (Bioulac-Sage et al., 1996; MacPhee et al., 1992).

Los ratones con deficiencia de CR3 no eliminan rápidamente plaquetas enfriadas

CR3 ($\alpha_M\beta_2$ integrina; CD11b/CD18; Mac-1) es un mediador importante en la eliminación independiente de anticuerpos por macrófagos hepáticos. La Fig. 2a muestra que las plaquetas enfriadas circulan en animales con deficiencia de CR3 con la misma cinética que las plaquetas a temperatura ambiente, aunque la eliminación de ambas poblaciones de plaquetas es más corta en el ratón con deficiencia de CR3 en comparación con aquella en ratones de tipo salvaje (Fig. 1a). La razón para la velocidad de eliminación de plaquetas ligeramente más rápida por ratones con deficiencia de CR3 en comparación con ratones de tipo salvaje no está clara. Las plaquetas enfriadas y vueltas a calentar también se eliminan rápidamente de los ratones con deficiencia de factor del complemento 3 C3 (Fig. 2c), perdiendo una opsonina importante que promueve la fagocitosis y la eliminación vía CR3, y de ratones con deficiencia del factor de von Willebrand (vWf) (Denis et al., 1998) (Fig. 2b).

Las plaquetas enfriadas se adhieren fuertemente a las células de Kupffer in vivo.

La adhesión plaquetaria a sinusoides hepáticos de tipo salvaje se investigó adicionalmente mediante microscopía intravital, y se determinó la relación entre plaquetas adherentes almacenadas enfriadas y a temperatura ambiente infundidas juntas. La Figura 3 muestra que tanto las plaquetas enfriadas como las plaquetas a temperatura ambiente se unen a regiones sinusoidales con una densidad de células de Kupffer elevada (Fig. 3a y 3b), pero que 2,5 a 4 veces más plaquetas enfriadas se unen a las células de Kupffer en el ratón de tipo salvaje que las plaquetas a temperatura ambiente (Fig. 3c). Por el contrario, el número de plaquetas que se adhieren a las células de Kupffer en ratones con deficiencia de CR3 fue independiente de la exposición al enfriamiento o a temperatura ambiente (Fig. 3c).

Las plaquetas enfriadas que carecen del dominio N-terminal de GP1b α circulan normalmente.

Debido a que GP1b α , un componente del complejo del receptor de GP1b-IX-V para vWf, se puede unir a CR3 en ciertas condiciones *in vitro* (Simon et al., 2000), se investigó GP1b α como un contrarceptor posible en plaquetas enfriadas para CR3. La O-sialoglucoproteína endopeptidasa escinde el dominio extracelular N-terminal de 45 kDa de GP1b α de plaquetas murinas, dejando intactos otros receptores de plaquetas, tales como ($\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_2\alpha_1$, receptores de cadena de GPVI/FcR γ y los receptores activados por proteasas) (Bergmeier et al., 2001). Por tanto, se extrajo esta porción del dominio extracelular de GP1b α de las plaquetas de ratón con O-sialoglucoproteína endopeptidasa (Fig. 4A, encarte), y se examinó su supervivencia en ratones tras la incubación a temperatura ambiente o en frío. La Fig. 4A muestra que las plaquetas enfriadas ya no exhiben una rápida eliminación después de la escisión de GP1b α . Además, las plaquetas tratadas a temperatura ambiente que tienen agotada GP1b α tienen tiempos de supervivencia ligeramente alargados (~ 5-10%) cuando se comparan con controles a temperatura ambiente que contienen GP1b α .

El enfriamiento no afecta a la unión de vWf activado al receptor de vWf de plaquetas, pero induce el agrupamiento de GP1b α sobre la superficie de las plaquetas.

La Fig. 4B muestra que vWf activado con botrocetina se une a GP1b α igualmente bien en plaquetas a temperatura ambiente como en plaquetas frías, aunque el enfriamiento de las plaquetas conduce a un cambio en la distribución de GP1b α sobre la superficie de plaquetas murinas. Las moléculas de GP1b α , identificadas mediante anticuerpos monoclonales murinos anti-GP1b α marcados con Immunogold, forman agregados lineales sobre la superficie lisa de plaquetas discoides en reposo a temperatura ambiente (Fig. 4C, RT). Esta disposición es consistente con la información sobre la arquitectura de la plaqueta sanguínea en reposo. El dominio citoplásmico de GP1b α se une a filamentos largos que se curvan con el plano de la membrana de las plaquetas a través de la intermediación de moléculas de filamina A (Hartwig y DeSisto, 1991). Tras enfriar (Fig. 4C, Enfriadas), muchas moléculas de GP1b α se organizan como agrupamientos a lo largo de la membrana de las plaquetas deformada por reordenamientos internos

de actina (Hoffmeister et al., 2001; Winokur y Hartwig, 1995).

Reconocimiento de GP1b α de plaquetas por fagocitosis mediada por CR3 de plaquetas humanas enfriadas in vitro.

La diferenciación de células THP-1 monocitoides humanas usando TGF- β 1 y 1,25-(OH) $_2$ vitamina D3 incrementa la expresión de CR3 en ~ 2 veces (Simon et al., 1996). El enfriamiento dio como resultado un incremento de 3 veces de la fagocitosis plaquetaria por células THP-1 sin diferenciar, y un incremento de ~ 5 veces por células THP-1 diferenciadas (Fig. 5B y 5c), consistente con la mediación de la captación de plaquetas por CR3. Por el contrario, la diferenciación de células THP-1 no tuvo ningún efecto significativo sobre la captación de plaquetas almacenadas a temperatura ambiente (Fig. 5A y 5c). Para determinar si GP1b α es el contrarreceptor para la fagocitosis mediada por CR3 en plaquetas humanas enfriadas, se usó la metaloproteasa de veneno de serpiente mocaahagina, para eliminar el dominio extracelular de GP1b α (Ward et al., 1996). La eliminación de GP1b α humana de la superficie de las plaquetas humanas con mocaahagina redujo su fagocitosis después del enfriamiento en un ~ 98% (Fig. 5C).

Exclusión de otros mediadores de la eliminación de plaquetas inducida por frío.

La Tabla 1 muestra los resultados de los experimentos que examinaron si el enfriamiento afectó a la expresión de los receptores de plaquetas distintos de GP1b α o su interacción con ligandos. Estos experimentos no revelaron efectos detectables sobre la expresión de selectina P, densidad de integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ o en la unión de $\alpha_{IIb}\beta_3$ fibrinógeno, un marcador de la activación de $\alpha_{IIb}\beta_3$. El enfriamiento tampoco incrementó la exposición a fosfatidilserina (PS), un indicador de apoptosis, ni tampoco cambió la unión a plaquetas de las inmunoglobulinas IgG o IgM.

Tabla 1. Efecto del enfriamiento sobre la unión de diversos anticuerpos o ligandos a receptores de plaquetas.

Receptor de plaquetas (ligando)	Relación de unión 4°C: 22°C	
	Plaquetas humanas	Plaquetas murinas
Selectina P (mAb anti-CD62P)	1,01 \pm 0,06	1,02 \pm 0,03
IgGs asociadas a plaquetas	1,05 \pm 0,14	1,06 \pm 0,03
IgMs asociadas a plaquetas	0,93 \pm 0,10	1,01 \pm 0,02
Fosfatidilserina (anexina V)	0,95 \pm 0,09	1,04 \pm 0,02
$\alpha_{IIb}\beta_3$ (mAb anti-CD61)	1,03 \pm 0,05	1,04 \pm 0,10
$\alpha_{IIb}\beta_3$ (fibrinógeno)	1,05 \pm 0,10	1,06 \pm 0,06

La unión de anticuerpos o ligandos marcados fluorescentemente frente a diversos receptores en plaquetas humanas y murinas calentadas y vueltas a enfriar o a temperatura ambiente se midió mediante citometría de flujo. Los datos se expresan como la relación entre el fluoróforo medio unido a la superficie de plaquetas enfriadas frente a plaquetas a temperatura ambiente (media \pm SD, n = 3-4).

Las plaquetas enfriadas circulantes tienen función hemostática en ratones con deficiencia de CR3.

A pesar de su rápida eliminación en ratones de tipo salvaje, las plaquetas enfriadas marcadas con CM-naranja o CMFDA fueron funcionales 24 h después de la infusión en ratones con deficiencia de CR3, como se determina por tres métodos independientes. En primer lugar, las plaquetas enfriadas se incorporan en agregados plaquetarios en sangre desprendida que sale de una herida hemorrágica de la vena de la cola estandarizada (Fig. 6). Las plaquetas a temperatura ambiente positivas a CMFDA transfundidas en ratones de tipo salvaje (Fig. 6b) y las plaquetas enfriadas positivas a CNIFDA transfundidas en ratones con deficiencia de CR3 (Fig. 6d) formaron agregados en célula desprendida en el mismo grado que las plaquetas negativas a CMFDA del ratón receptor. En segundo lugar, como se determina mediante la exposición en la superficie de las plaquetas del sitio de unión a fibrinógeno en $\alpha_{IIb}\beta_3$ 24 horas después de la transfusión de plaquetas marcadas con CM-naranja enfriadas y vueltas a calentar en ratones con deficiencia de CR3 tras la estimulación *ex vivo* por trombina. En tercer lugar, las plaquetas marcadas con CM-naranja enfriadas y vueltas a calentar fueron completamente capaces de aumentar selectina P en respuesta a la activación de trombina (Fig. 6e).

Discusión

El cambio de forma de las plaquetas inducido por frío no conduce él solo a la eliminación de plaquetas in vivo

El enfriamiento induce rápidamente amplios cambios de forma de las plaquetas mediado por reordenamientos

citoesqueléticos intracelulares (Hoffmeister et al., 2001; White y Krivit, 1967; Winokur y Hartwig, 1995). Estas alteraciones son parcial pero no completamente reversibles al volverlas a calentar, y las plaquetas vueltas a calentar son más esféricas que discoidales. La idea de que la conservación de la forma discoidal de las plaquetas es un requisito importante para la supervivencia de las plaquetas ha sido un dogma, a pesar de las pruebas de que las plaquetas murinas y de babuinos transfundidas, activadas *es vivo* por trombina, circulan normalmente con amplios cambios de forma (Berger et al., 1998; Michelson et al., 1996). Se ha demostrado aquí que el enfriamiento conduce a cambios específicos en la superficie de las plaquetas, los cuales median su eliminación independientemente del cambio de forma, y que el cambio de forma *per se* no conduce a una eliminación rápida de las plaquetas. Las plaquetas enfriadas y vueltas a calentar, conservadas como discos con agentes farmacológicos, se eliminan con la misma velocidad que las plaquetas enfriadas no tratadas, y las plaquetas con falta de forma, enfriadas y vueltas a calentar, circulan igual que las plaquetas mantenidas a temperatura ambiente en ratones con deficiencia de CR3. El pequeño tamaño de las plaquetas les permite seguir en circulación, escapando del atrapamiento a pesar de sus amplias deformidades de forma.

Receptores que median la eliminación de plaquetas enfriadas: CR3 y GP1b α

La duración vital normal de las plaquetas en seres humanos es aproximadamente 7 días (Aas, 1958; Ware et al., 2000). La incorporación de plaquetas en pequeños coágulos sanguíneos creados por esfuerzos mecánicos continuos contribuye indudablemente a la eliminación de las plaquetas, debido a que reacciones de coagulación masivas, tales como las que se producen durante la coagulación intravascular diseminada, provocan trombocitopenia (Seligsohn, 1995). El destino de las plaquetas en tales reacciones de coagulación difiere del de las plaquetas infundidas activadas *ex vivo*, tal como en los experimentos de Michelson *et al* (Michelson et al., 1996) y Berger *et al* (Berger et al., 1998), debido a que la estimulación *in vivo* de las plaquetas se produce en las paredes de los vasos lesionados, y las plaquetas activadas son secuestradas rápidamente en estos sitios.

Los isoanticuerpos y autoanticuerpos aceleran la eliminación fagocítica de plaquetas por macrófagos que poseen receptores Fc en individuos sensibilizados por plaquetas inmunológicamente incompatibles o en pacientes con trombocitopenia autoinmunitaria, pero existe de otro modo poca información con respecto a los mecanismos de la eliminación plaquetaria. Sin embargo, se mostró que las cantidades de IgG o IgM unidas a plaquetas humanas enfriadas o a temperatura ambiente son idénticas, implicando que la unión de anticuerpos asociados a plaquetas a receptores Fc no media la eliminación de plaquetas enfriadas. También se demuestra que el enfriamiento de las plaquetas no induce exposición detectable a fosfatidilserina (PS) en la superficie plaquetaria *in vitro*, repercutiendo contra la exposición a PS y la implicación de receptores depuradores en la eliminación de plaquetas enfriadas.

Aunque muchas publicaciones se han referido a los efectos del frío en las plaquetas como "activación", aparte de los cambios de forma mediados citoesqueléticamente, las plaquetas enfriadas no se parecen a plaquetas activadas por estímulos tales como trombina o ADP. La activación normal aumenta notablemente la expresión de selectina P en la superficie, una consecuencia de la secreción de gránulos intracelulares (Berman et al., 1986). El enfriamiento de las plaquetas no conduce al aumento de selectina P (Tabla 1), pero la eliminación de las plaquetas enfriadas aisladas de ratones de tipo salvaje o con deficiencia de selectina P es igualmente rápida (Berger et al., 1998). La activación también incrementa la cantidad de $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrina y su avidéz por fibrinógeno (Shattil, 1999), pero el enfriamiento no tiene estos efectos (Tabla 1). La supervivencia normal de plaquetas activadas mediante trombina es consistente con nuestros hallazgos.

Se ha demostrado que CR3 en macrófagos hepáticos es principalmente responsable del reconocimiento y eliminación de plaquetas enfriadas. El papel predominante de macrófagos que poseen CR3 en el hígado en la eliminación de plaquetas enfriadas, a pesar de los abundantes macrófagos que expresan CR3 en el bazo, es consistente con la eliminación principalmente hepática de eritrocitos revestidos con IgM (Yan et al., 2000), y puede reflejar propiedades de filtración sanguínea del hígado que favorecen la unión e ingestión por CR3 macrofágico. El dominio extracelular de GP1b α se une ávidamente a CR3, y bajo esfuerzo de cizallamiento *in vitro* mantiene el giro y la adhesión firme de células THP-1 (Simon et al., 2000). La escisión del dominio extracelular de GP1b α murino da como resultado la supervivencia normal de plaquetas enfriadas transfundidas en ratones. La falta de GP1b α de plaquetas enfriadas humanas reduce enormemente la fagocitosis de las plaquetas tratadas por células similares a macrófagos *in vitro*. Por lo tanto, se propone que GP1b α es el correceptor para CR3 de macrófagos hepáticos en plaquetas enfriadas, que conduce a la eliminación plaquetaria por fagocitosis.

La eliminación normal de plaquetas frías que carecen de la porción N-terminal de GP1b α descarta muchas otras parejas de unión de CR3, incluyendo moléculas expresadas en las superficies de las plaquetas, como candidatos para mediar la eliminación de plaquetas enfriadas. Estos ligandos candidatos incluyen ICAM-2, fibrinógeno unido a la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ de plaquetas, iC3b, selectina P, glucosaminoglucanos, y quinínogeno de peso molecular elevado. Se excluye la deposición del fragmento de C3b opsónico iC3b como mecanismo para la eliminación de plaquetas enfriadas usando ratones con deficiencia en el factor del complemento 3, y el nivel de expresión de $\alpha_{IIb}\beta_3$ y unión a fibrinógeno también están sin cambiar después de enfriar las plaquetas.

Parece que la unión a vWf activado y la unión inducida por frío a CR3 son funciones separadas de GP1bα.

GP1bα en la superficie de la plaqueta discoide en reposo existe en ordenamientos lineales (Fig. 5) en un complejo con GP1bα, GP1X y V, unido al citoesqueleto de actina submembránico mediante filamina A y filamina B (Stossel et al., 2001). Su papel en la hemostasis es unir la forma activada de vWf en sitios de lesión vascular. La unión de GP1bα a vWf activado es constitutiva, y no requiere la contribución activa de la plaqueta, puesto que vWf activado se une igualmente bien a GP1bα en plaquetas en reposo o en plaquetas estimuladas. La estimulación de plaquetas en suspensión mediante trombina y otros agonistas hace que GP1bα se redistribuya en parte desde la superficie plaquetaria en una red de membrana interna, el sistema canalicular abierto, pero no conduce a la eliminación plaquetaria *in vivo* (Berger et al., 1998; Michelson et al., 1996) o a la fagocitosis *in vitro* (observaciones sin publicar). Sin embargo, el enfriamiento de las plaquetas provoca el agrupamiento de GP1bα en lugar de la internalización. Este agrupamiento depende del ensamblaje de actina de extremo positivo, debido a que ocurre en presencia de citocalasina B.

A pesar de que el frío promueve el reconocimiento de GP1bα plaquetario por CR3, no tiene ningún efecto sobre la interacción *in vitro* entre GP1bα y vWf activado, y las plaquetas enfriadas transfundidas en ratones con deficiencia de vWf desaparecen igual de rápido que en ratones de tipo salvaje. La capacidad de separación de la interacción de GP1bα con vWf y CR3 sugiere que la modificación selectiva de GP1bα puede inhibir la eliminación plaquetaria inducida por frío sin alterar la reactividad hemostáticamente importante de GP1bα con vWf. Puesto que todos los ensayos de la función plaquetaria de plaquetas enfriadas *in vitro* y tras la infusión en ratones con deficiencia de CR3 produjeron resultados normales, las plaquetas modificadas adecuadamente serían predeciblemente efectivas de manera hemostática.

Importancia fisiológica de la eliminación plaquetaria inducida por frío.

Aunque los cambios muy visibles de forma de las plaquetas se hacen obvios sólo a temperaturas por debajo de 15°C, el análisis bioquímico exacto muestra que son detectables alteraciones citoesqueléticas y aumento de la sensibilidad a trombina a medida que la temperatura cae por debajo de 37°C (Faraday y Rosenfeld, 1998; Hoffmeister et al., 2001; Tablin et al., 1996). Se hace referencia a esos cambios como "cebado" debido a las muchas diferencias funcionales que permanecen entre plaquetas expuestas al frío y plaquetas estimuladas con trombina o ADP. Puesto que la activación plaquetaria es potencialmente mortal en vasos sanguíneos coronarios y cerebrales sometidos a temperaturas corporales centrales, se ha propuesto que las plaquetas son termosensores, diseñadas para ser relativamente inactivas a la temperatura corporal central del sistema central, pero son cebadas por la activación a menores temperaturas de las superficies corporales externas, sitios muy susceptibles al sangrado a través de historia evolutiva (Hoffmeister et al., 2001). Los hallazgos dados a conocer aquí sugieren que los cambios irreversibles en GP1bα son la razón para la eliminación de plaquetas enfriadas. En lugar de permitir que las plaquetas enfriadas circulen, el organismo elimina mediante fagocitosis las plaquetas cebadas a baja temperatura.

Un sistema que implique al menos dos rutas de eliminación, una para eliminar plaquetas localmente activadas, y otra para extraer las plaquetas excesivamente cebadas (Fig. 7), puede explicar posiblemente por qué las plaquetas enfriadas circulan y funcionan normalmente en ratones con deficiencia de CR3 y tienen una circulación ligeramente prolongada tras la eliminación de GP1bα. Se propone que algunas plaquetas cebadas entran en coágulos microvasculares en una base estocástica. Otras son susceptibles a la exposición repetida a la temperatura de la superficie corporal, y este cebado repetido hace eventualmente a estas plaquetas reconocibles por macrófagos hepáticos que poseen CR3. Las plaquetas cebadas por enfriamiento son capaces de una función hemostática normal en ratones con deficiencia de CR3, y la coagulación contribuye a su eliminación. Sin embargo, el tiempo de supervivencia ligeramente más corto de plaquetas autólogas en ratones con deficiencia de CR3 examinados no es probablemente imputable a un aumento de la eliminación de plaquetas normalmente cebadas en coágulos microvasculares, debido a que la velocidad de eliminación de las plaquetas refrigeradas fue indistinguible de la de las plaquetas mantenidas a temperatura ambiente.

Referencias para antecedentes de la invención y Ejemplo 1

Aas, K. A. Gardener, F.H. (1958). Survival of blood platelets with chromium⁵¹. J Clin. Invest. 37,1257-1268.

Baker, G., Sullam, P. y Levin, J. (1997). A simple, fluorescent method to internally label platelets suitable for physiological measurements. Am. J. Hem. 56, 17-25.

Becker, G., Tuccelli, M., Kunicki, T., Chalos, M. y Aster, R. (1973). Studies of platelet concentrates stored at 22°C and 4°C. Transfusion. 13, 61-68.

Berger, G., Hartwell, D. y Wagner, D. (1998). P-selectin and platelet clearance. Blood. 92, 4446-4452.

Bergmeier, W., Bouvard, D., Eble, J., Mokhatari-Nejad, R., Schulte, V., Zirngibl, H., Brakebusch, C., Fdssler, R. y Nieswandt, R. (2001). Rhodocytin (aggrexin) activates platelets lacking αIIbβ1 integrin, glycoprotein VI, and the ligand-

binding domain of glycoprotein Iba. 2001. 276, 25121-25126.

Bergmeier, W., Rackebandt, K., Schroder, W., Zirngibl, H. y Nieswandt, B. (2000). Structural and functional characterization of the mouse von Willebrand factor receptor GPIb-IX with novel monoclonal antibodies. *Blood*. 95, 886-983.

- 5 Berman, C., Yeo, E., Wencel-Drake, J., Furie, B., Ginsberg, M. y Furie B. (1986). A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. Characterization and subcellular localization of platelet activation-dependent granule-external membrane protein. *J Clin Invest*. 78,130-137.

Bioulac-Sage, P., Kuiper, J., VanBerkel, T. J. C. y Balabaud, C. (1996). Lymphocyte and macrophage populations in the liver. *Hepatogastroenterology*. 43, 4-14.

- 10 Brown, S., Clarke, 14, Magowan, L. y Sanderson, H. (2000). Constitutive death of platelets leading to scavenger receptor-mediated phagocytosis. A caspase independent program. *J. Biol. Chem*. 275, 5987-5995.

Chernoff, A. y Snyder, In. (1992). The cellular and molecular basis of the platelet storage lesion: A symposium summery. *Transfusion*. 32, 386-390.

- 15 Coxon, A., Rieu, P., Barkalow, F. J., Askari, S., Sharpe, A. H., Von Andrian, U. H., Amout, M. A. y Mayadas, T.N. (1996). A novel role for the $\beta 2$ integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. *Immunity*. 5, 653-666.

Denis, C., Methia, N., Frenette, P., Rayburn, H., Ullman-Cullere, M., Hynes, R. y Wagner, P. (1998). A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95, 9524-9529.

- 20 Engelfriet, C., Reesink, H. y Blajchman, M. (2000). Bacterial contamination of blood components. *Vox Sang*. 78, 59-67.

Faraday, N. y Rosenfeld, B. (1998). *In vitro* hypothermia enhances platelet GP1Ib-IIIa activation and P-selectin expression. *Anesthesiology*. 88,1579-1585.

- 25 Hartwig, J., Bokoch, G., Carpenter, C., Janmey, P., Taylor, L., Toker, A. y Stossel, T. (1995). Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell*. 82, 643-653.

Hartwig, J. y DeSisto, M. (1991). The cytoskeleton of the resting human blood platelet: Structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments. *J. Cell Biol*. 112, 407-425.

- 30 Hartwig, J., Kung, S., Kovacsovics, T., Janmey, P., Cantley, L., Stossel, T. y Toker, A. (1996). D3 phosphoinositides and outside-in integrin signaling by GPHb/IIIa mediate platelet actin assembly and filopodial extension induced by phorbol 12-myristate 13-acetate. *J. Biol. Chem*. 271, 32986-32993.

Hoffmeister, K., Falet, H., Toker, A., Barkalow, K., Stossel, T. y Hartwig, J. (2001). Mechanisms of Cold-induced Platelet Actin Assembly. *J Biol Chem*. 276, 24751-24759.

Jacobs, M., Palavecino, E. y Yomtovian, R. (2001). Don't bug me: the problem of bacterial contamination of blood components-challenges and solutions. *Transfusion*. 41, 1331-1334.

- 35 Janmey, P. y Stossel, T. (1989). Gelsolin-polyphosphoinositide interaction. Full expression of gelsolin-inhibiting function by polyphosphoinositides in vesicular form and inactivation by dilution, aggregation, or masking of the inositol head group. *J. Biol. Chem*. 264, 4825-4831.

Kotze, H. F., Lötter, M.G., Badenhorst, P. N. y Heyns, A. du P. (1985). Kinetics if In-111-Platelets in the Baboon: I. Isolation and labeling of a viable and representative platelet population. *Thrombosis and Hemostasis*. 53, 404-407.

- 40 Kovacsovics, T. y Hartwig, J. (1996). Thrombin-induced GP1b-IX centralization on the platelet surface requires actin assembly and myosin H activation. *Blood*. 87, 618-629.

MacPhee, P. J., Schmid, E. y Groom, A, (1992). Evidence for Kupffer cell migration along liver sinusoides, from high-resolution *in vivo* microscopy. *Am. J. Physiol*. 263, 17-23.

- 45 McCuskey, R. S. (1986). Microscopic methods for studying the microvasculature of internal organs. *Physical Techniques in Biology and Medicine Microvascular Technology*, editado por C. H. Barker, y W. F. Nastuk. Orlando, FL: Academic. 247-264.

Michelson, A., Barnard, M., Hechtman, H., MacGregor, H, Connolly, W, Loscalzo, J. y Valeri, C. (1996). *In vivo* tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and

function. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 93, 11877-11882.

Michelson, A., MacGregor, H., Barnard, M., Kestin, A., Rohrer, M. y Valeri, C. (1994). Reversible inhibition of human platelet activation by hyperthermia *in vivo* and *in vitro*. Thromb. haemost. 71, 633-640.

- 5 Morton, L., Hargreaves, P., Farndale, R., Young, R. y Barnes, M. (1995). Integrin - $\alpha_2\beta_1$ -independent activation of platelets by simple collagen-like peptides: collagen tertiary (triple-helical) and quaternary (polymeric) structures are sufficient alone for $\alpha_2\beta_1$ -independent platelet reactivity. Biochem J. 306, 337-344.

Schlichter, S. y Harker, L. (1976). Preparation and storage of platelet concentrates II. Storage variables influencing platelet viability and function. Brit J Haemat. 34, 403-419.

- 10 Sehgsohn, U. (1995). Disseminated intravascular coagulation. Blood: Principles and Practice of Hematology. R.I. Handin, S.E. Lux, T.P. Stossel, ed. (Philadelphia, J.B. Lippincott Company) p. 1289-1317.

Shattil, S. (1999). Signaling through platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$: inside-out, outside-in, and sideways. Thromb Haemost. 82, 318-325.

- 15 Simon, D., Chen, Z., Xu, H., Li, C., Dong, J.-f., McIntire, L., Ballantyne, C., Zhang, L., Furman, M., Berndt, M. y Lopez, J. (2000). Platelet glycoprotein Ib α is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). J Exp Med. 192,193-204.

Simon, D. I., Rao, N. K., Xu, Y., Wei, O., Majdic, E., Ronne, L., Kobzik, L. y Chapman, H. A. (1996). Mac-1 (CD11b/CD18) and the urokinase receptor (CD87) form a functional unit on monocytic cells. Blood. 88, 3185-94.

Stossel, T., Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J., Noegel, A., Schleicher, M. y Shapiro, S. (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2, 138-145.

- 20 Tablin, F., Oliver, A., Walker, N., Crowe, L. y Crowe, J. (1996). Membrane phase, transition of intact human platelets: correlation with cold-induced activation. J. Cell. Phys. 168, 305-313.

Von Andrian, U. (2002). Immunology. T cell activation in six dimensions. Science. 296, 1815-1817.

Von Andrian, U. H. (1996). Intravital microscopy of the peripheral lymph node microcirculation in mice. Microcirculation. 3, 287-300.

- 25 Ward, C., Andrews, R., Smith, A. y Berndt, M. (1996). Mocarhagin, a novel cobra venom metalloproteinase, cleaves the platelet von Willebrandt factor receptor glycoprotein Ib α . Identification of the sulfated tyrosine/anionic sequence Tyr-276-Glu-282 of glycoprotein Ib α as a binding site for von Willebrandt factor and a-thrombin. Biochemistry. 28, 8326-8336.

- 30 Ware, J., Russell, S. y Ruggeri, Z. (2000). Generation and rescue of a murine model of platelet dysfunction: the Bernard-Soulier syndrome. Proc Natl Acad Sci, USA. 97, 2803-2808.

Wessels, M. R., Butko, P., Ma, M., H.B., W, Lage, A. y Cauoll, M. C. (1995). Studies of group B streptococcal infection in mice deficient in complement component C3 or C4 demonstrate an essential role for complement in both innate and acquired immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92, 11490-11494.

- 35 White, J. y Krivit, W. (1967). An ultrastructural basis for the shape changes induced in platelets by chilling. Blood. 30, 625-635.

Vinokur, R. y Hartwig, J. (1995). Mechanism of shape change in chilled human platelets. Blood. 85,1796-1804.

Yan, J., Vetvicka, V., Xia, Y. Hanikyrova, M., Mayadas, T.N., Ross, G.D. (2000). Critical role of Kupffer cell CR3 (CD11b/CD18) in the clearance of IgM-opsonized erythrocytes or soluble P-glucan. Immunopharmacology. 46, 39-54.

- 40 Yomtovian, R., Lazarus, H., Goodnough, L., Hirschler, N., Morrissey, A. y Jacobs, M.R (1993). A prospective microbiologic surveillance program to detect and prevent the transfusion of bacterially contaminated platelets. Transfusion. 33, 902-909.

Zucker, M. y Borrelli, J. (1954). Reversible alteration in platelet morphology produced by anticoagulants and by cold. Blood. 28, 524-534.

- 45 Ejemplo 2 (comparativo)

Implicación del dominio de $\alpha_M\beta_2$ (CR3) lectina en fagocitosis de plaquetas enfriadas.

$\alpha_M\beta_2$ (CR3) tiene un sitio de lectina de unión a azúcar independiente del catión, situado "C-T" con respecto a su dominio I (Thornton et al, *J. Immunol.* 156, 1235-1246, 1996), que se une a mananos, glucanos y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc). Puesto que los complejos membránicos de CD16b/ $\alpha_M\beta_2$ son destruidos por β -glucano, N-acetil-D-galactosamina (GalNAc), y metil- α -manósido, pero no por otros azúcares, se cree que esta interacción se produce en el sitio de lectina de la integrina $\alpha_M\beta_2$ (CR3) (Petty et al, *J. Leukoc. Biol.* 54, 492-494, 1993; Sehgal et al, *J. Immunol.* 150, 4571-4580, 1993).

El sitio de lectina de la integrina $\alpha_M\beta_2$ tiene una amplia especificidad por azúcares (Ross, R. *Critical Reviews in Immunology* 20, 197-222, 2000). Aunque la unión de los azúcares a lectinas es habitualmente de baja afinidad, el agrupamiento puede provocar una interacción más robusta, incrementando la avidéz. El agrupamiento de GP1b α tras el enfriamiento, como se muestra mediante microscopía electrónica, sugiere tal mecanismo. Las hexosaminas más habituales de células animales son D-glucosamina y D-galactosamina, que se originan mayoritariamente en hidratos de carbono estructurales como GlcNAc y GalNAc, sugiriendo que el dominio de lectina de $\alpha_M\beta_2$ integrina también se puede unir a glucoproteínas de mamífero que contienen hidratos de carbono que no están cubiertos por ácido siálico. La forma soluble de GP1b α , glucocalicina, tiene un contenido de hidrato de carbono de 60%, que comprende cadenas de hidrato de carbono enlazadas N así como O-glucosídicamente (Tsuji et al, *J. Biol. Chem.* 258, 6335-6339, 1983). La glucocalicina contiene 4 sitios de N-glucosilación potenciales (Lopez, et al, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 84, 5615-5619, 1987). La región de 45 kDa contiene dos sitios que están N-glucosilados (Titani et al, *Proc Natl Acad Sci* 16, 5610-5614, 1987). En células de mamífero normales, se pueden sintetizar cuatro estructuras centrales normales de O-glucano. Todas ellas se pueden alargar, sialilar, fucosilar y sulfatar para formar estructuras de hidratos de carbono funcionales. Las cadenas de hidrato de carbono enlazadas mediante N de GP1b α son estructuras del tipo complejo y di-, tri- y tetraantenarias (Tsuji et al, *J. Biol. Chem.* 258, 6335-6339, 1983). Son estructuras de tipo GalNAc sialiladas, con un resto de fucosa enlazado α (1-6) en la unidad de GlcNAc unida a Asn. Hay una similitud estructural de las cadenas de azúcar enlazadas a Asn con las enlazadas a Ser/Thr: es decir, su posición es de secuencia Gal-GlcNAc habitual. Los resultados sugirieron que la eliminación de ácido siálico y galactosa no tiene influencia sobre la unión de vWf a glucocalicina, pero la eliminación parcial de GlcNAc dio como resultado la inhibición de la unión a vWf (Korrel et al, *FEBS Lett* 15, 321-326, 1988). Un estudio más reciente propuso que los patrones de hidratos de carbono están implicados en el mantenimiento de una conformación funcional apropiada del receptor, sin participar directamente en la unión de vWf (Moshfegh et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 903-909, 1998).

Un papel de los azúcares en la interacción entre plaquetas enfriadas y macrófagos tiene la consecuencia importante de que la modificación covalente, eliminación o enmascaramiento de los restos de oligosacáridos podría evitar esta interacción. Se hipotetizó que tal prevención no altera la función plaquetaria normal: podemos ser capaces de modificar plaquetas y permitir el almacenamiento de plaquetas en frío. Aquí, se muestran pruebas que apoyan esta hipótesis: 1) los sacáridos inhibieron la fagocitosis de plaquetas enfriadas por macrófagos *in vitro*, y los azúcares específicos que son efectivos implicaron β -glucanos como las dianas pertinentes. Las concentraciones bajas de β -GlcNAc fueron inhibidores sorprendentemente efectivos, consistentes con la idea de que la interferencia con un número relativamente pequeño de azúcares agrupados puede ser suficiente para inhibir la fagocitosis. La adición de azúcares a concentraciones que inhibieron de forma máxima la fagocitosis de plaquetas enfriadas no tuvo ningún efecto sobre la función de GP1b α normal (unión de vWf); 2) una lectina específica de β -GlcNAc, pero no otras lectinas, se une ávidamente a plaquetas enfriadas; 3) la eliminación de GP1b α o restos de β -GlcNAc de las superficies de las plaquetas evitó esta unión (puesto que la eliminación de β -GlcNAc expuso los restos de manosa, no evitó la fagocitosis por macrófagos que tienen receptores de manosa); 4) el bloqueo de β -glucanos expuestos en plaquetas enfriadas mediante adición enzimática de galactosa inhibió notablemente la fagocitosis de plaquetas enfriadas por macrófagos *in vitro*, y prolongó los tiempos de circulación de plaquetas enfriadas en animales normales.

Efecto de monosacáridos sobre la fagocitosis de plaquetas enfriadas.

Para analizar los efectos de monosacáridos sobre la fagocitosis plaquetaria, se incubaron fagocitos (estirpe celular monocítica diferenciada THP-1) en disoluciones de monosacáridos a diversas concentraciones, y se añadieron las plaquetas enfriadas o a temperatura ambiente. Los valores en las Figuras son medias \pm SD de 3-5 experimentos que comparan porcentajes de monocitos positivos a naranja que contienen plaquetas ingeridas incubados con plaquetas a RT o enfriadas). Mientras que 100 mM de D-glucosa inhibió la fagocitosis de plaquetas enfriadas en un 65,5% ($P < 0,01$), 100 mM de D-galactosa no inhibió significativamente la fagocitosis de plaquetas enfriadas ($n = 3$) (Fig. 8A). El anómero α de D-glucosa (α -glucósido) no tuvo un efecto inhibitor sobre la fagocitosis de plaquetas enfriadas, aunque 100 mM inhibieron en 90,2% (Fig. 8B). Por el contrario, β -glucósido inhibió la fagocitosis de una manera dependiente de la dosis (Fig. 8B). La incubación de los fagocitos con 100 mM de β -glucósido inhibió la fagocitosis en 80% ($p < 0,05$) y con 200 mM en 97% ($P < 0,05$); por lo tanto se concluye que se prefiere el anómero β . La D-manosa y sus anómeros α y β (metil- α -D-manopiranosido (Fig. 8C) y metil- β -D-manopiranosido (Fig. 8C) no tuvieron ningún efecto inhibitor sobre la fagocitosis de plaquetas enfriadas o a RT. La incubación de fagocitos usando 25 a 200 mM de GlcNAc (N-acetil-D-glucosamina) inhibió significativamente la fagocitosis de plaquetas enfriadas. La

incubación con 25 mM de GlcNAc fue suficiente para inhibir la fagocitosis de plaquetas enfriadas en 86% ($P < 0,05$) (Fig. 8D), mientras que 10 μ M del anómero β de GlcNAc inhibieron la fagocitosis de plaquetas enfriadas en 80% ($p < 0,01$) (Fig. 8D). Ninguno de los monosacáridos tuvo un efecto inhibitor sobre la fagocitosis de las plaquetas a RT. La Tabla 2 resume los efectos inhibidores de los monosacáridos a las concentraciones indicadas sobre la fagocitosis de plaquetas enfriadas ($**P < 0,01$, $*P < 0,05$). Ninguno de los monosacáridos inhibió la agregación de plaquetas humanas inducida por trombina o ristocetina o la secreción de α -gránulos inducida, según se mide mediante exposición a selectina P.

Tabla 2. Efectos inhibidores de monosacáridos sobre la fagocitosis de plaquetas enfriadas

Monosacáridos	% de inhibición de la fagocitosis	mM
D-(+)-glucosa	65,5	100
D-(+)-galactosa	--	100
Metil- α -D-glucopiranosido	90,2*	100
Metil- β -D-glucopiranosido	80,2*	100
	97,1*	200
D-(+)-manosa	--	100
Metil- α -D-manopiranosido	--	100
Metil- β -D-manopiranosido	--	100
β -GlcNAc	80,9*	0,01
GlcNAc	86,3*	25
	83,9*	100
	83,1*	200

Unión de diversas lectinas a plaquetas a temperatura ambiente o a plaquetas enfriadas.

β -GlcNAc inhibió fuertemente la fagocitosis de plaquetas humanas enfriadas *in vitro* a concentraciones de μ M, indicando que GlcNAc está expuesta después de la incubación de las plaquetas en el frío. Se investigó entonces si la aglutinina de germen de trigo (WGA), una lectina con especificidad por el azúcar terminal (GlcNAc), se une más efectivamente a las plaquetas enfriadas que a las plaquetas a temperatura ambiente. Se incubaron plaquetas lavadas, enfriadas o a temperatura ambiente, con 2 μ g/ml de WGA acoplada a FITC o succinil-WGA acoplada a FITC, durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se analizó mediante citometría de flujo. Las Figs. 9A y 9B muestran las gráficas de puntos tras la incubación con FITC-WGA de plaquetas humanas a temperatura ambiente (RT) o enfriadas (Frías). WGA induce agregación plaquetaria y liberación de serotonina o ADP a concentraciones entre 25-50 μ g/ml de WGA (Greenberg y Jamieson, *Biochem. Biophys. Acta* 345, 231-242, 1974). La incubación con 2 μ g/ml de WGA no indujo agregación significativa de las plaquetas a RT (Fig. 9A, RT con WGA), pero la incubación de las plaquetas enfriadas con 2 μ g/ml de WGA indujo agregación masiva (Fig. 9B, Frías con WGA). La Fig. 9C muestra el análisis de la unión de la fluorescencia de FITC-WGA a plaquetas enfriadas o a temperatura ambiente. Para verificar que el incremento de la unión de fluorescencia no está relacionado con la agregación, se usó succinil-WGA (S-WGA), un derivado dímero de la lectina que no induce agregación plaquetaria (Rendu y Lebret, *Thromb Res* 36,447-456,1984). Las Figs. 9D y 9E muestran que succinil-WGA (S-WGA) no induce agregación de plaquetas a temperatura ambiente o enfriadas, pero dio como resultado el mismo incremento en la unión de WGA a las plaquetas enfriadas frente a las plaquetas a temperatura ambiente (Fig. 9F). La unión mejorada de S-WGA tras el enfriamiento de las plaquetas no se puede invertir calentando hasta 37°C las plaquetas enfriadas.

Los restos de β -GlcNAc expuestos sirven como sustrato para una enzima α 1,4galactosiltransferasa que cataliza el enlace Gal β -1GlcNAc β 1-R. Para apoyar esta predicción, el enmascaramiento de los restos de β -GlcNAc mediante galactosilación enzimática inhibió la unión de S-WGA a plaquetas frías, la fagocitosis de plaquetas enfriadas por células THP-1, y la eliminación rápida de plaquetas enfriadas tras la infusión en ratones. La galactosilación enzimática, lograda con β 1,4galactosiltransferasa bovina y su sustrato donante UDP-Gal, disminuyó la unión de S-WGA a plaquetas humanas enfriadas hasta niveles equivalentes a las plaquetas a temperatura ambiente. Contrariamente, la unión de la lectina RCA I específica de galactosa aumentó en ~ 2 veces después de la

galactosilación. UDP-glucosa y UDP solo no tiene ningún efecto en la unión de S-WGA o de RCA I a plaquetas humanas enfriadas o a temperatura ambiente.

Se encontró que la galactosilación enzimática de plaquetas humanas y de ratón es eficiente sin la adición de β 1,4galactosiltransferasa exógena. La adición sola del sustrato donante UDP-Gal reduce la unión de S-WGA e incrementa la unión de RCA I a plaquetas enfriadas, inhibe la fagocitosis de plaquetas enfriadas por células THP1 *in vitro*, y prolonga la circulación de plaquetas enfriadas en ratones. Una explicación para este hallazgo inesperado es que las plaquetas supuestamente liberan lentamente actividad de galactosiltransferasa endógena. Al menos una forma de β 1,4galactosiltransferasas, β 4Gal T1, está presente en plasma humano, en plaquetas humanas lavadas y en los fluidos sobrenadantes de plaquetas lavadas. Las galactosiltransferasas se pueden asociar específicamente con la superficie plaquetaria. Como alternativa, la actividad puede derivar del plasma y provenir del sistema canalicular abierto de las plaquetas. En cualquier caso, la modificación de los glucanos plaquetarios responsables de la eliminación plaquetaria mediada por frío es posible por simple adición del sustrato donante de azúcar-nucleótido, UDP-Gal.

De forma importante, tanto las plaquetas enfriadas como no enfriadas muestran el mismo incremento en la unión de RCA I tras la galactosilación, implicando que los restos de β -GlcNAc están expuestos en la superficie de las plaquetas independientemente de la temperatura. Sin embargo, el enfriamiento es un requisito para el reconocimiento de restos de β -GlcNAc por S-WGA y por la $\alpha_M\beta_2$ integrina. Se ha demostrado que el enfriamiento de las plaquetas induce un agrupamiento irreversible de GP1b. Generalmente, la unión de lectina es de baja afinidad, y las interacciones multivalentes con densidad elevada de ligandos e hidratos de carbono incrementan la avidez de la unión. Posiblemente, las densidades locales de β -GlcNAc expuesta en la superficie de plaquetas no enfriadas son demasiado bajas para el reconocimiento, pero el agrupamiento inducido por frío de GP1b α proporciona la densidad necesaria para la unión a S-WGA o al dominio de la lectina $\alpha_M\beta_2$ integrina. Se confirmó mediante citometría de flujo de unión a S-WGA y a RCA-I que UDP-Gal transfiere galactosa a plaquetas murinas en presencia o ausencia de galactosil transferasa añadida, y se documentó que las plaquetas murinas enfriadas galactosiladas circulan y sobreviven inicialmente de forma significativamente mejor que las plaquetas a temperatura ambiente no tratadas.

Aunque las primeras recuperaciones (< 2 min.) no difieren entre plaquetas galactosiladas a RT, enfriadas y enfriadas galactosiladas infundidas, la galactosilación abolió una pérdida inicial de plaquetas de alrededor de 20%, observado consistentemente con las plaquetas a RT.

La galactosilación de plaquetas murinas y humanas no altera su funcionalidad *in vitro*, según se mide mediante agregación y exposición a selectina P inducida por el péptido relacionado con colágeno (CRP) o trombina a concentraciones que oscilan desde máximamente efectivas hasta tres órdenes de magnitud inferiores. De forma importante, las respuestas de agregación de plaquetas humanas enfriadas galactosiladas y no modificadas a un intervalo de concentraciones de ristocetina, un ensayo de la interacción entre GP1b y VWF activado, fueron indistinguibles o ligeramente mejores. Los puntos de fijación para glucanos enlazados mediante N en GP1b α están fuera del bolsillo de unión para VWF. Además, las moléculas de GP1b α mutantes que carecen de glucanos enlazados mediante N se unen fuertemente a VWF.

Usando lectinas marcadas con FITC con especificidades para β -galactosa (*lectina de R. communis*/RCA), ácido 2-3 siálico (*lectina de Maackia amurensis*/MAA) o ácido 2-6 siálico (*lectina de Sambucus Nigra*/SNA), no se pudo detectar unión incrementada después de enfriar las plaquetas mediante citometría de flujo (Fig. 10), mostrando que la exposición después del enfriamiento de las plaquetas está restringida a GlcNAc.

SE localizaron los residuos de β -GlcNAc expuestos que median el reconocimiento del dominio de $\alpha_M\beta_2$ lectina de GP1b α N-glucanos. El dominio extracelular de GP1b α contiene 60% del contenido total de hidratos de carbono de las plaquetas en forma de cadena de hidratos de carbono enlazada N- y O-glucosídicamente. En consecuencia, la unión de WGA marcada con peroxidasa a GP1b α es fácilmente detectable en presentaciones de proteínas totales de plaquetas resueltas por SDS-PAGE, demostrando que GP1b α contiene el grueso de los restos de β -GlcNAc en las plaquetas, y la unión de WGA a GP1b α es observable en inmunoprecipitados de GP1b α . UDP-Gal con o sin galactosiltransferasa disminuye la unión de S-WGA a GP1b α , mientras que incrementa la unión de RCA I a GP1b α . Estos hallazgos indican que la galactosilación cubre específicamente restos de β -GlcNAc expuestos en GP1b α . La eliminación de los 282 restos N-terminales de GP1b α de las superficies de plaquetas humanas usando la proteasa de veneno de serpiente mocarhagina, que inhibió la fagocitosis de plaquetas humanas por células THP-1 *in vitro*, reduce la unión de S-WGA a plaquetas enfriadas de forma casi equivalente a los niveles de unión a temperatura ambiente de S-WGA. WGA se une predominantemente al término N de GP1b α liberado por mocarhagina en fluidos de sobrenadantes de plaquetas como una banda polipeptídica de 45 kDa, reconocible por el anticuerpo monoclonal SZ2 específico para ese dominio. Los glucanos de este dominio están enlazados mediante N. Una pequeña porción de GP1b α permanece intacta después del tratamiento con mocarhagina, posiblemente debido a que el sistema canalicular abierto de la plaqueta lo secuestra. WGA conjugada con peroxidasa reconoce débilmente el término C de GP1b α asociado a plaquetas residuales después de la escisión con mocarhagina, identificable con anticuerpo

monoclonal WM23.

El incremento inducido por frío de la unión de plaquetas humanas a $\alpha_M\beta_2$ integrina y a S-WGA se produce rápidamente (en minutos). La unión mejorada de S-WGA a plaquetas enfriadas permaneció estable durante un tiempo de hasta 12 días de almacenamiento refrigerado en plasma autólogo. La unión de RCA I permaneció equivalente a niveles de temperatura ambiente en las mismas condiciones. La galactosilación duplicó la unión de lectina RCA I a las plaquetas, y redujo la unión de S-WGA a los niveles de RT de valor inicial. El incremento en la unión de RCA I y la disminución en la unión de S-WGA fueron idénticos ya sea que la galactosilación transcurriera o siguiera el almacenamiento de las plaquetas en plasma autólogo durante un tiempo de hasta 12 días. Estos hallazgos indican que la galactosilación de plaquetas para inhibir la unión de lectina es posible antes o después de la refrigeración, y que la modificación de los glucanos es estable durante el almacenamiento durante un tiempo de hasta 12 días. Las plaquetas almacenadas a temperatura ambiente pierden rápidamente sensibilidad a agentes agregantes; esta pérdida no se produce con refrigeración. En consecuencia, las plaquetas refrigeradas con o sin galactosilación, antes o después del almacenamiento, retuvieron la sensibilidad de la agregación a trombina durante un tiempo de hasta 12 días de almacenamiento en frío.

Efectos de β -hexosaminidasa (β -Hex) y mocarhagina (MOC) sobre la unión de FITC-lectina WGA a plaquetas almacenadas enfriadas frente a temperatura ambiente.

La enzima β -hexosaminidasa cataliza la hidrólisis de restos de β -D-N-acetilglucosamina (GlcNAc) terminales y de galactosamina (GalNAc) de oligosacáridos. Para analizar si la eliminación de los restos de GlcNAc reduce la unión de WGA a la superficie plaquetaria, se trataron plaquetas humanas lavadas enfriadas y a temperatura ambiente con 100 U/ml de β -Hex durante 30 minutos a 37°C. La Fig. 11A muestra el resumen de la unión de FITC-WGA a la superficie de plaquetas a temperatura ambiente o plaquetas enfriadas obtenido mediante citometría de flujo antes y después del tratamiento con β -hexosaminidasa. La unión de FITC-WGA a plaquetas enfriadas se redujo en 85% después de la eliminación de GlcNAc ($n = 3$). También se comprobó si, como era de esperar, la eliminación de GP1b α de la superficie plaquetaria conduce a una unión reducida de WGA después del enfriamiento de las plaquetas. GP1b α se eliminó de la superficie plaquetaria usando el veneno de serpiente mocarhagina (MOC), como se describe previamente (Ward et al, *Biochemistry* 28, 8326-8336, 1996). La Fig. 11B muestra que la eliminación de GP1b α de la superficie plaquetaria redujo la unión de FITC-WGA a las plaquetas enfriadas en 75%, y tuvo poca influencia sobre la unión de WGA a plaquetas a temperatura ambiente sin GP1b α ($n = 3$). Estos resultados indican que WGA se une mayoritariamente a oligosacáridos en GP1b α tras enfriar las plaquetas humanas, y es muy tentador especular que el sitio de lectina Mac-1 también reconoce estos azúcares expuestos en GP1b α , conduciendo a fagocitosis.

El enmascaramiento de los restos de GlcNAc de plaquetas humanas mediante transferencia de galactosa reduce enormemente su fagocitosis tras enfriar in vitro, e incrementa drásticamente su supervivencia en ratones.

Para lograr la transferencia de galactosa en plaquetas, se incubaron plaquetas humanas aisladas con 200 μ M de UDP-galactosa y 15 mU/ml de galactosa transferasa durante 30 min. a 37°C, seguido del enfriamiento o mantenimiento a temperatura ambiente durante 2 h. La galactosilación redujo la unión de FITC-WGA casi a los niveles de temperatura ambiente en reposo. Las plaquetas se alimentaron a los monocitos, y se analizó la fagocitosis plaquetaria como se describe anteriormente. La Fig. 12 muestra que la transferencia de galactosa a oligosacáridos plaquetarios reduce enormemente la fagocitosis de plaquetas enfriadas (Frías), pero no afecta a la fagocitosis de plaquetas a temperatura ambiente (RT) ($n = 3$). Estos resultados muestran que *in vitro* la fagocitosis de plaquetas enfriadas se puede reducir a través de la cobertura de los restos de GlcNAc expuestos. Se realizó un ensayo para saber si este enfoque se podría extender a animales y se podría usar para incrementar el tiempo de circulación de las plaquetas enfriadas. Las plaquetas murinas se aislaron y se tiñeron con CMFDA. Usando el mismo enfoque de transferencia de galactosa descrito para plaquetas humanas anteriormente, se galactosilaron plaquetas murinas de tipo salvaje y se enfriaron, o no, durante 2 horas. Se transfundieron 10^8 plaquetas en ratones de tipo salvaje, y se determinó su supervivencia. La Fig. 13 muestra la supervivencia de estas plaquetas murinas enfriadas y galactosiladas, con relación a plaquetas no tratadas. Ambas plaquetas mantenidas a temperatura ambiente (RT) y las plaquetas enfriadas galactosiladas (Frías + GalT) tuvieron tiempos de supervivencia casi idénticos, mientras que las plaquetas no tratadas enfriadas (Frías) se eliminaron rápidamente como era de esperar. Se cree que las plaquetas enfriadas galactosiladas circularán en seres humanos.

Se observó que la reacción de control, en la que la galactosa transferasa se inactivó por calor, también dio como resultado la modificación del glucano de las plaquetas, como ocurrió en la reacción experimental con galactosa transferasa activa, como se juzga mediante la unión de WGA (Fig. 14A), la fagocitosis *in vitro* da como resultado plaquetas humanas (Fig. 14B), y la supervivencia de plaquetas murinas (Fig. 14C). Por lo tanto, se concluye que las plaquetas contienen actividad de galactosa transferasa en su superficie, que es capaz de dirigir la modificación de glucanos usando sólo UDP-galactosa sin la adición de ninguna otra galactosa transferasa exógena. De este modo, la modificación de glucanos de las plaquetas se puede lograr simplemente mediante incubación con UDP-galactosa.

UDP-galactosa se incorpora en plaquetas humanas de una manera dependiente del tiempo.

En otro conjunto de experimentos, se ha demostrado que UDP-galactosa marcada con ^{14}C se incorpora en plaquetas humanas de una manera dependiente del tiempo en presencia o ausencia de la enzima galactosil transferasa. La Fig. 15 muestra el transcurso de tiempo de la incorporación de UDP-galactosa marcada con ^{14}C en plaquetas humanas lavadas. Las plaquetas humanas se incubaron con UDP-galactosa marcada con ^{14}C durante diferentes intervalos de tiempo en ausencia de galactosil transferasa. Las plaquetas se lavaron entonces y se midió la radioactividad de ^{14}C asociada con las plaquetas.

Ejemplo 3 (comparativo)

La modificación enzimática de β -glucanos plaquetarios inhibe la fagocitosis de plaquetas enfriadas por macrófagos in vitro, y permite la circulación normal in vivo.

Los experimentos preliminares han demostrado que el recubrimiento enzimático de los restos de GlcNAc en GP1b α usando transferencia de galactosa (modificación de glucanos) sobre las superficies de plaquetas humanas enfriadas reduce enormemente su fagocitosis *in vitro*. Una interpretación de estos hallazgos es que la estructura de GP1b α se altera en la superficie de plaquetas humanas y murinas enfriadas. Esto provoca la exposición o agrupamiento de GlcNAc, que es reconocida por el dominio de unión de lectina de $\alpha\text{M}\beta 2$, conduciendo a la retirada de las plaquetas. La exposición de β -GlcNAc se puede medir mediante unión de WGA y posiblemente mediante unión de péptidos del dominio de lectina de $\alpha\text{M}\beta 2$ recombinante. Las plaquetas humanas en reposo se unen a WGA, lo que aumenta enormemente después del enfriamiento. Se propone que la transferencia de galactosa (modificación de glucanos) evitará la interacción de GP1b α con $\alpha\text{M}\beta 2$ -lectina, pero no con vWf. Esta modificación (transferencia de galactosa sobre la superficie de las plaquetas) conduce a la supervivencia normal de plaquetas enfriadas en ratones WT, como se muestra por los experimentos preliminares.

Ejemplo 4 (comparativo)

Este ejemplo muestra que el sitio de lectina $\alpha\text{M}\beta 2$ imita WGA y las modificaciones de los azúcares evitan el acoplamiento del sitio de lectina recombinante con plaquetas enfriadas. Dr. T. Springer (Corbi, et al., *J. Biol. Chem.* 263, 12403-12411, 1988) proporcionó el ADNc de αM humana, y varios anticuerpos anti- αM . El constructo r-hu αM más pequeño que muestra actividad de lectina que ha sido dado a conocer incluye su C-T y una porción de su región de unión a catión divalente (restos 400-1098) (Xia et al, *J Immunol* 162, 7285-7293, 1999). El constructo está marcado con 6xHis para una fácil purificación. Se determinó en primer lugar si el dominio de lectina recombinante se puede usar como un inhibidor competitivo de la ingestión de plaquetas enfriadas en el ensayo fagocítico. La competición demostró que el sitio de lectina αM media la unión a la superficie de las plaquetas e inicia la fagocitosis. Como controles, se usó un constructo que carece de la región de unión a lectina de αM , y la proteína recombinante se desnaturizó. El dominio de unión a lectina funciona como un inhibidor específico de la ingestión de plaquetas enfriadas. Se obtuvo un constructo αM que incluye GFP y expresa y marca el sitio de unión de lectina αM con FITC, y se usó para marcar la superficie de las plaquetas enfriadas mediante citometría de flujo. Las plaquetas se marcaron con CMFDA. Se encontró que las plaquetas enfriadas se unen más eficientemente al sitio de lectina de αM de $\alpha\text{M}\beta 2$ integrina en comparación con las plaquetas a temperatura ambiente. El sitio de lectina y todo el constructo de αM (Mac-1) se expresó en células de insecto Sf9.

Las cadenas de azúcar de las plaquetas se modificaron para inhibir la interacción de oligosacáridos plaquetarios con el sitio de lectina r-hu αM . La eficiencia de las modificaciones de los azúcares también se monitorizan mediante inhibición de la unión del dominio de lectina fluorescente que se une a las plaquetas mediante citometría de flujo.

Los tiempos de recuperación y circulación de plaquetas a temperatura ambiente, enfriadas y modificadas enfriadas se comparan para establecer que la transferencia de galactosa sobre plaquetas murinas enfriadas da como resultado plaquetas que circulan durante más tiempo. Las plaquetas a temperatura ambiente, enfriadas y las modificadas enfriadas se tiñeron con CMFDA, y se transfundieron 10^8 plaquetas en ratones de tipo salvaje, como se describe anteriormente. Los ratones se sangraron inmediatamente (< 2 min.), 30 min., 1 h, 2, 24, 48 y 72 horas después de la transfusión. La sangre obtenida se analizó usando citometría de flujo. El porcentaje de plaquetas marcadas fluorescentes en la población de plaquetas encerradas en una ventana medida inmediatamente después de la inyección se ajusta como 100%. La recuperación de las plaquetas marcadas fluorescentemente obtenidas a diversos puntos de tiempo se calcula en consecuencia.

Ejemplo 5 (comparativo)

Este ejemplo demuestra que las plaquetas enfriadas, no modificadas y enfriadas, galactosiladas (modificadas) tienen función hemostática *in vitro* e *in vivo*. Las plaquetas enfriadas no son "activadas" en el sentido de las plaquetas estimuladas con agonistas. Los pacientes que sufren cirugía en condiciones hipotérmicas pueden desarrollar trombocitopenia, o mostrar graves alteraciones post-operatorias hemostáticas. Se cree, que en estas condiciones hipotérmicas, las plaquetas pueden perder su funcionalidad. Sin embargo, cuando los pacientes sufren cirugía

hipotérmica, todo el organismo se expone a hipotermia, conduciendo por lo tanto a cambios en múltiples tejidos. La adhesión de plaquetas no enfriadas a células endoteliales sinusoidales hepáticas es un mecanismo importante de lesión de conservación de frío (Takeda, et al. *Transplantation* 27, 820-828, 1999). Por lo tanto, es probable que sea la interacción entre endotelio hepático frío y las plaquetas, y no el enfriamiento de las plaquetas *per se*, lo que conduzca a consecuencias perniciosas en condiciones hipotérmicas de cirugía o trasplante de órganos conservados en frío (Upadhyay et al, *Transplantation* 73, 1764-1770, 2002). Dos enfoques mostraron que las plaquetas enfriadas tienen función hemostática. En un enfoque, la circulación de plaquetas enfriadas en ratones con deficiencia de $\alpha\text{M}\beta 2$ facilita estudios de función plaquetaria tras el enfriamiento. En el otro enfoque, se ensayó la función de las plaquetas modificadas enfriadas y (presumiblemente) circulantes.

Las plaquetas humanas y murinas no modificadas y modificadas (galactosiladas) enfriadas se ensayaron para determinar la funcionalidad, incluyendo la agregación *in vitro* a agonistas, exposición a selectina P y unión a fibrinógeno.

Los ratones con deficiencia de $\alpha\text{M}\beta 2$ o WT se transfundieron con plaquetas murinas enfriadas/RT, modificadas o no, y se dejó que circularan durante 30 min., 2 y 24 horas. Se determinó si las plaquetas enfriadas contribuyen a las reacciones de coagulación provocadas por el sangrado de la vena de la cola, y si estas plaquetas se unen a agentes tales como fibrinógeno tras la activación. También se determinó cómo las plaquetas enfriadas, modificadas o no, contribuyen a la coagulación en mesenterios de ratón exteriorizados y lesionados con cloruro férrico, un modelo de formación de trombo *in vivo* que desarrollamos. Este método detecta el número de plaquetas adherentes a vasos lesionados, y ha documentado interacciones de la pared de vasos de plaquetas alteradas de plaquetas que carecen de la función de glucoproteína V o $\beta 3$ -integrina (Ni et al., *Blood* 98, 368-373 2001; Andre, et al. *Nat Med* 8, 247-252, 2002). Finalmente, se determinaron los parámetros de almacenamiento de las plaquetas modificadas.

La función plaquetaria *in vitro* se compara usando agregación con trombina y ADP, y unión de vWf inducida por botrocetina a plaquetas murinas. Las plaquetas enfriadas murinas y humanas modificadas (galactosiladas) o las plaquetas no modificadas se normalizan hasta una concentración plaquetaria de $0,3 \times 10^9/\text{mm}^3$, y se induce la agregación usando los diversos agonistas según protocolos estándar (Bergmeier, et al. 2001 276, 25121-25126, 2001). Para estudiar la unión de vWf, se activó vWf murino usando botrocetina, y se analizó la unión de vWf marcado fluorescentemente a plaquetas enfriadas modificadas o no en PRP (Bergmeier, et al. 2001 276, 25121-25126, 2001). Para evaluar si la desgranulación de las plaquetas se produce durante la modificación, también se midió la exposición a selectina P de las plaquetas murinas humanas enfriadas, modificadas o no, usando anticuerpos anti-selectina P marcados fluorescentemente, mediante citometría de flujo (Michelson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 93, 11877-11882, 1996).

10^9 plaquetas marcadas con CMFDA se transfundieron en ratones, verificando primero que estas plaquetas son funcionales *in vitro*. Se determinó si las plaquetas enfriadas contribuyen a la agregación transfundiéndose plaquetas marcadas con CMFDA enfriadas o a temperatura ambiente en ratones con deficiencia de $\alpha\text{M}\beta 2$. A 30 min., 2 horas y veinticuatro horas después de la infusión de las plaquetas, se llevó a cabo un ensayo de sangrado estándar de la vena de la cola (Denis, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 9524-9529, 1998). La sangre que sale se fija inmediatamente en formaldehído al 1%, y la agregación plaquetaria se determina mediante citometría de flujo de sangre completa. Los agregados plaquetarios aparecen como partículas de mayor tamaño en el análisis de gráfica de puntos. Para verificar que las plaquetas transfundidas no se agregan en la circulación normal, también se sangraron los ratones a través del plexo ocular retroorbital en un anticoagulante. Las plaquetas no forman agregados en estas condiciones de sangrado. La sangre que sale se fija inmediatamente, y las placas se analizan mediante citometría de flujo en sangre completa como se describe anteriormente. Las plaquetas se identifican a través de la unión de un anticuerpo monoclonal específico de $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ conjugado con ficoeritrina. Las plaquetas infundidas en la muestra de sangre son identificadas por su fluorescencia de CMFDA. Las plaquetas no infundidas se identifican por su falta de fluorescencia de CMFDA (Michelson, et al, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 93, 11877-11882, 1996). Se lleva a cabo el mismo conjunto de ensayos con plaquetas enfriadas modificadas con CMFDA (galactosiladas), transfundiéndose estas plaquetas en $\alpha\text{M}\beta 2$ y en WT. Este experimento evalúa la agregación de plaquetas enfriadas, modificadas o no, en sangre desprendida.

Se transfundieron 10^9 plaquetas marcadas con CM-naranja, no modificadas, enfriadas o a temperatura ambiente, en ratones con deficiencia de $\alpha\text{M}\beta 2$, para verificar que estas plaquetas son funcionales *in vitro*. A 30 min., 2 horas y veinticuatro horas después de la infusión de las plaquetas marcadas con CM-naranja, se aísla PRP como se describe, y se analiza mediante citometría de flujo. La exposición a selectina P se mide usando un anticuerpo anti-selectina P conjugado con FITC (Berger, et al, *Blood* 92, 4446-4452, 1998). Las plaquetas no infundidas se identifican por su falta de fluorescencia de CM-naranja. Las plaquetas infundidas en la muestra de sangre se identifican por su fluorescencia de CM-naranja. Las plaquetas positivas a CM-naranja y a selectina P aparecen como plaquetas teñidas fluorescentemente (CM-naranja/FITC) doblemente positivas. Para verificar que las plaquetas enfriadas todavía se exponen a selectina P tras la activación con trombina, se activa PRP mediante la adición de trombina (1 U/ml, 2 min. a 37°C), y la exposición a selectina P se mide como se describió. Para analizar la unión de fibrinógeno a $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, se activaron plaquetas aisladas mediante la adición de trombina (1 U/ml, 2 min. a 37°C) y se

añadió fibrinógeno acoplado a verde Oregón (20 µg/ml) durante 20 min. a 37°C (Heilmann, et al, *Cytometry* 17, 287-293, 1994). Las muestras se analizan inmediatamente mediante citometría de flujo. Las plaquetas infundidas en la muestra de PRP se identifican por su fluorescencia de CM-naranja. Las plaquetas positivas a CM-naranja y verde Oregón aparecen como plaquetas fluorescentemente teñidas (CM-naranja/verde Oregón) positivas dobles. Se llevaron a cabo los mismos conjuntos de experimentos con plaquetas enfriadas modificadas (galactosiladas) marcadas con CM-naranja transfundidas en ratones con deficiencia de $\alpha M\beta 2$ y ratones WT.

Ejemplo 6 (comparativo)

Modelo de trombosis in vivo

En primer lugar, se muestra el suministro de plaquetas a RT y de plaquetas enfriadas no modificadas a endotelio lesionado de ratones con deficiencia de $\alpha M\beta 2$ usando plaquetas marcadas fluorescentemente dobles. El vaso sanguíneo en reposo se monitorizó durante 4 min., después se aplicó cloruro férrico (30 µl de una disolución 250 mM) (Sigma, St. Louis, MO) sobre la parte superior de la arteriola mediante superfusión, y la grabación de video se reanudó durante otros 10 min. Se mide la velocidad eritrocítica de la línea central (Vrbc) antes de grabar la película y 10 min. después de la lesión con cloruro férrico. La velocidad de cizallamiento se calcula basándose en la ley de Poiseuille para un fluido newtoniano (Denis, et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 9524-9529, 1998). Estos experimentos muestran si las plaquetas enfriadas tienen función hemostática normal. Se repitieron estos experimentos en ratones WT comparando plaquetas a RT y plaquetas enfriadas galactosiladas usando dos poblaciones de plaquetas marcadas fluorescentemente inyectadas en el mismo ratón, y se analizó la formación de trombos y la incorporación de ambas poblaciones de plaquetas.

Entonces se comparan *in vitro* las funciones plaquetarias y la supervivencia de las plaquetas y la actividad hemostática *in vivo* de plaquetas murinas enfriadas y enfriadas modificadas almacenadas durante 1, 5, 7 y 14 días bajo refrigeración como se describe anteriormente. Se comparan los tiempos de recuperación y de circulación de estas plaquetas almacenadas enfriadas y enfriadas modificadas, y se demuestra que: 1) la modificación mediante transferencia de galactosa sobre plaquetas murinas enfriadas es estable después de la refrigeración a largo plazo; y 2) estas plaquetas funcionan normalmente. Se realizan experimentos de supervivencia como se describe anteriormente. Se usa la unión de WGA para verificar que los restos de GlcNAc siguen cubiertos por galactosa después de los puntos de tiempo de almacenamiento más prolongado. Como ensayo final de que estas plaquetas almacenadas modificadas están funcionalmente intactas y contribuyen a la hemostasis, se transfundieron en ratones a los que se les irradió todo el cuerpo (Hoyer, et al, *Oncology* 49, 166-172, 1992). Para obtener los números suficientes de plaquetas, se inyectó a los ratones con trombopoyetina murina comercialmente disponible durante siete días para incrementar su recuento plaquetario (Lok, et al. *Nature* 369, 565-558, 1994). Las plaquetas aisladas se modifican usando el protocolo de transferencia de galactosa optimizado, se almacenaron con refrigeración, se transfundieron, y se midieron los tiempos de sangrado de la vena de la cola. Puesto que las plaquetas enfriadas no modificadas no persisten en la circulación, no es necesaria en este punto una comparación de las plaquetas enfriadas modificadas con las plaquetas almacenadas a temperatura ambiente. Las plaquetas murinas se almacenan bajo refrigeración en tubos de ensayo estándar. Si es necesaria una comparación con plaquetas murinas almacenadas a temperatura ambiente, se cambia a plaquetas de primates. En lugar de manipular recipientes de almacenamiento especiales a pequeña escala, permeables a gases, para acomodar las plaquetas de ratón, tales comparaciones son más apropiadas para primates (incluyendo seres humanos), para las cuales se han diseñado bolsas de almacenamiento a temperatura ambiente.

Ejemplo 7 (comparativo)

Galactosilación de plaquetas en un concentrado de plaquetas

Se trataron cuatro concentrados diferentes de plaquetas con concentraciones crecientes de UDP-galactosa: 400 µM, 600 µM, y 800 µM. Los futuros experimentos usarán entre 10 µM y 5000 µM de UDP-galactosa. Las medidas de la relación de unión de RCA mostraron un incremento de la galactosilación dependiente de la dosis en las cuatro muestras ensayadas (Fig. 16). Estos resultados proporcionan pruebas de que la galactosilación es posible en concentrados de plaquetas.

Se debería entender que lo anterior es meramente una descripción detallada de ciertas realizaciones preferidas. Por lo tanto, debería ser manifiesto para los expertos en la técnica que se pueden realizar diversas modificaciones y equivalentes sin separarse del espíritu y alcance de la invención. Se pretende englobar todas las citadas modificaciones en el alcance de las reivindicaciones anejas. Todas las referencias, patentes y publicaciones de patentes que se citan en esta solicitud se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Ejemplo 8 (comparativo)

Evaluación de la supervivencia in vivo de plaquetas tratadas con UDP-galactosa almacenadas en el frío

La tecnología para galactosilar plaquetas humanas con el uso del sustrato de hidrato de carbono activado UDP-

galactosa puede permitir el almacenamiento de plaquetas humanas a gran escala bajo refrigeración (4°C). Las plaquetas no tratadas almacenadas a 4°C se eliminan rápidamente de la circulación. Por el contrario, las plaquetas no tratadas almacenadas a temperatura ambiente sobreviven ~ 5-7 días tras la transfusión. El presente estudio está destinado a demostrar que las plaquetas humanas modificadas galactosiladas circulan *in vivo* cuando se infunden autológicamente en individuos.

La razón para la eliminación de las plaquetas enfriadas de la circulación se ha definido recientemente. El enfriamiento de las plaquetas provoca agrupamiento del complejo plaquetario GP1b/V/IX en la superficie de las plaquetas. El receptor de α M β 2 de integrina (CR3, Mac-1) presente en macrófagos hepáticos reconoce moléculas de GP1b α agrupadas, y las plaquetas son ingeridas por los macrófagos. El receptor de α M β 2 de integrina contiene un dominio de unión a hidrato de carbono (dominio de lectina) que es crítico para el reconocimiento de los restos expuestos de β -N-acetilglucosamina (β -GlcNAc) sobre la superficie de las plaquetas mediante macrófagos. El cubrimiento de los restos expuestos de β -GlcNAc mediante galactosilación enzimática evita el reconocimiento y la fagocitosis de las plaquetas enfriadas. Esto se ha demostrado ampliamente en un modelo de ratón, en el que las plaquetas murinas enfriadas y galactosiladas tienen una supervivencia superior a la de las plaquetas almacenadas a temperatura ambiente. Los estudios *in vitro* que usan plaquetas humanas indican que también probablemente las plaquetas galactosiladas almacenadas a 4°C circulan cuando se transfunden en seres humanos.

Para determinar y demostrar que las plaquetas humanas modificadas galactosiladas sobreviven y circulan *in vivo* cuando se infunden autológicamente en individuos. Esto se determinará comparando las tasas de supervivencia de plaquetas refrigeradas (2°-8°C) radiomarcadas con o sin galactosilación con plaquetas no galactosiladas radiomarcadas, almacenadas a temperatura ambiente (22°±2°C) y en el frío (almacenadas durante 36 a 48 horas).

Lo siguiente describe un estudio de fase I en el que se determina la recuperación *in vivo* y la semivida de plaquetas galactosiladas infundidas autológicamente en sujetos normales de un grupo de voluntarios sanos.

Seis (6) donantes sanos donarán una unidad de plaquetas de aféresis. El producto de aféresis recogido se dividirá en dos bolsas. Una bolsa tendrá las plaquetas tratadas con UDP-galactosa y almacenadas bajo refrigeración durante 36-48 horas. La otra bolsa de plaquetas se almacenará bajo refrigeración o según las directrices actuales de la FDA a temperatura ambiente durante 36-48 horas. Las dos bolsas de plaquetas se radiomarcarán cada una con un isótopo radioactivo diferente, ⁵¹Cromo o ¹¹¹Indio, y se inyectarán 5-10 ml de las plaquetas en los voluntarios sanos. Se extraerán muestras de sangre antes y 2 horas después de la transfusión, y después en los días 1, 2, 3, 5, 7 y 10 después de la reinfusión, y se determinará la recuperación post-transfusión y la supervivencia de las plaquetas.

El material experimental inyectado en los voluntarios sanos será alícuotas de 5-10 ml de plaquetas que se han tomado de los sujetos del estudio, con o sin modificación mediante galactosilación, y almacenadas a temperatura ambiente (22 ± 2°C) o almacenadas en frío (4 ± 2°C).

Al confirmar la idoneidad y la participación en el estudio, los donantes sanos se reclutarán para donar una unidad de plaquetas en la máquina de aféresis Haemonetics MCS+. Esta máquina extrae sangre completa de un brazo del donante, centrifuga la sangre para separar las plaquetas del plasma y los glóbulos rojos, recoge las plaquetas con una pequeña cantidad de plasma, y devuelve la mayoría del plasma y de los glóbulos rojos nuevamente al donante. Las plaquetas y plasma recogidos se dividirán en dos bolsas. Cada bolsa se pesará, y el recuento plaquetario se determinará en el día de la recogida, día 1 y día de la infusión. Tras la recogida, las plaquetas se dejarán en reposo durante 1 hora. Después del período de reposo, una bolsa de plaquetas se tratará con una sustancia de azúcar de origen natural, UDP-galactosa. Esta bolsa se incubará durante 1 hora a 37°C, y se almacenará bajo refrigeración. La otra bolsa de plaquetas se incubará igualmente durante 1 hora a 37°C y se almacenará bajo refrigeración o según las directrices actuales de la FDA a temperatura ambiente. En el día 1 después de la recogida, se enviará una muestra de cada bolsa a un laboratorio de microbiología para el cultivo.

Los resultados del cultivo plaquetario se registrarán junto con los resultados de una muestra de tinción gram que se enviará al laboratorio en el día de la reinfusión. Si cualquiera de los informes es positivo, las unidades de plaquetas no se reinfundirán. Las dos bolsas de plaquetas se radiomarcarán cada una con un isótopo radioactivo diferente, ⁵¹Cromo o ¹¹¹Indio. Las muestras de sangre se extraerán antes y 2 horas después, y después en los días 1, 2, 3, 5, 7 y 10 después de la reinfusión. Las muestras de sangre se analizarán en busca de radioactividad para determinar la recuperación post-transfusión y supervivencia de las plaquetas. Puesto que las dos unidades de plaquetas se han marcado con diferentes isótopos radioactivos, seremos capaces de distinguir entre las plaquetas que se sometieron a la UDP-galactosa y aquellas que no fueron tratadas.

La UDP-galactosa (uridin-5'-difosfogalactosa) es un compuesto de azúcar natural encontrado en el organismo humano. Se usa en este estudio como un donante para la adición de galactosa a la superficie de las plaquetas humanas a transfundir. La UDP-galactosa se fabricó por Roche Diagnostics GmbH, y tiene una pureza de alrededor de 97%. Contiene cantidades en trazas de subproductos del proceso de fabricación. Se formuló y se introdujo en jeringuillas mediante una instalación de llenado autorizada, y se ensayó para determinar la esterilidad y

pirogenicidad.

Las muestras de sangre tomadas de cada sujeto del estudio se ensayarán para determinar el recuento plaquetario y anticuerpos anti-plaquetas antes y a las dos semanas y tres meses después de la infusión de las plaquetas.

- 5 En el día 0 se inyectarán entre 5 y 10 ml de plaquetas radiomarcadas con los dos isótopos radioactivos diferentes, ⁵¹Cromo o ¹¹¹Indio. Se extraerán muestras de sangre antes y a las 2 horas y en los días 1, 2, 3, 5, 7 y 10 después de la reinfusión.

- 10 Durante cada reinfusión, el sujeto se monitorizará cuidadosamente en busca de reacciones adversas, lo más habitual fiebre, escalofríos, disnea, urticaria o dolor (sitio de infusión, dolor torácico u otro), o cambios significativos en los signos vitales. Además, a cada sujeto se le preguntará durante las visitas del período de seguimiento, hasta tres meses después de la infusión, información sobre cualquier aparición de efectos adversos durante ese tiempo. Las plaquetas modificadas y no modificadas se caracterizarán por un número de análisis in vitro, incluyendo, pero sin limitarse a: pH, pO₂, pCO₂, bicarbonato, respuesta a choque hipotónico, morfología, grado de cambio de forma, niveles de ATP, glucosa, consumo de O₂, selectina P, y unión de anexina V.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato para procesar una muestra de plaquetas, que comprende: un primer recipiente estéril que tiene uno o más puertos y que contiene una preparación de células sanguíneas que comprende plaquetas, un segundo recipiente estéril que tiene uno o más puertos y que contiene un azúcar nucleosídico que es ácido citidin-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico, estando adaptado el primer recipiente al segundo recipiente a través de un conducto estéril fijable de forma reversible al puerto del primer recipiente y al puerto del segundo recipiente, comprendiendo además el conducto una válvula, en el que el azúcar nucleosídico presente en el segundo recipiente estéril se introduce en el primer recipiente estéril y las plaquetas en la preparación de células sanguíneas allí se hacen competentes para el almacenamiento en frío después de que las plaquetas se ponen en contacto con el azúcar nucleosídico.
2. El aparato de la reivindicación 1, que comprende además un tercer recipiente estéril que tiene uno o más puertos adaptados al primer recipiente a través de un segundo conducto estéril fijable de forma reversible al puerto del primer recipiente y al puerto del tercer recipiente, comprendiendo además el conducto una válvula.
3. El aparato de la reivindicación 1 ó 2, en el que el conducto comprende además un filtro para leucocitos.
4. El aparato de la reivindicación 1 ó 2, en el que el primer recipiente, el segundo recipiente o el tercer recipiente son bolsas de sangre.
5. El aparato de la reivindicación 1 ó 2, en el que el segundo recipiente es una jeringuilla.
6. El aparato de la reivindicación 1, en el que el conducto está adaptado a un filtro en línea que tiene un diámetro medio de poros suficientemente pequeño para evitar sustancialmente el flujo de bacterias a través del filtro en línea.
7. El aparato de la reivindicación 6, en el que el filtro en línea tiene un diámetro medio de poros menor que alrededor de 0,50 micrómetros.
8. El aparato de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el puerto del segundo recipiente tiene una barrera frangible.
9. El aparato de la reivindicación 1 ó 2, en el que el primer conducto o el segundo conducto se fija reversiblemente al puerto del primer recipiente, al puerto del segundo recipiente o al puerto del tercer recipiente a través de un alojamiento estéril.
10. Un aparato para procesar una muestra de plaquetas, que comprende: un primer recipiente estéril que contiene un azúcar nucleosídico que es ácido citidin-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico y que tiene uno o más puertos, y un conjunto que comprende un conducto y una pluralidad de alojamientos estériles, en el que cada uno de los alojamientos estériles es adaptable de forma reversible a los recipientes de almacenamiento de sangre, teniendo los recipientes de almacenamiento de sangre una muestra de células sanguíneas que comprende plaquetas, y comprendiendo además al menos un puerto para conectar los alojamientos estériles del conjunto, en el que las plaquetas se introducen en el primer recipiente estéril a través del conducto y se hacen competentes para el almacenamiento en frío al poner en contacto las plaquetas con el azúcar nucleosídico presente en el primer recipiente estéril.
11. El aparato de la reivindicación 10, en el que el conjunto comprende además un filtro para leucocitos próximo al primer recipiente.
12. El aparato de la reivindicación 10, en el que el azúcar nucleosídico está contenido en el primer recipiente.
13. El aparato de la reivindicación 10, que comprende además un segundo recipiente que tiene uno o más puertos y que contiene un azúcar nucleosídico que modifica la superficie celular de las plaquetas, el primer recipiente adaptado al segundo recipiente a través de un conducto estéril fijable de forma reversible al puerto del primer recipiente y al puerto del segundo recipiente.
14. El aparato de la reivindicación 13, en el que el segundo recipiente es una jeringuilla.
15. El aparato de la reivindicación 13, en el que el conducto se adapta a un filtro en línea que tiene un diámetro medio de poros suficientemente pequeño para evitar sustancialmente el flujo de bacterias a través del filtro en línea.
16. El aparato de la reivindicación 15, en el que el filtro en línea tiene un diámetro medio de poros menor que alrededor de 0,50 micrómetros.
17. El aparato de la reivindicación 15, en el que el puerto del segundo recipiente tiene una barrera frangible.
18. Un aparato para procesar una muestra de plaquetas, que comprende: un primer recipiente estéril que tiene uno o más puertos, comprendiendo además el primer recipiente un subrecipiente colocado en él, teniendo el subrecipiente

- un puerto y una barrera frangible y conteniendo un azúcar nucleosídico que es ácido citidin-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico, y un conjunto que comprende un conducto y una pluralidad de alojamientos estériles, en el que las plaquetas se introducen en el primer recipiente estéril a través del conducto y se hacen competentes para el almacenamiento en frío después de que las plaquetas se ponen en contacto con el azúcar nucleosídico presente en el primer recipiente.
- 5 19. El aparato de la reivindicación 18, en el que el conjunto comprende además un filtro para leucocitos próximo al primer recipiente.
20. Un método para tratar una plaqueta, que comprende obtener un aparato de las reivindicaciones 1, 10 ó 18, obtener una muestra de células sanguíneas, que incluye una subpoblación de plaquetas, y exponer las plaquetas al azúcar nucleosídico, que es ácido citidin-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico, en el aparato, haciendo de ese modo a la subpoblación de plaquetas competentes para el almacenamiento en frío.
- 10 21. El método de la reivindicación 20, que comprende además separar los leucocitos de las células sanguíneas antes de exponer las plaquetas al azúcar nucleosídico.
22. El método de la reivindicación 20, en el que las plaquetas se ponen en contacto con el azúcar nucleosídico antes de la infusión de las plaquetas tratadas a un paciente.
- 15 23. El método de la reivindicación 20, en el que las plaquetas se ponen en contacto con el azúcar nucleosídico antes del almacenamiento en frío de las plaquetas.
24. El método de la reivindicación 20, en el que las plaquetas se ponen en contacto con el azúcar nucleosídico en el momento de la recogida de la sangre de un donante de sangre.
- 20 25. El método de la reivindicación 20, que comprende además separar las células sanguíneas en subpoblaciones de plaquetas, plasma, glóbulos rojos y glóbulos blancos.
26. El método de la reivindicación 25, en el que las plaquetas se ponen en contacto con el azúcar nucleosídico después de que las células de sanguíneas se han separado mediante aféresis.
27. Una plaqueta tratada obtenida mediante el método de la reivindicación 20.
- 25 28. La plaqueta tratada de la reivindicación 27, en la que las plaquetas, después del almacenamiento en frío, son adecuadas para la transfusión a un paciente.

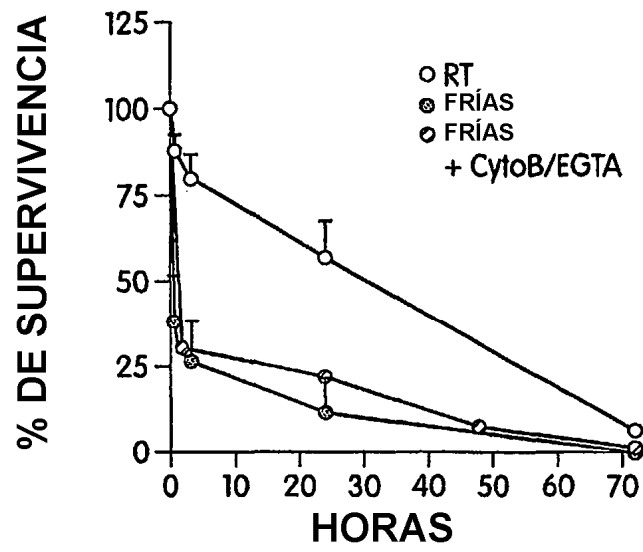


Fig. 1A

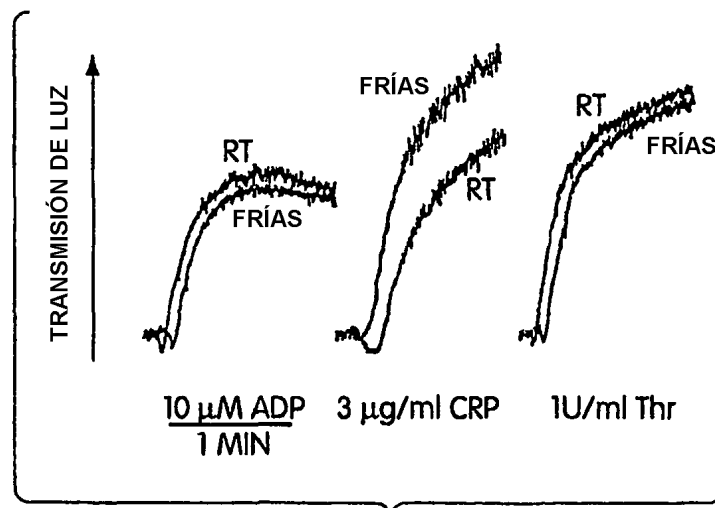


Fig. 1B

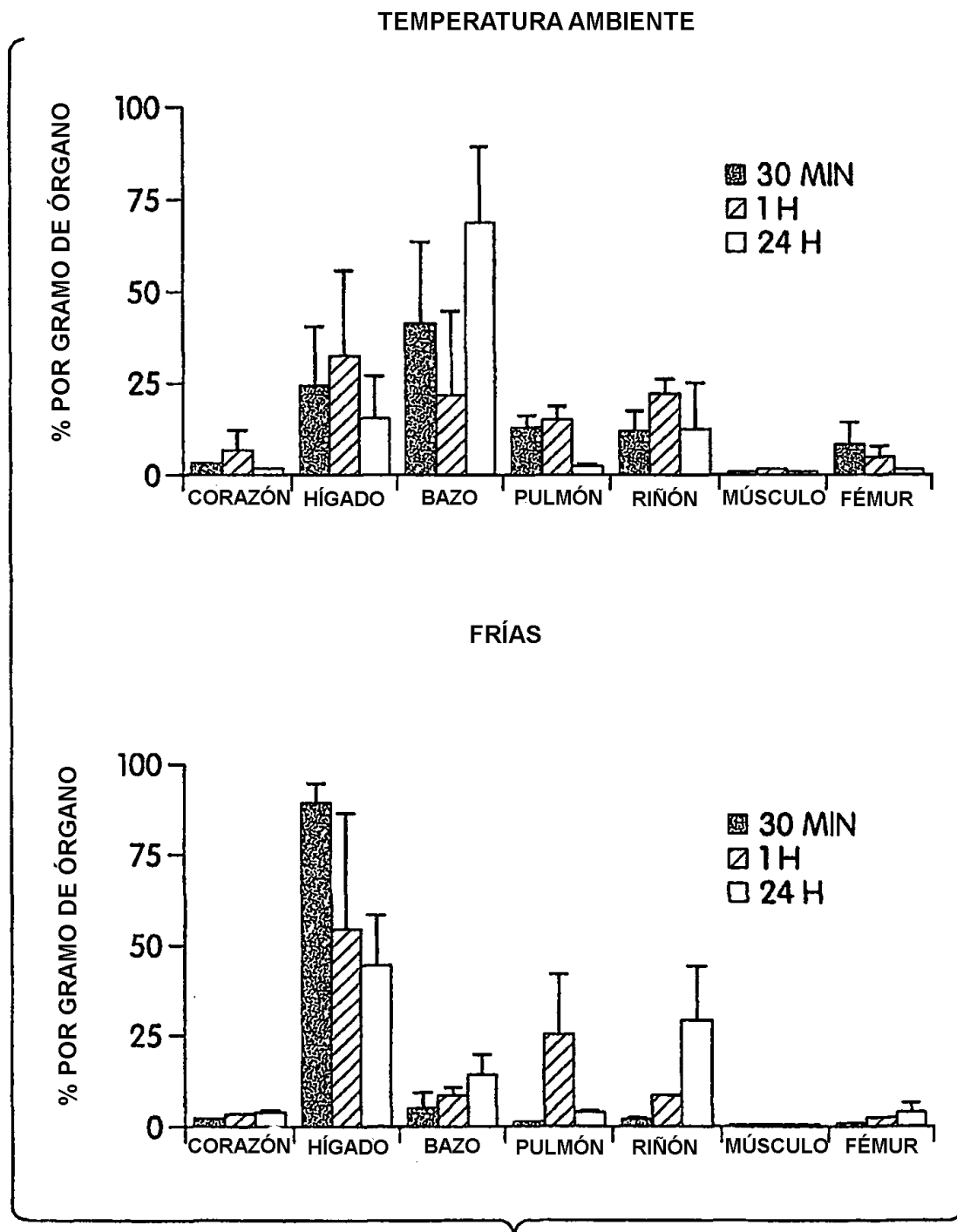


Fig. 1C

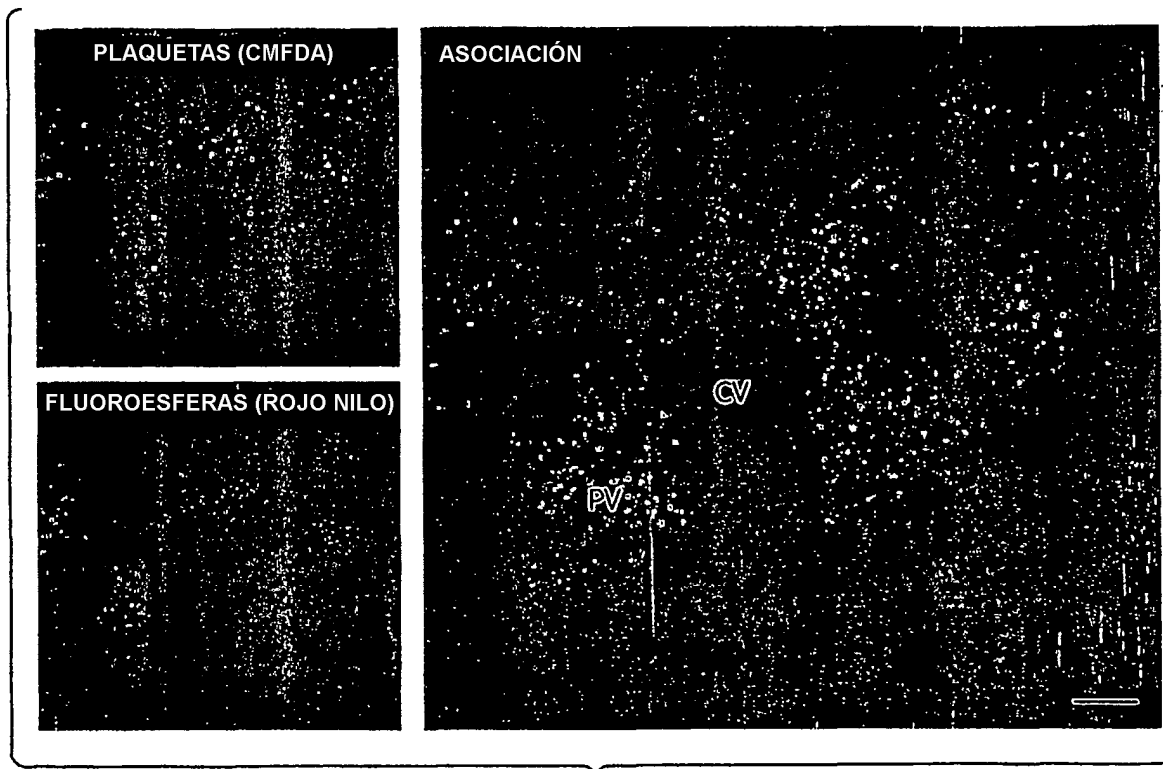


Fig. 1D

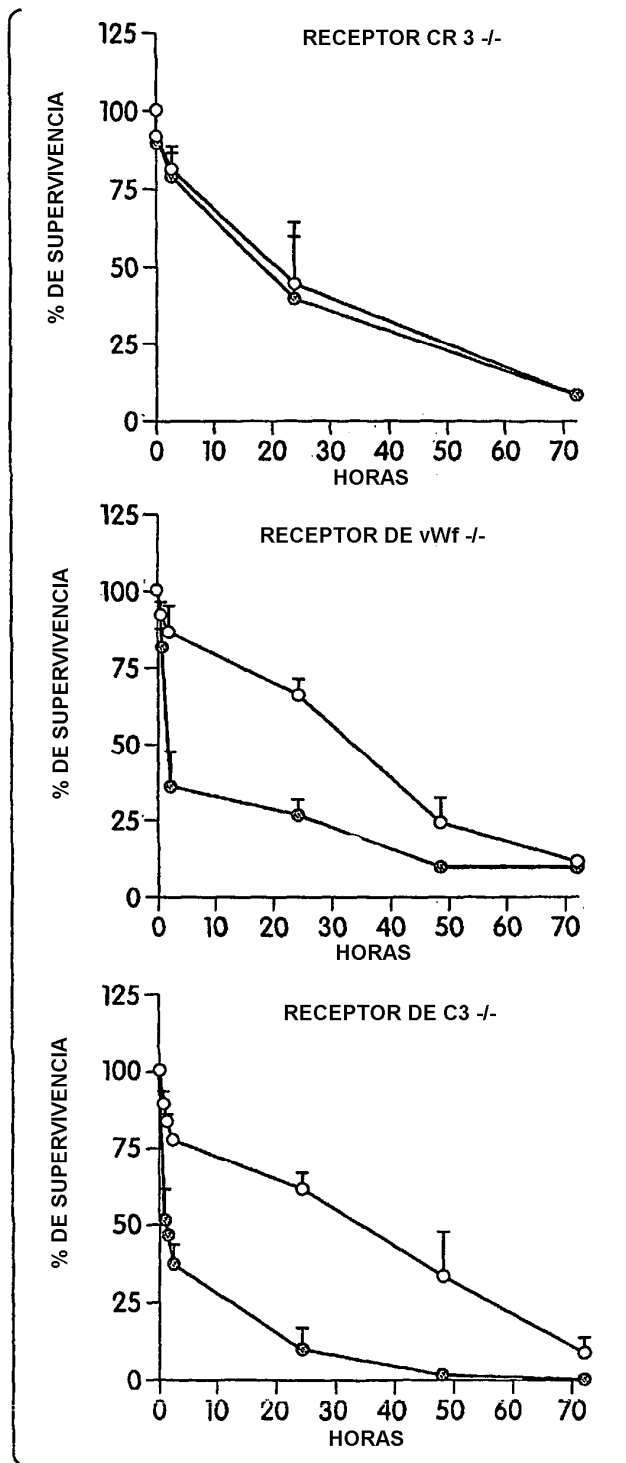


Fig. 2

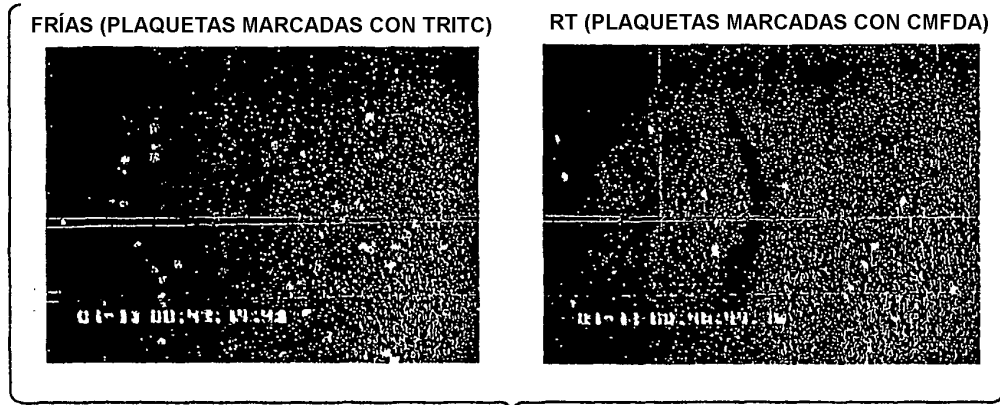


Fig. 3A

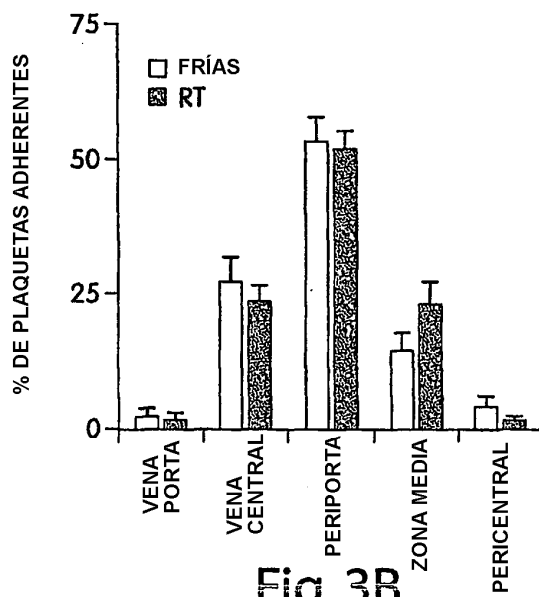


Fig. 3B

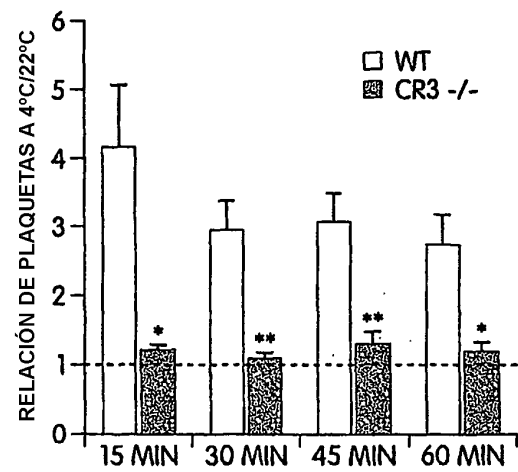


Fig. 3C

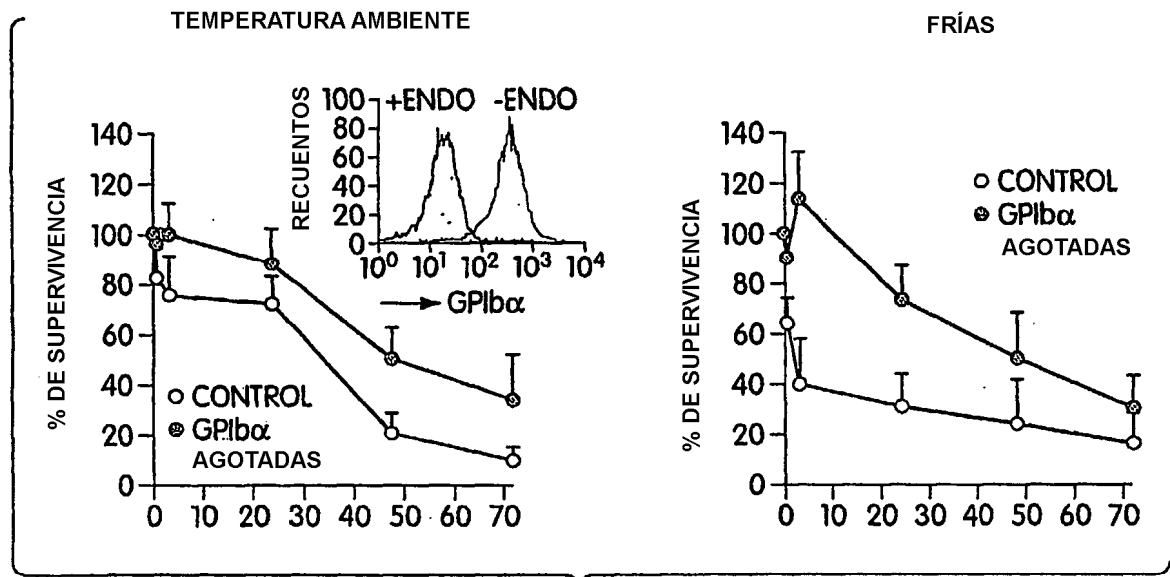


Fig. 4A

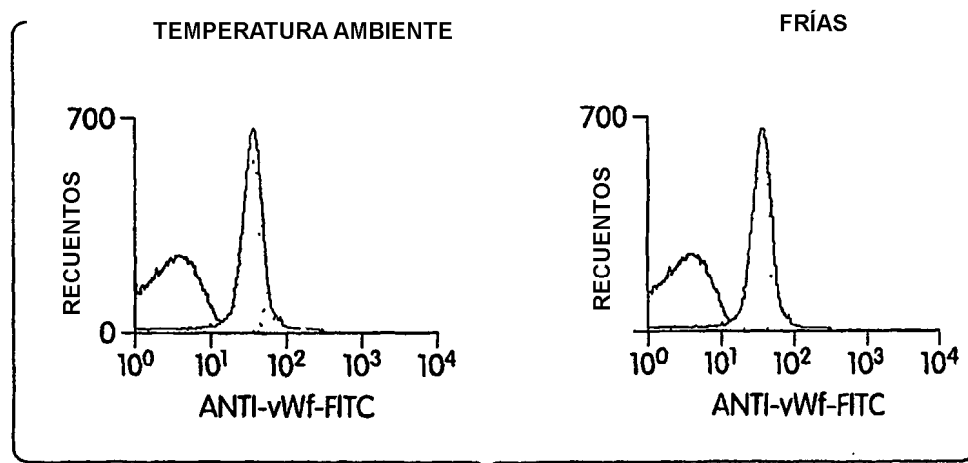


Fig. 4B

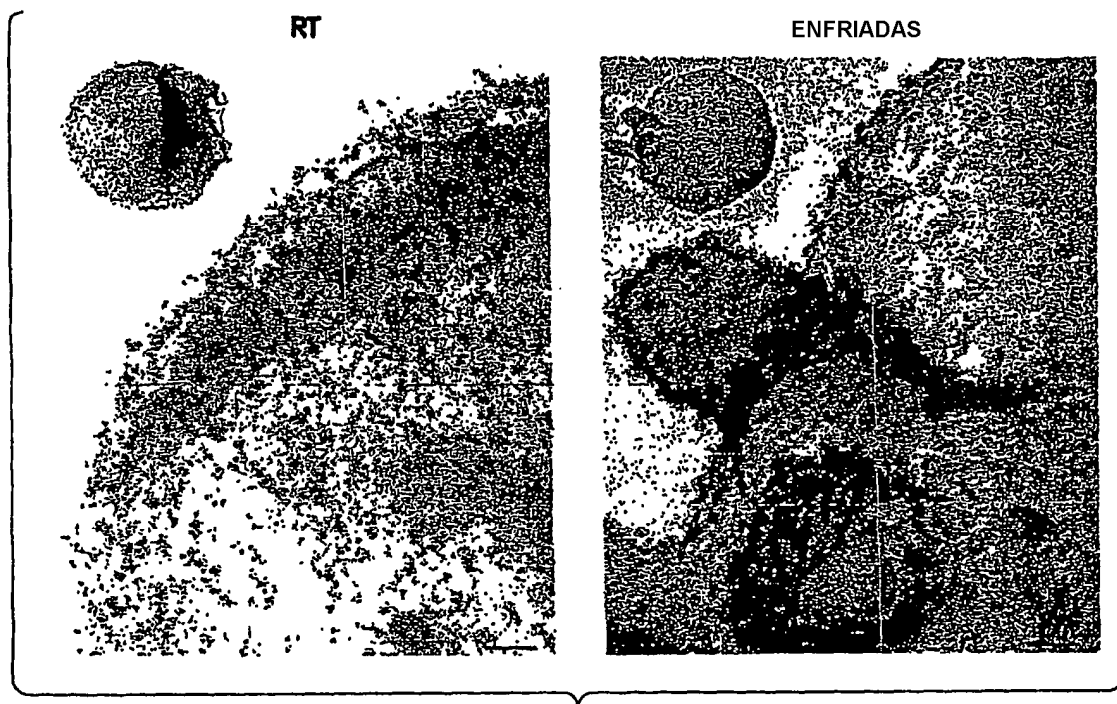


Fig. 4C

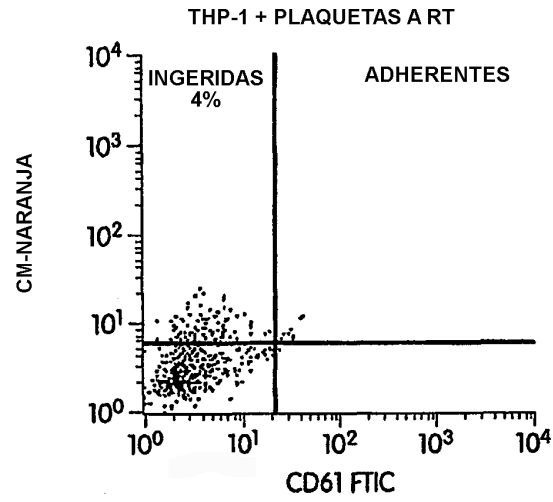


Fig. 5A

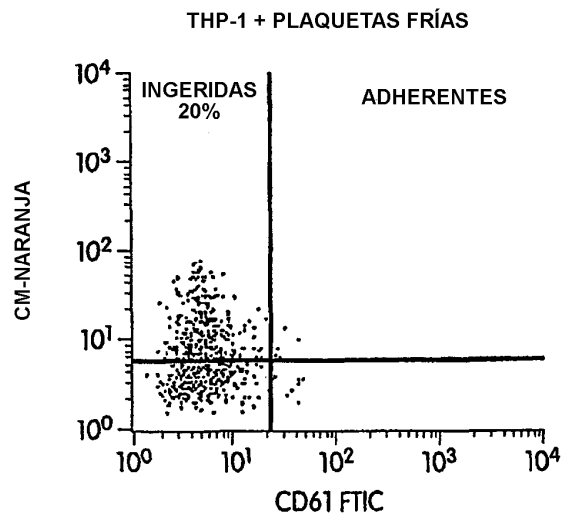


Fig. 5B

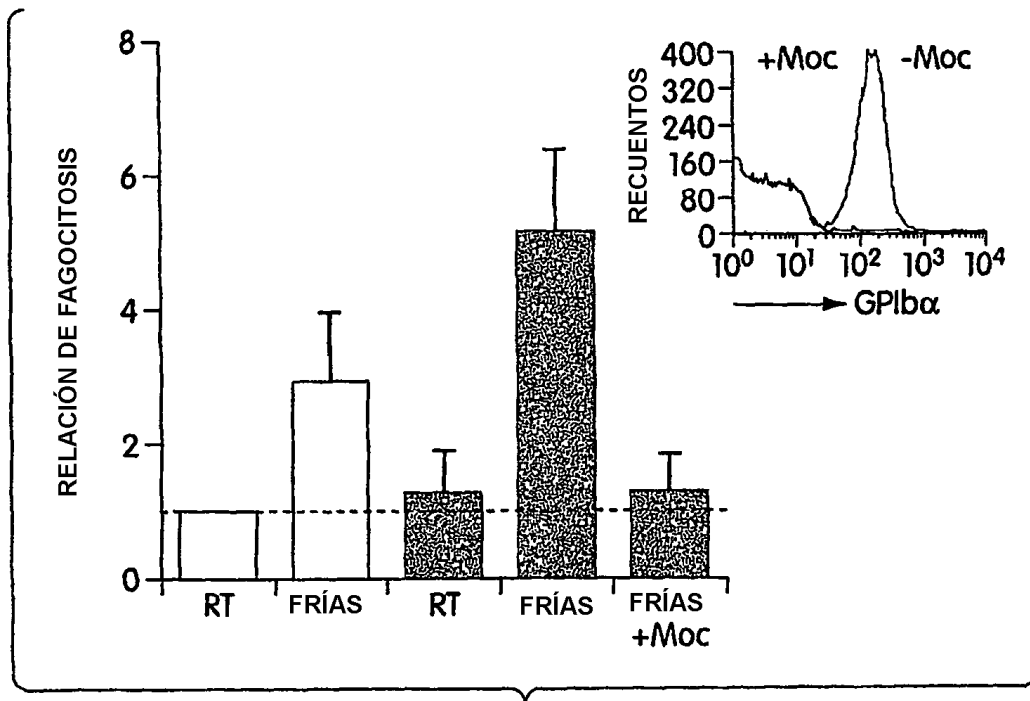


Fig. 5C

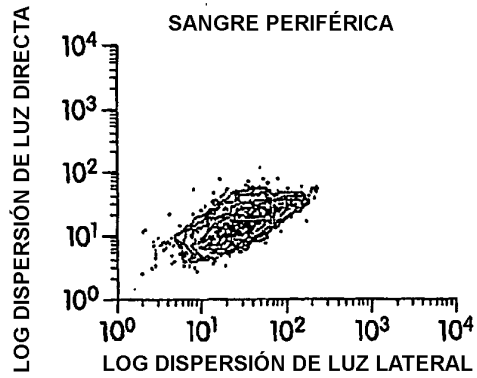


Fig. 6A

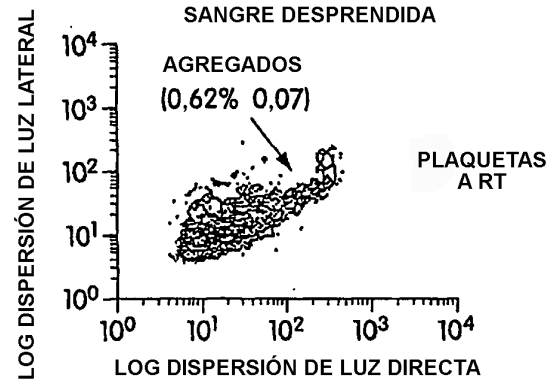


Fig. 6B

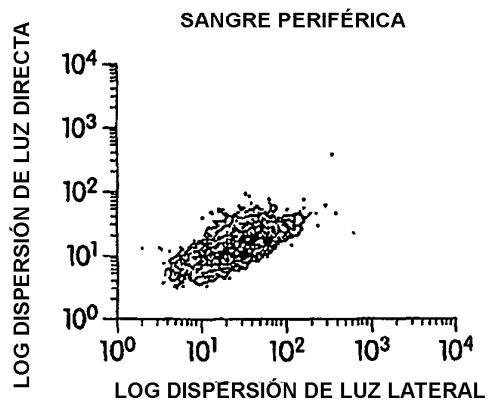


Fig. 6C

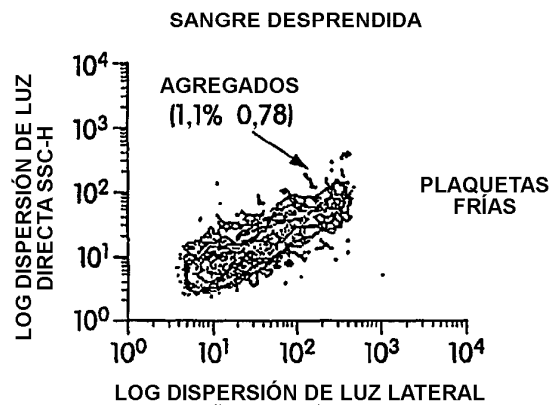


Fig. 6D

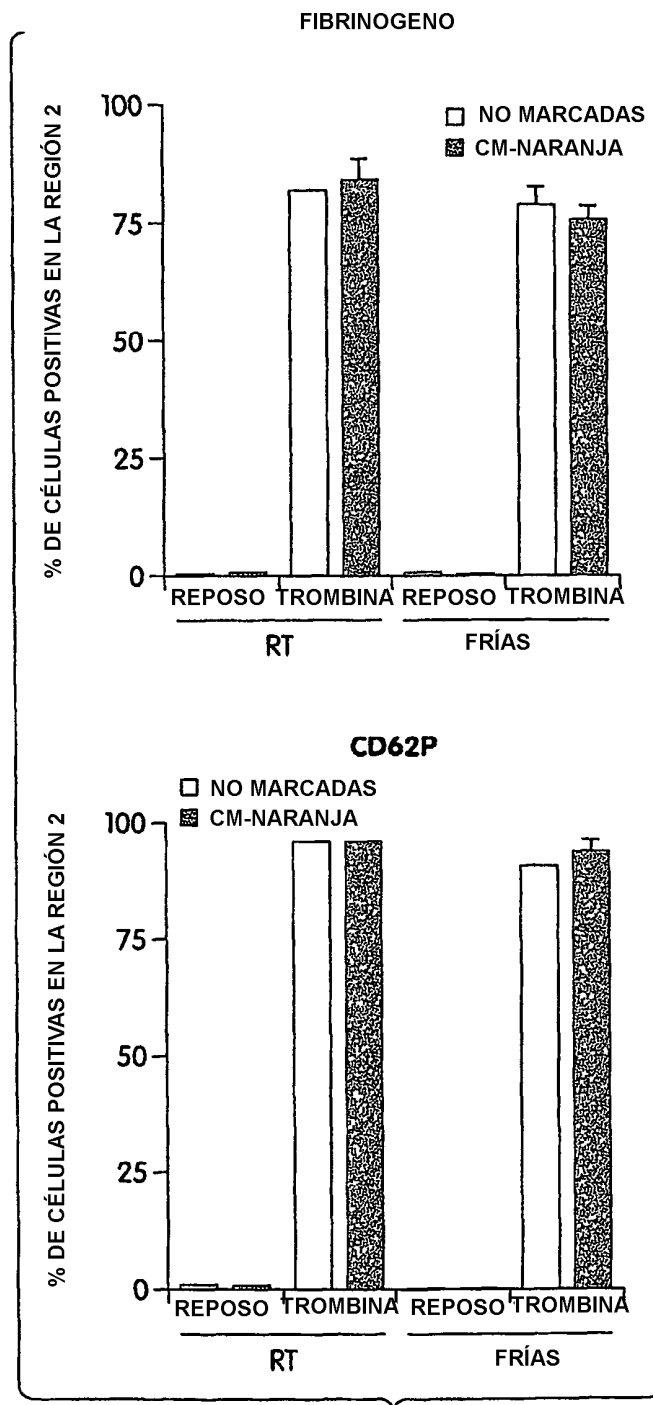


Fig. 6E

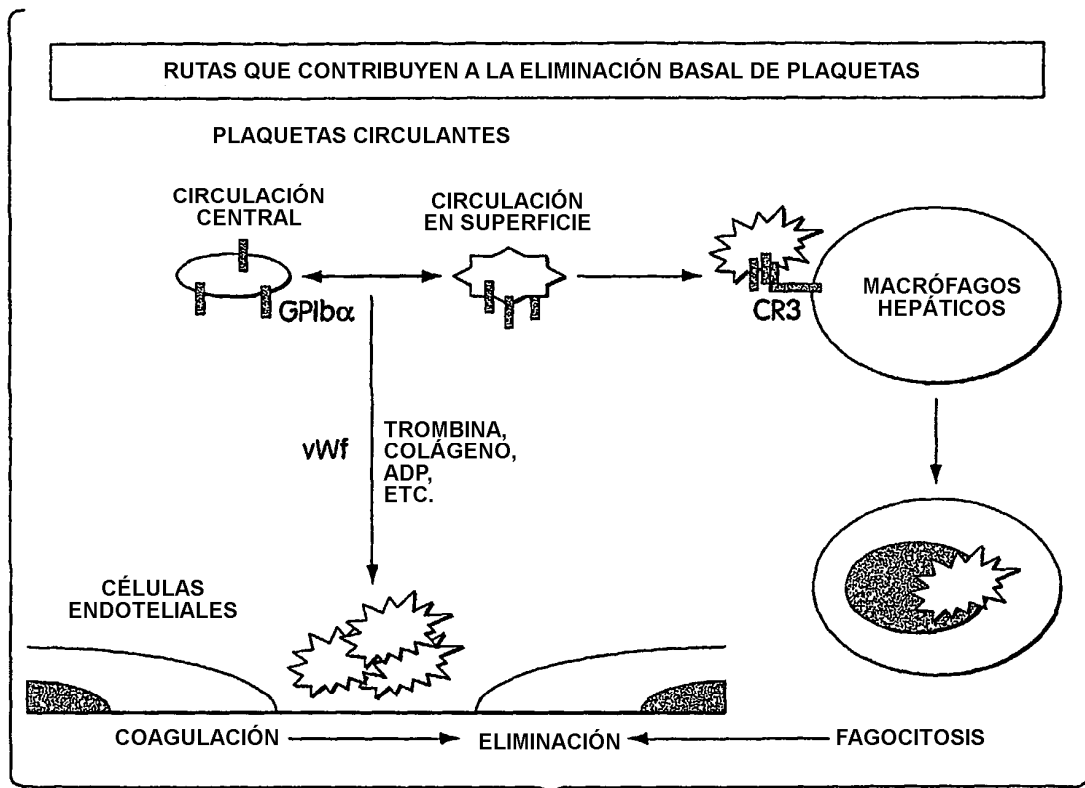


Fig. 7

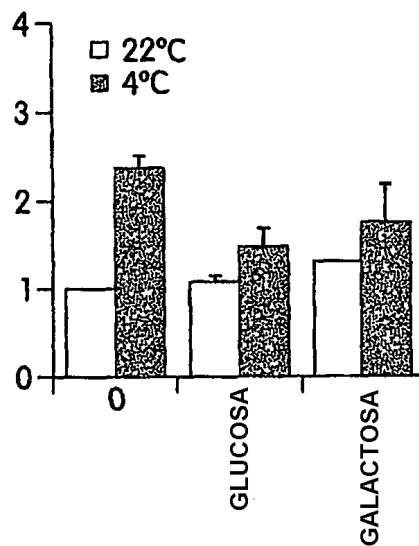


Fig. 8A

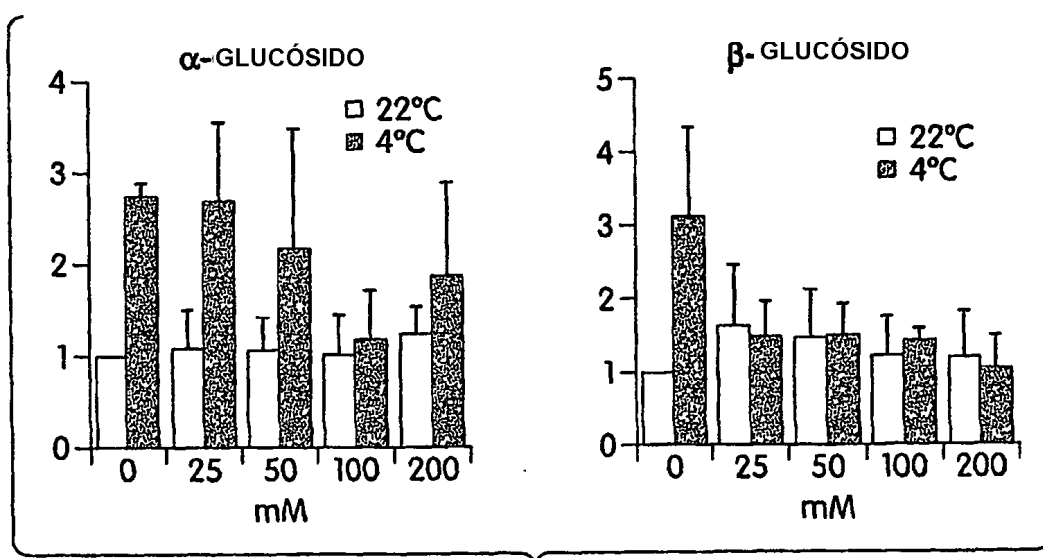


Fig. 8B

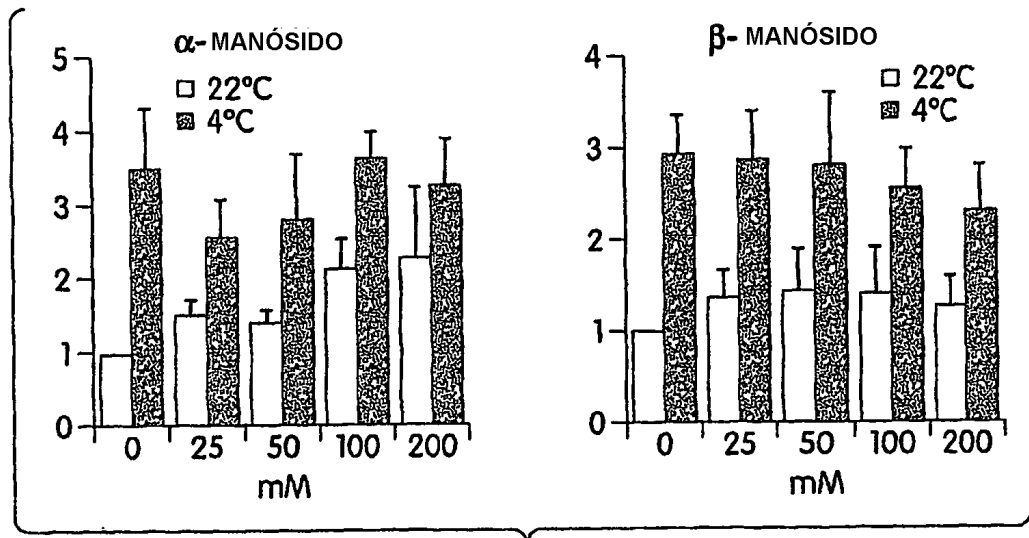


Fig. 8C

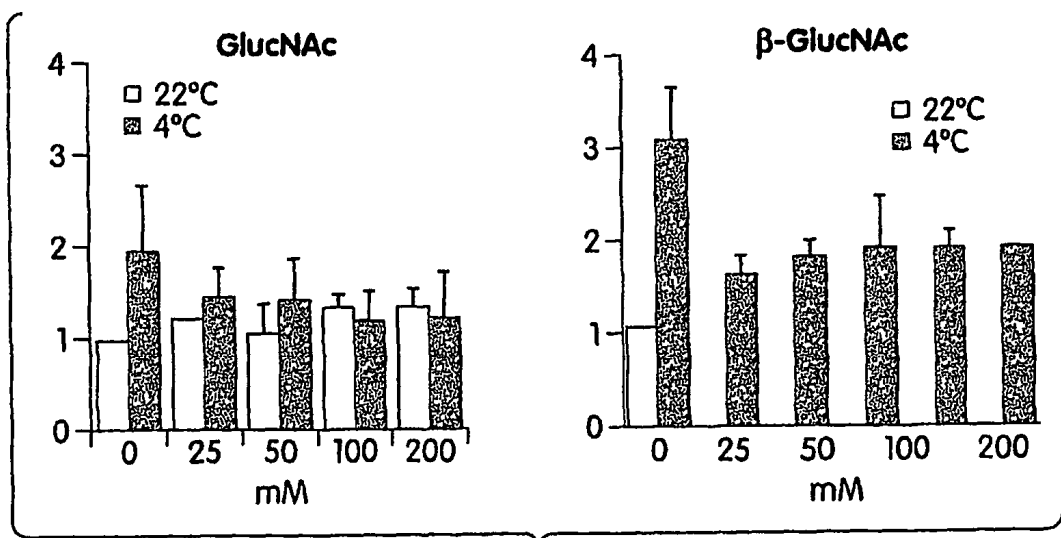


Fig. 8D

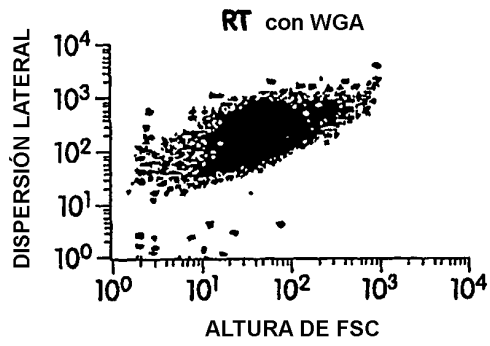


Fig. 9A

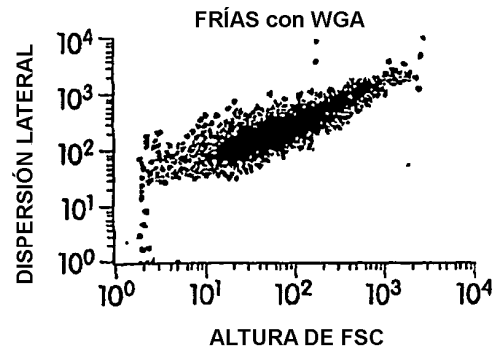


Fig. 9B

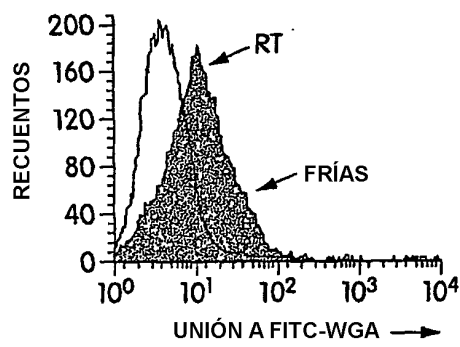


Fig. 9C

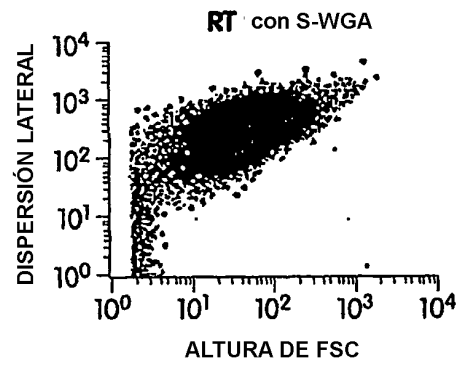


Fig. 9D

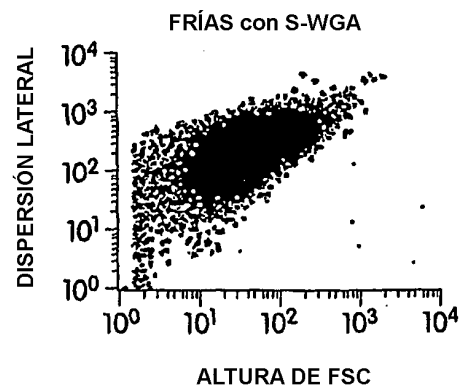


Fig. 9E

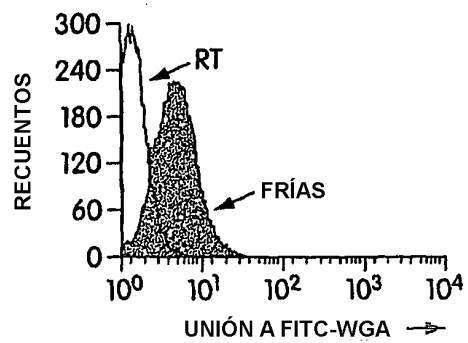


Fig. 9F

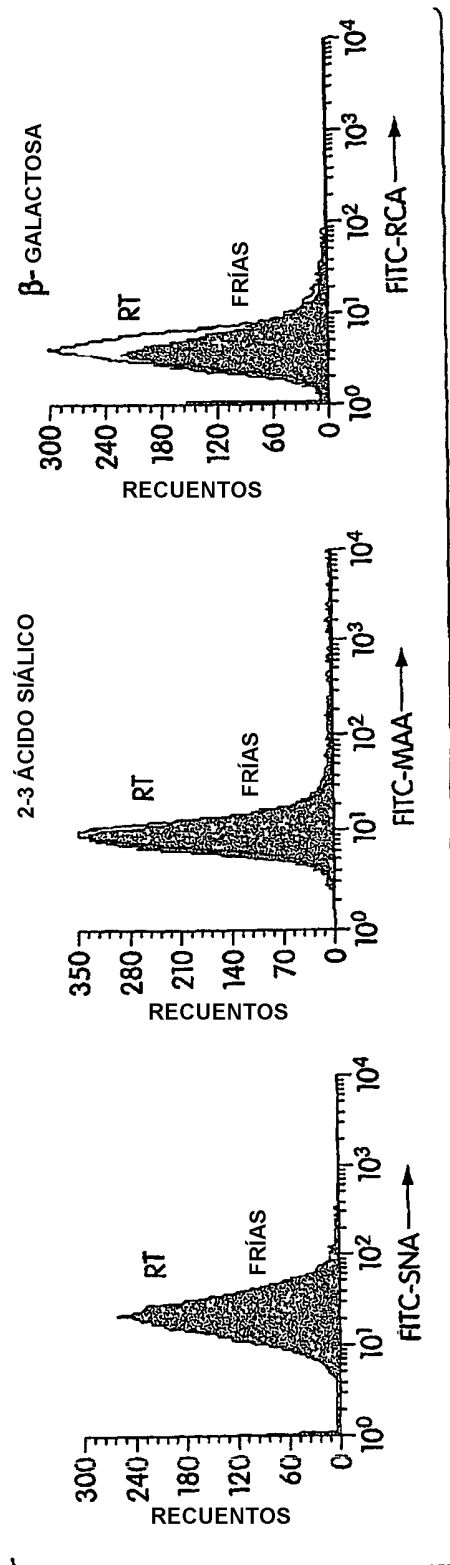


Fig. 10

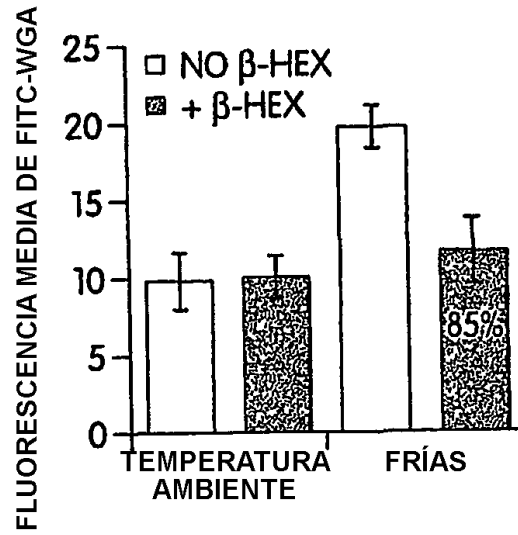


Fig. 11A

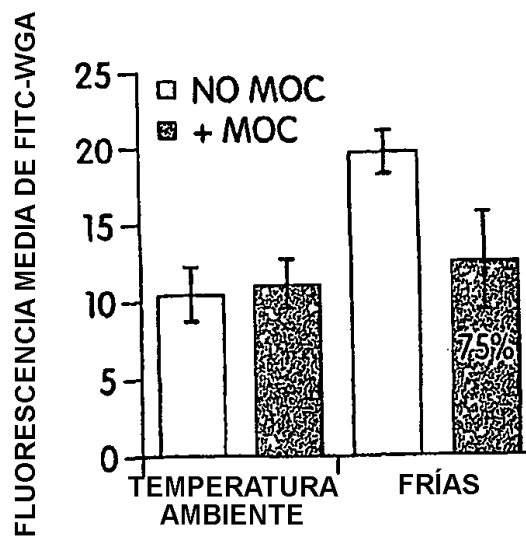


Fig. 11B

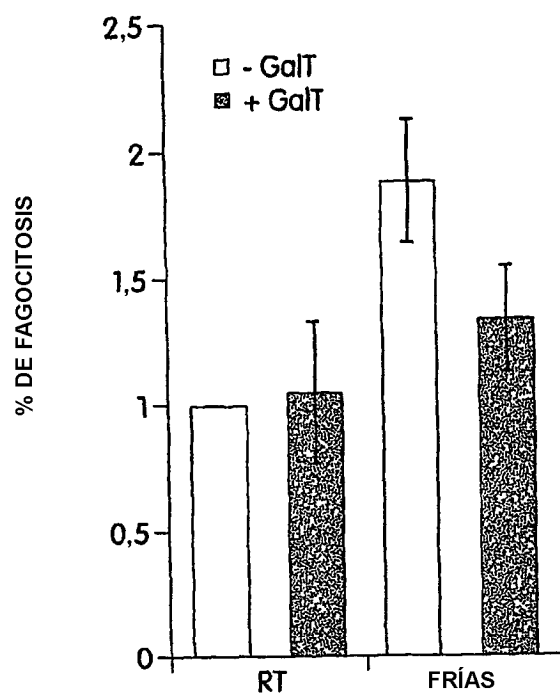


Fig. 12

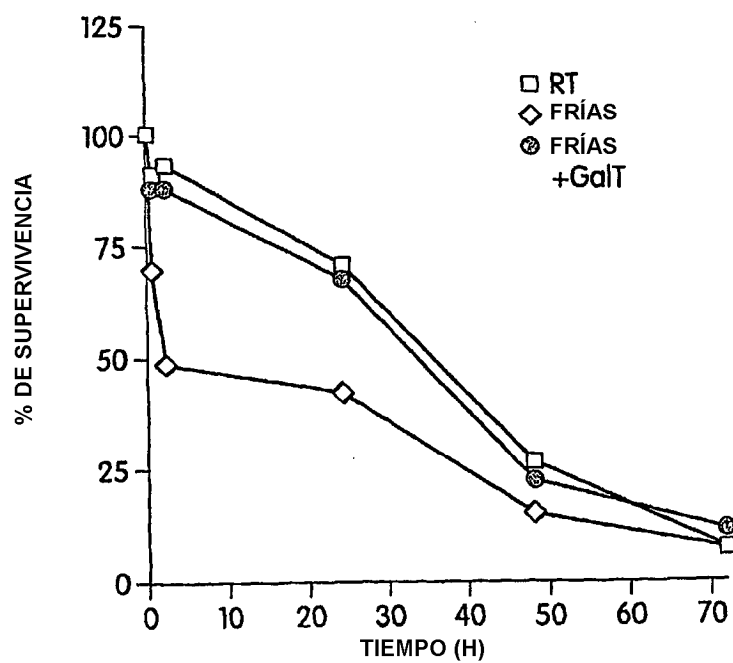


Fig. 13

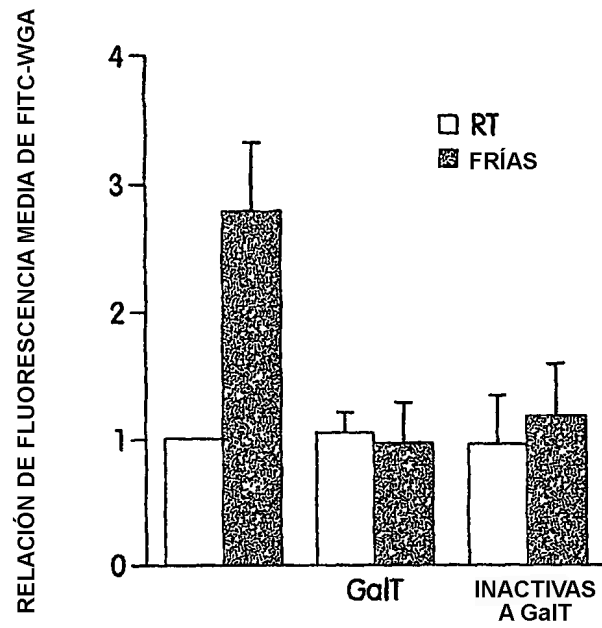


Fig. 14A

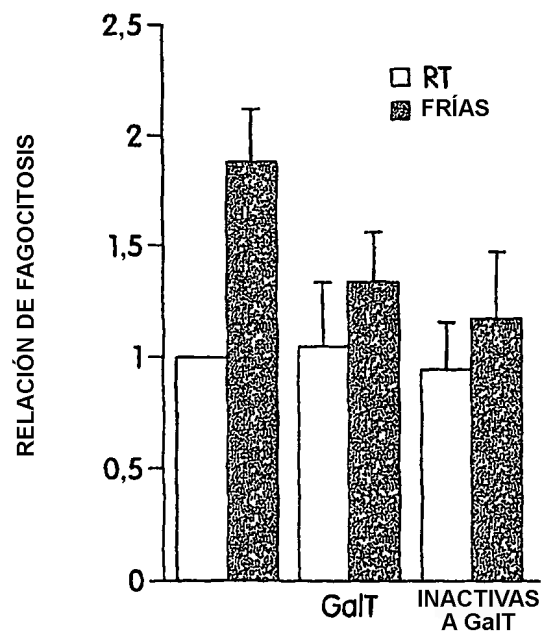


Fig. 14B

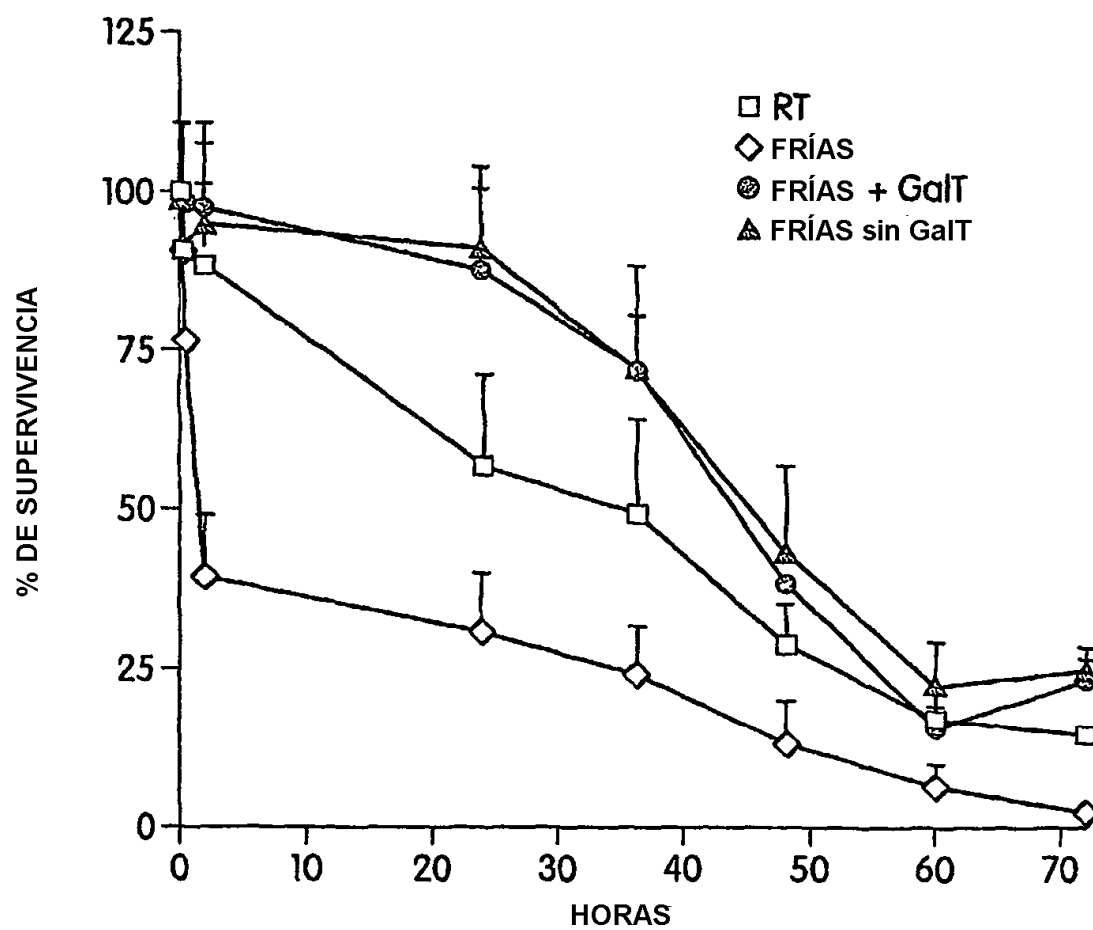


Fig. 14C

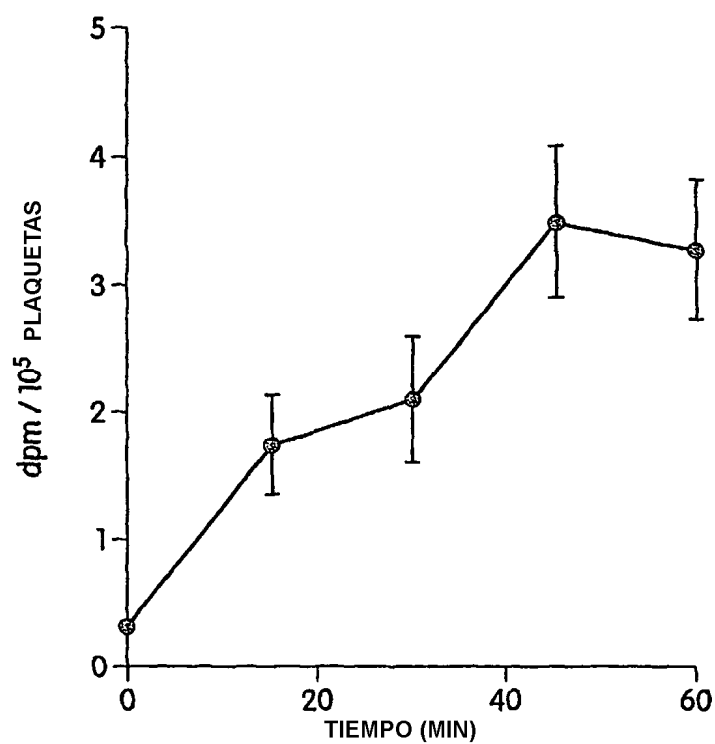


Fig. 15

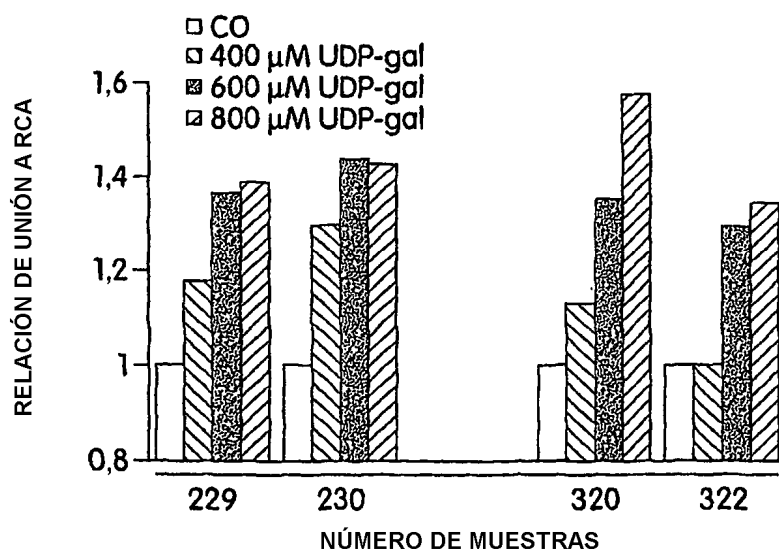


Fig. 16

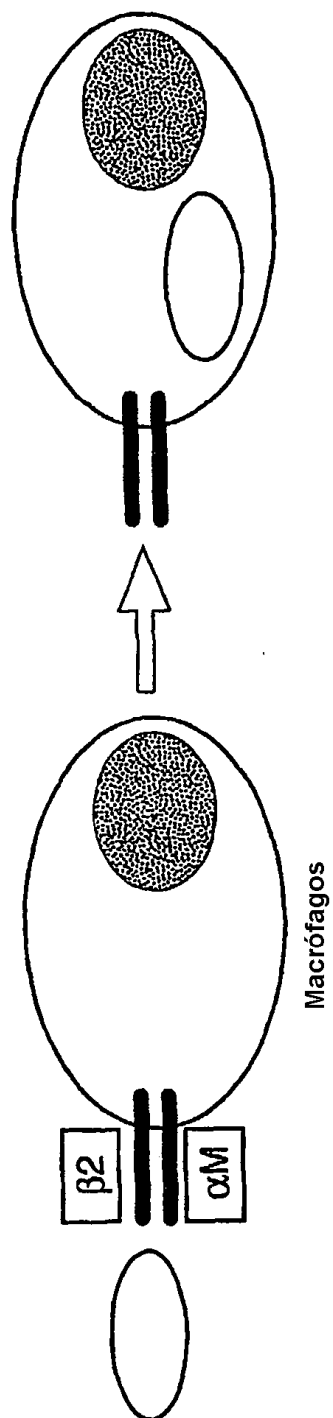


Fig. 17

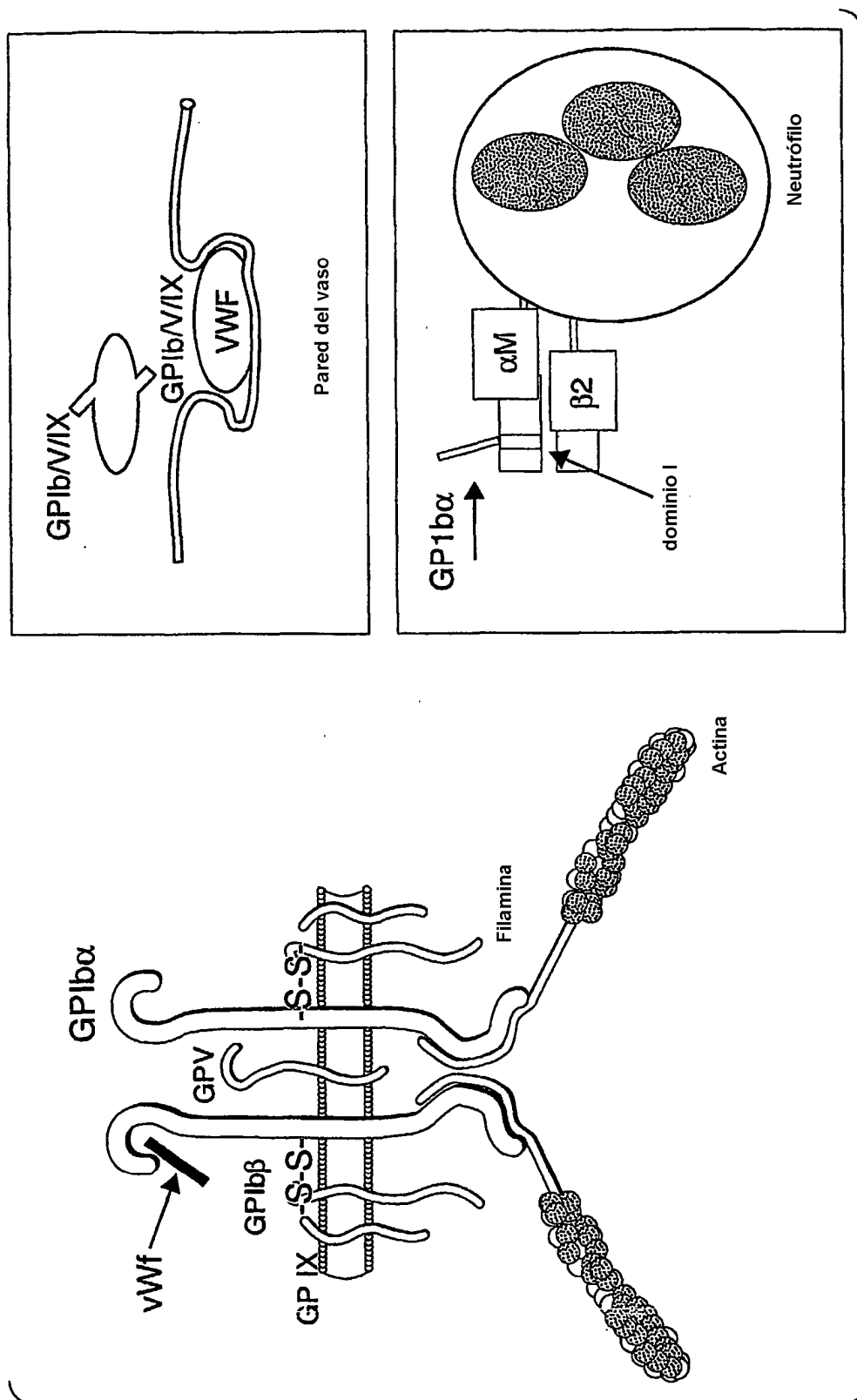


Fig. 18

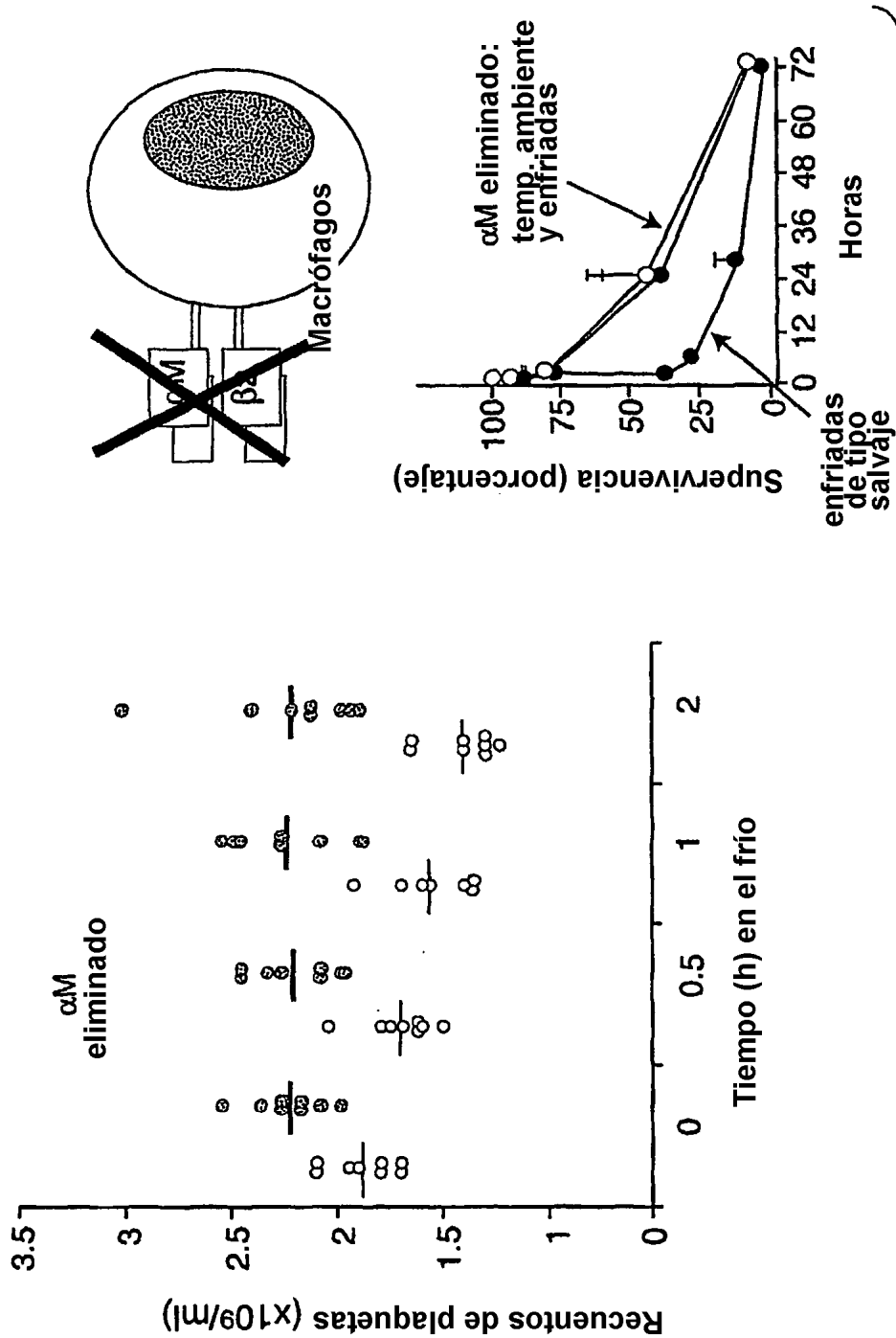
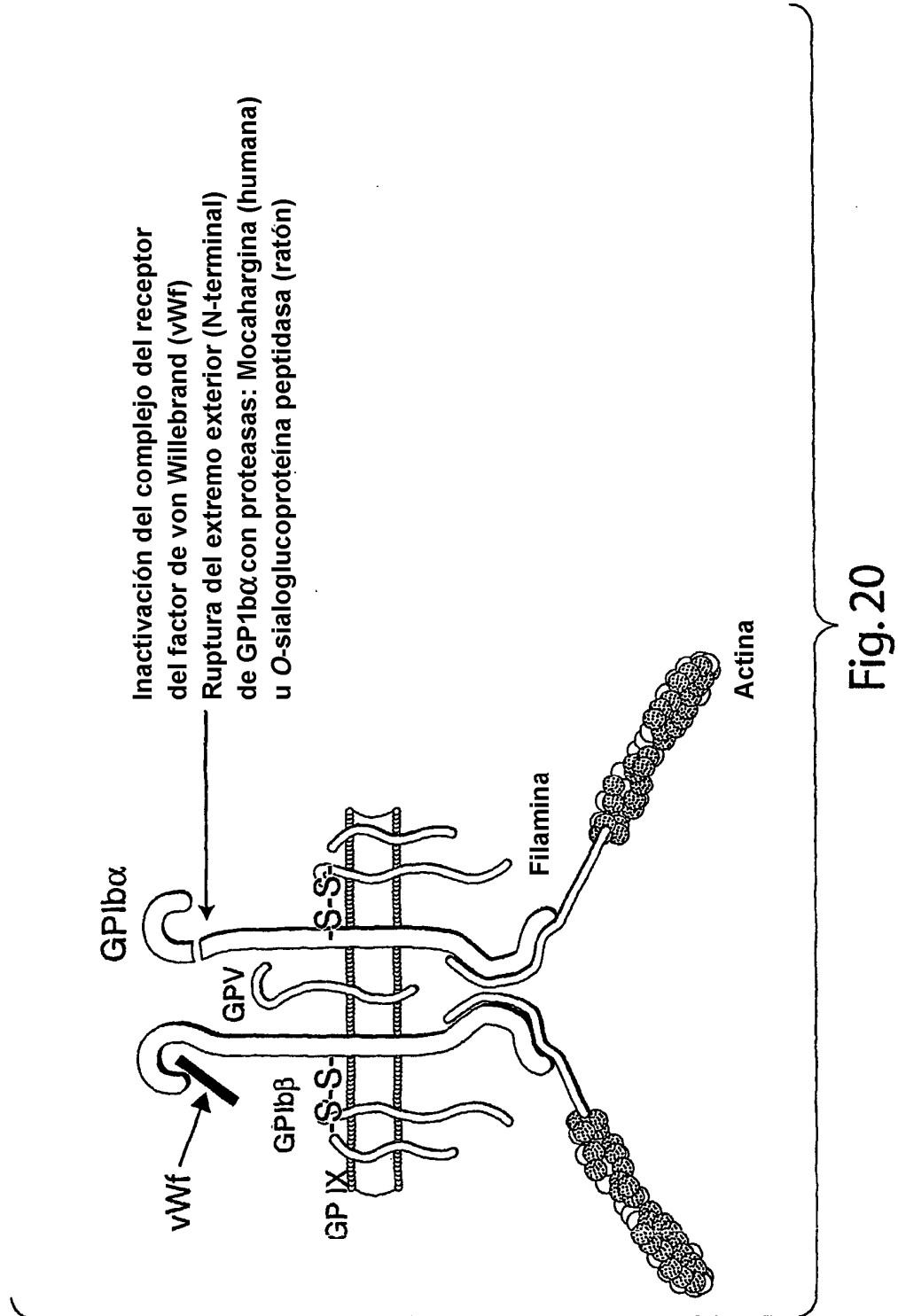


Fig. 19



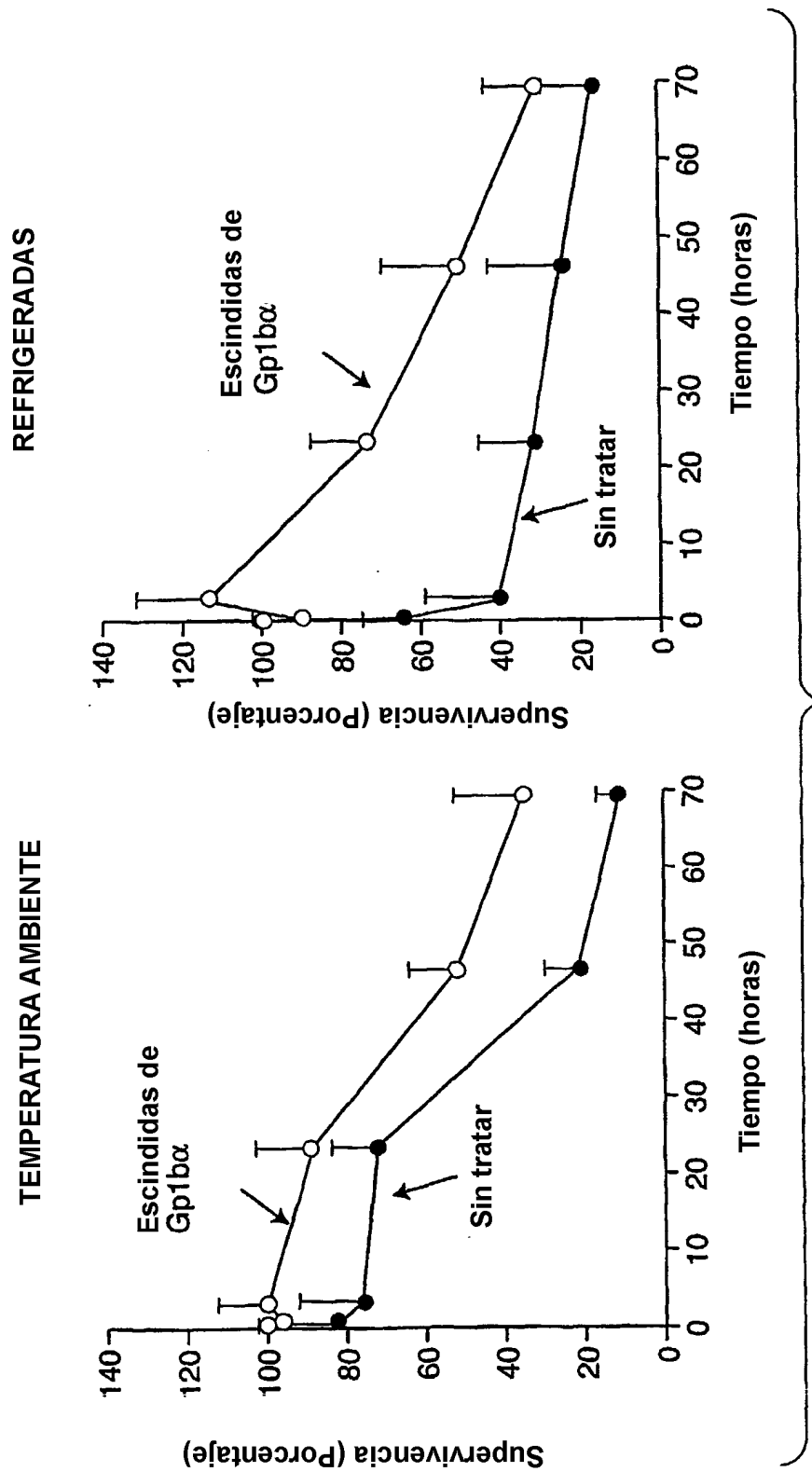


Fig. 21

Estructura primaria de α M (CD11b):

ligandos del dominio I:

iC3b
 ICAM-1 y -2
 colágeno
 fibrinógeno
 sulfato de heparano
 LPS
 Factor X
 GPIIb α

dominio de unión a azúcar:
 Zimosano
 Une azúcares(β -GlcNAc) en GPIIb α

Dominio de lectina(Val400-Ser1098)

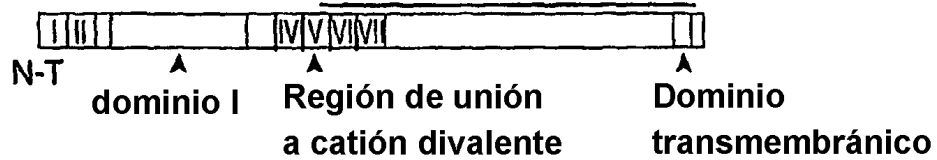
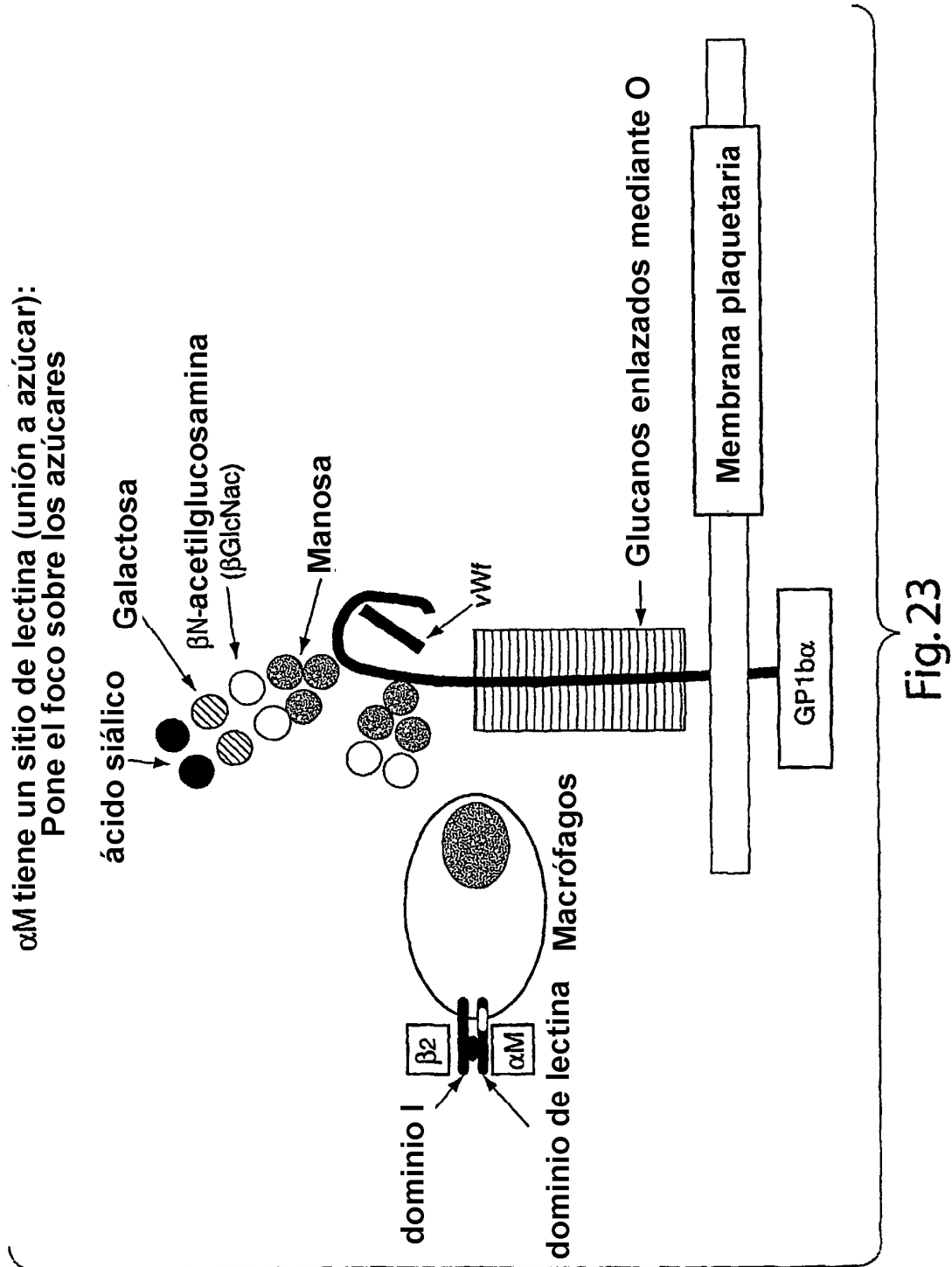
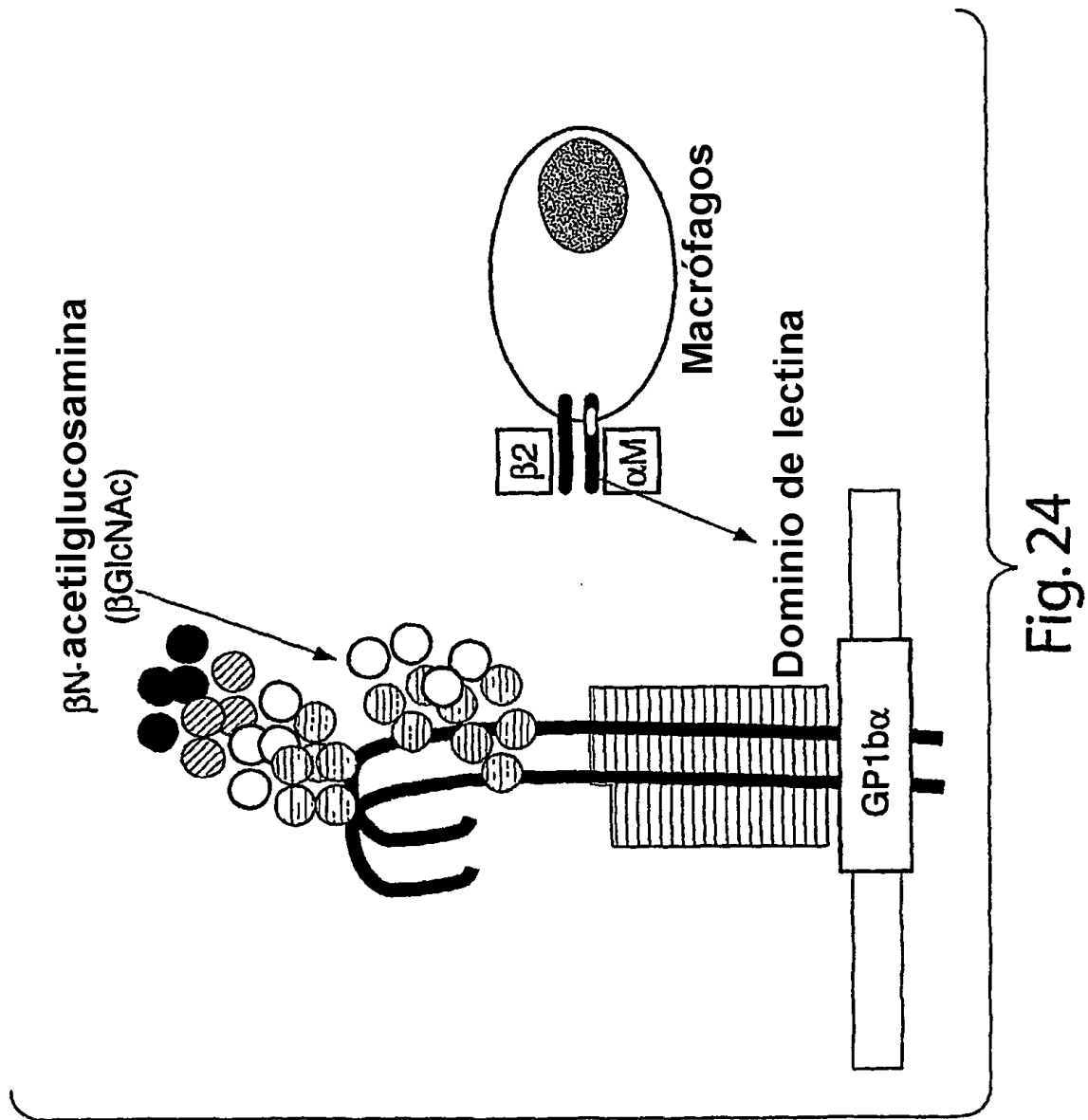


Fig.22





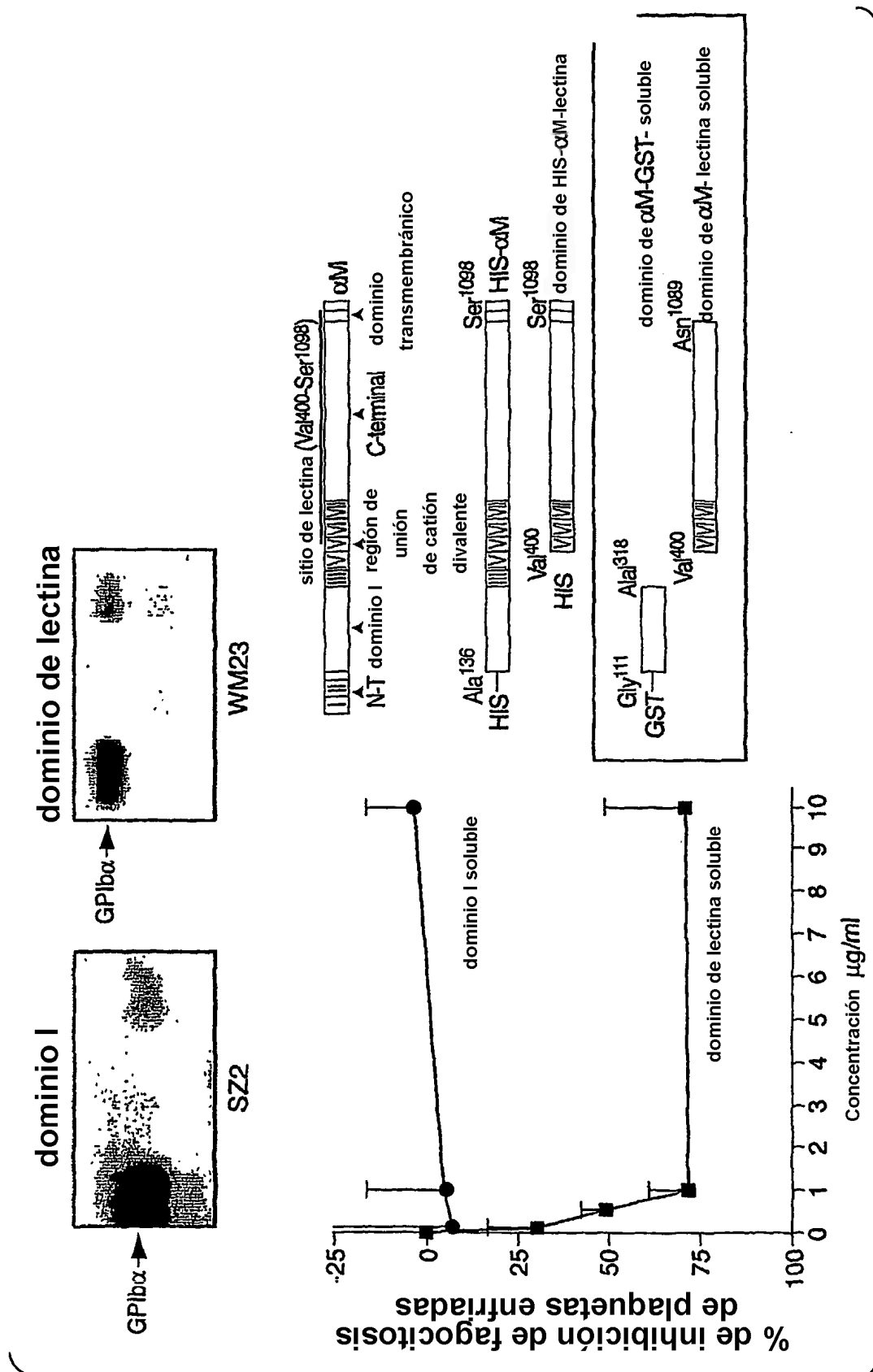


Fig. 25

Células de ovario de hamster chino que expresan la quimera α_M/α_X

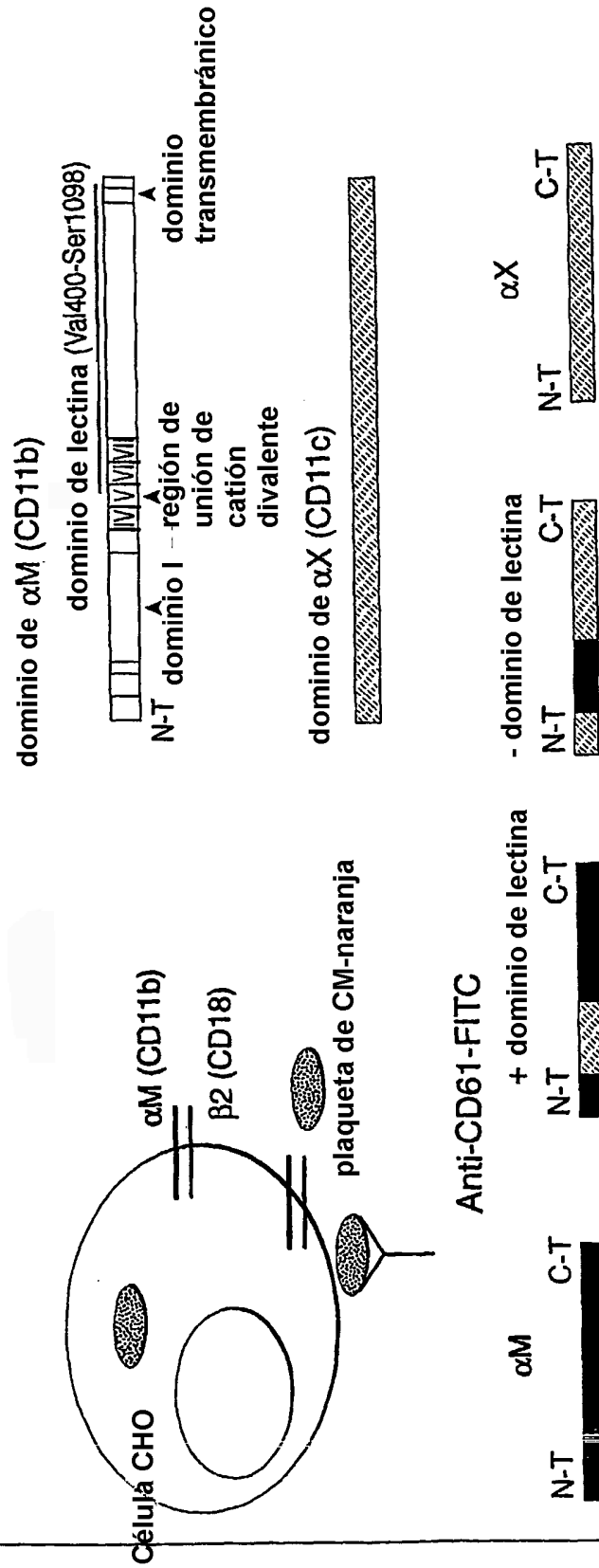
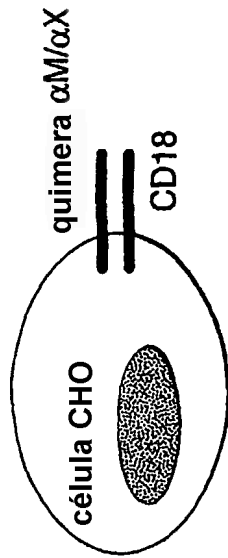


Fig. 26

Ensayo fagocítico para superficie de plaqueta alterada inducida por enfriamiento



CÉLULAS CHO QUE EXPRESAN
DIFERENTES QUIMERAS $\alpha M/\alpha X$

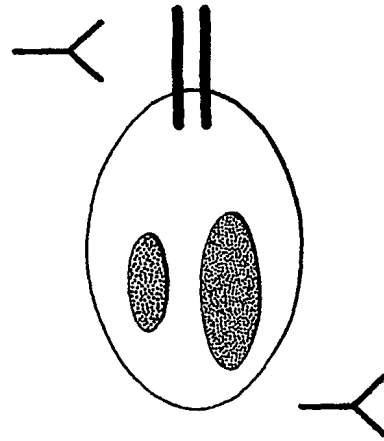
Ingestión cuantitativa mediante citometría de flujo

Carga de plaquetas con CM-Naranja



Enfriamiento 2 h; mantener el control a 22°C;
Alimentar células CHO

Captación de CM-Naranja "ingeridas"



Positivas a CM-Naranja-FITC "adherentes"

ab anti-CD61 marcado con FITC
(específico de plaquetas)

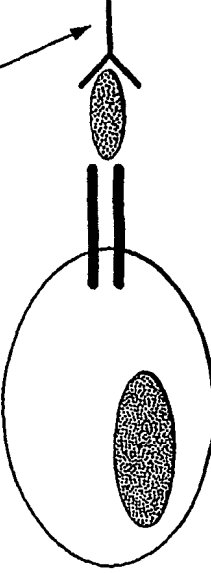


Fig. 27

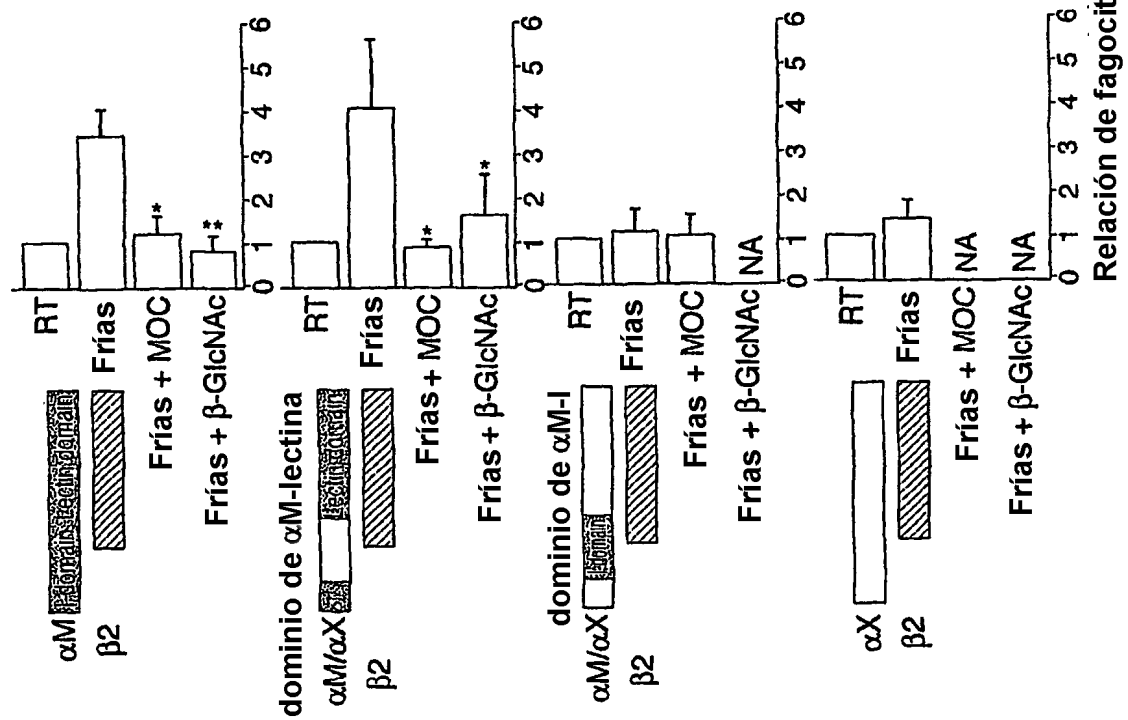
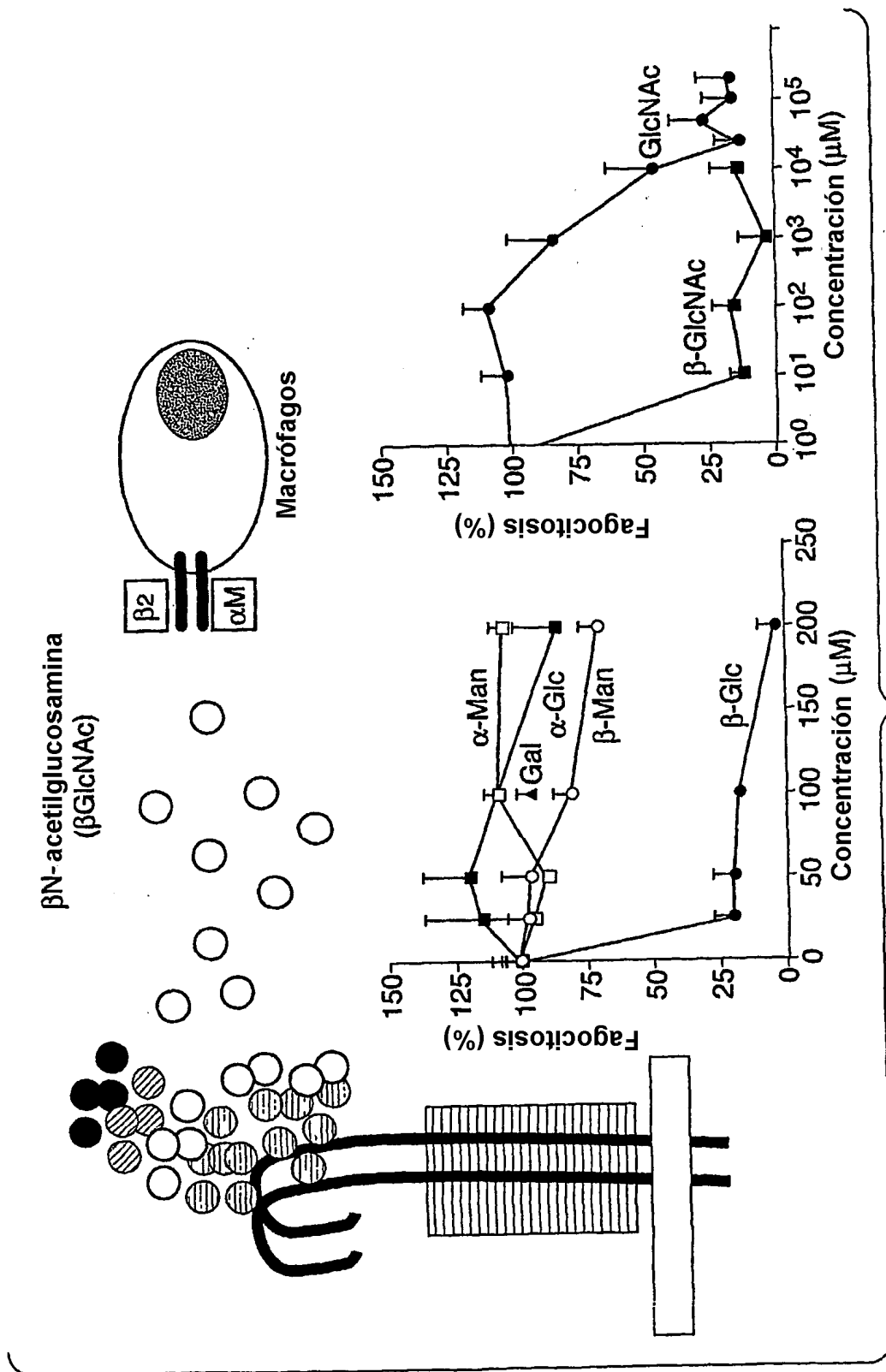
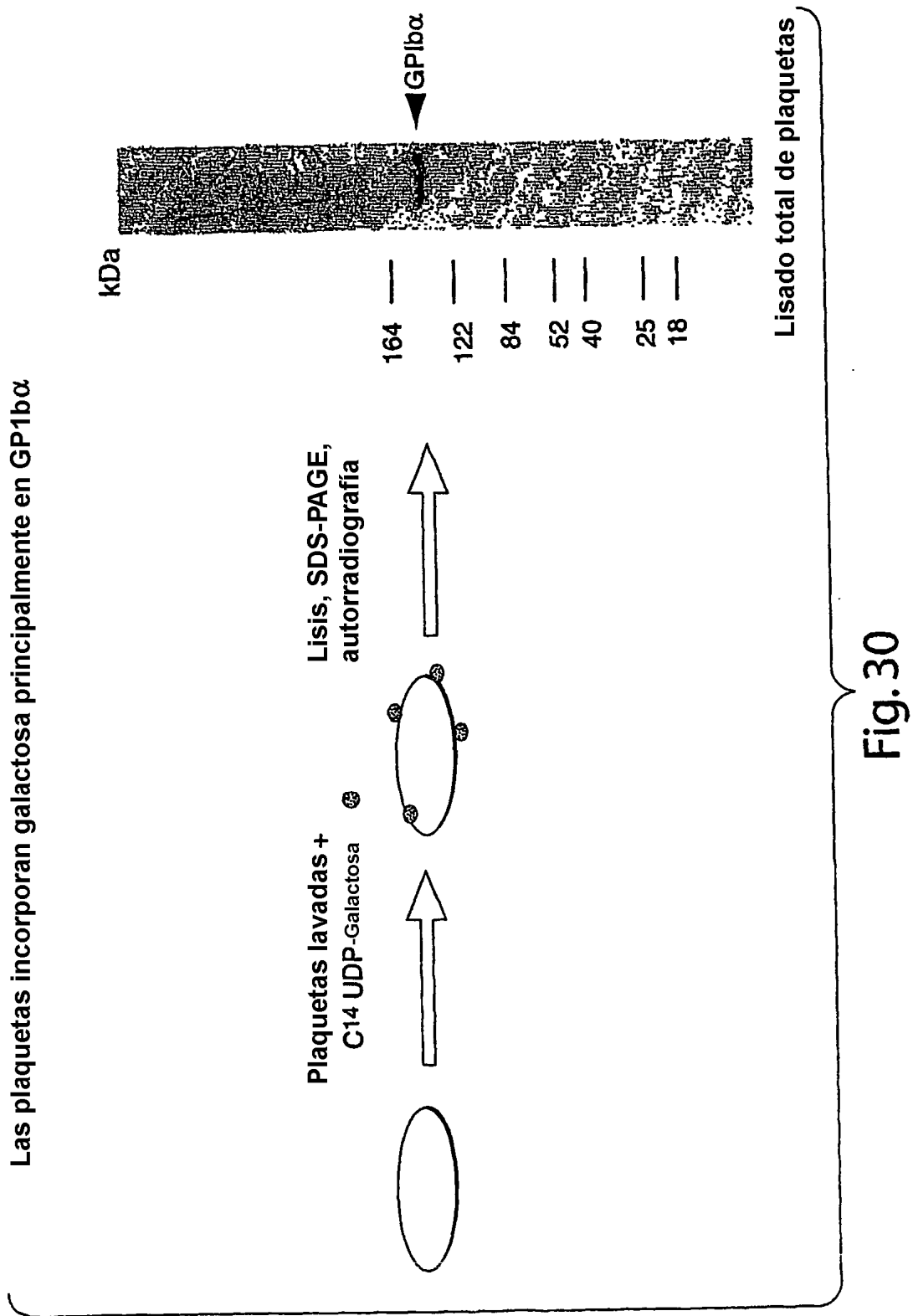


Fig. 28





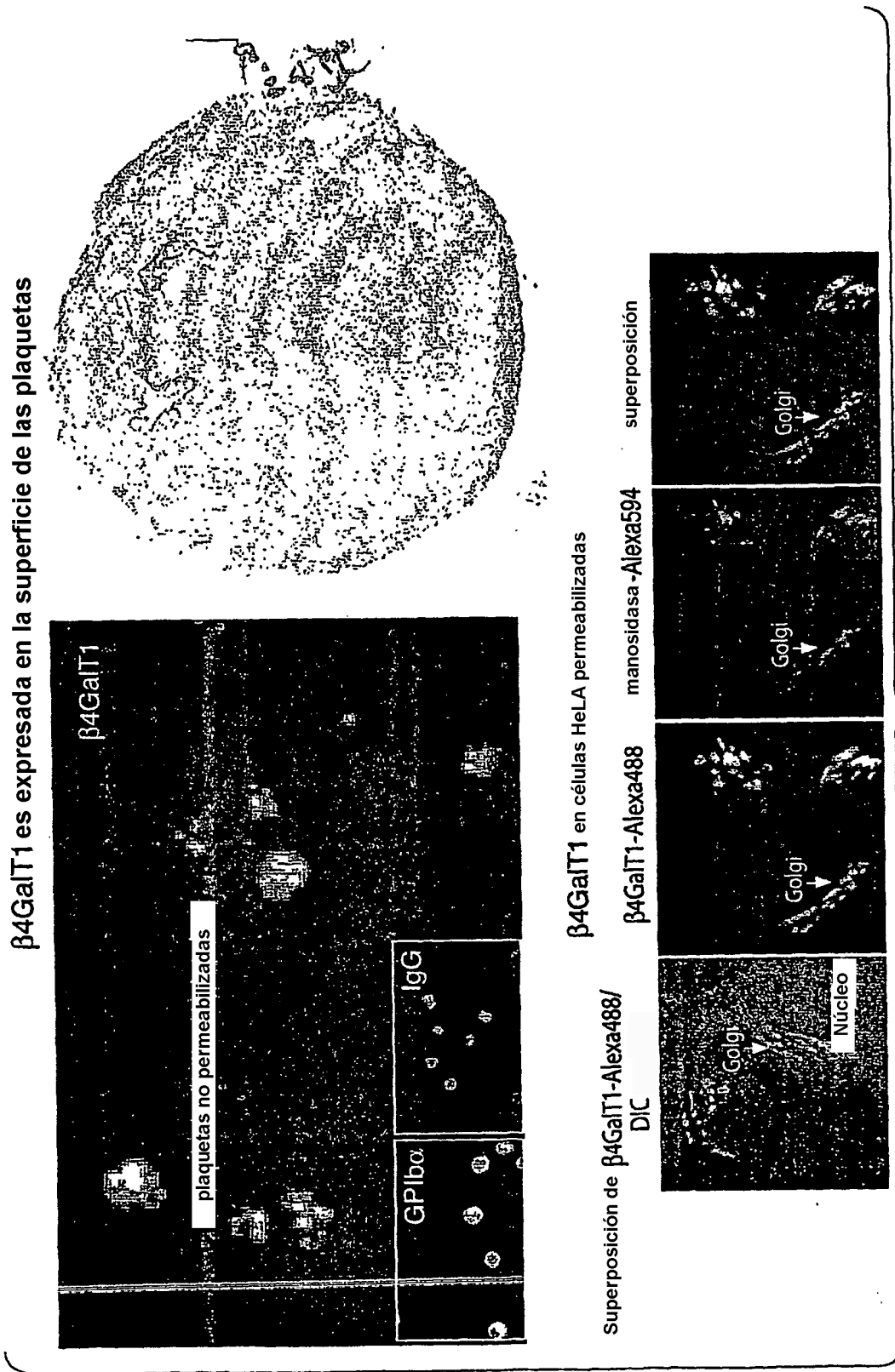


Fig. 31

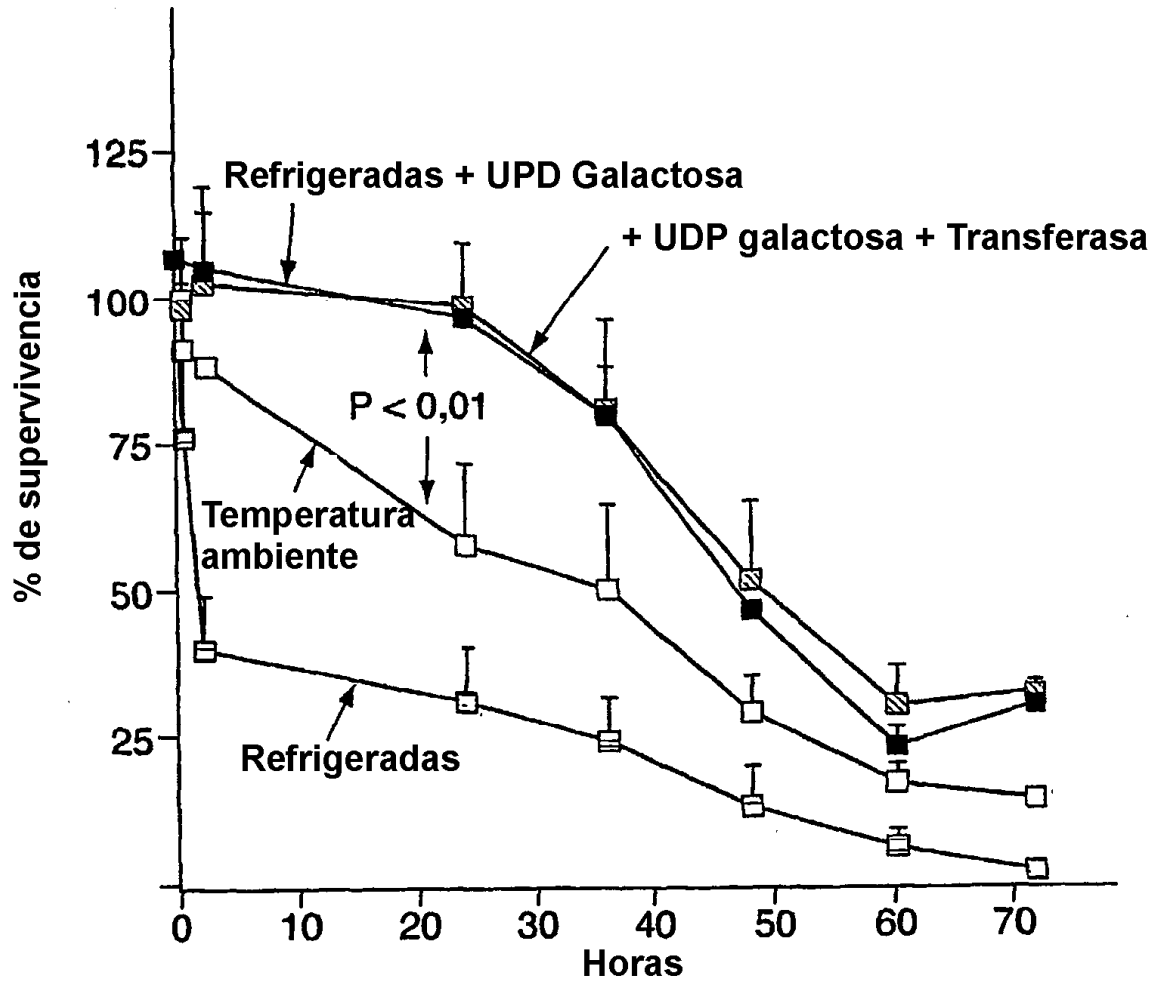
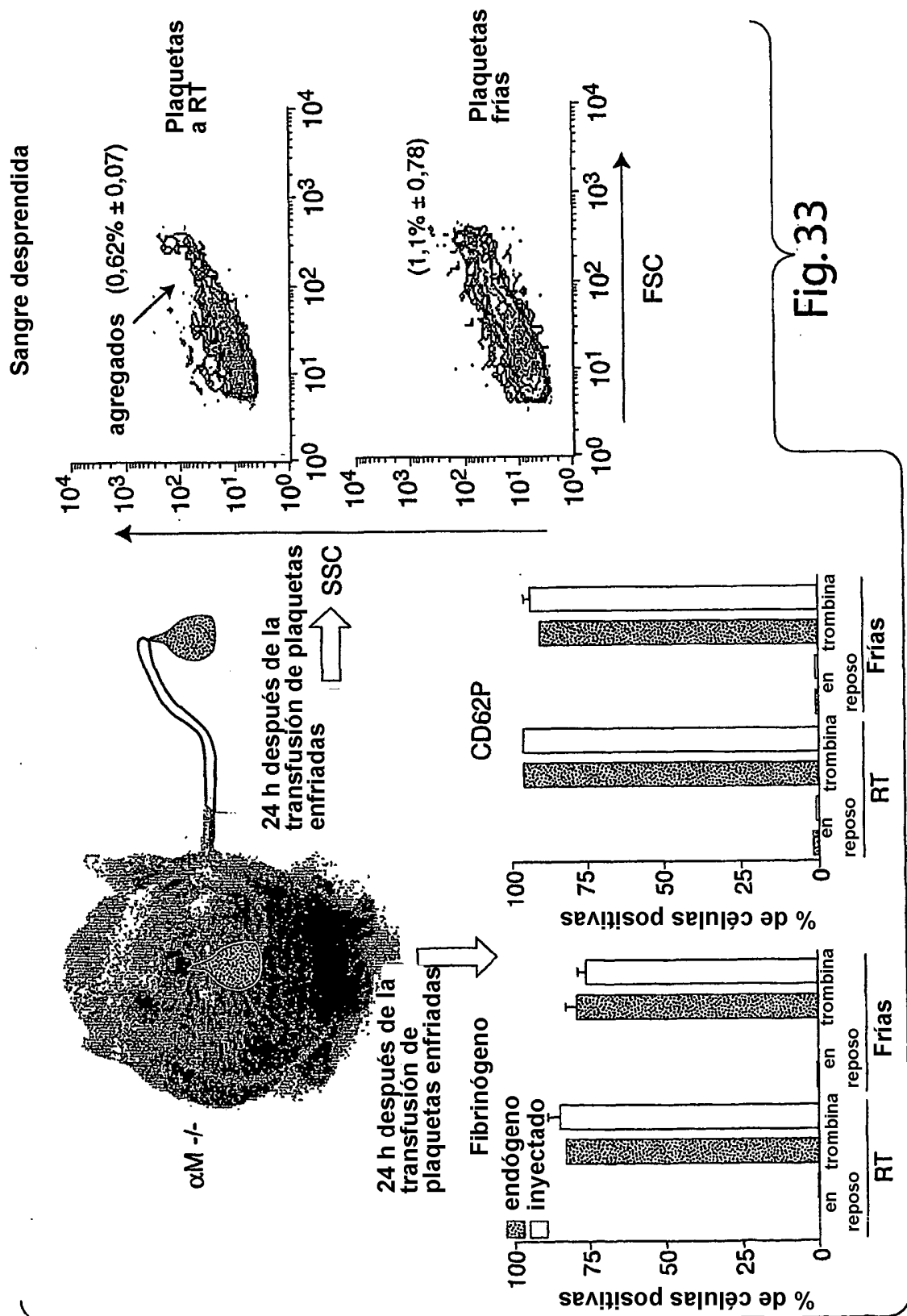


Fig.32



ESTUDIOS EN CONCENTRADOS DE PLAQUETAS HUMANAS

- ✓ Las plaquetas en concentrados de plaquetas se pueden galactosilar
- ✓ La galactosilación es estable durante el almacenamiento con refrigeración, y evita la fagocitosis por macrófagos *in vitro*
- ✓ La refrigeración conserva las funciones plaquetarias *in vitro* durante un almacenamiento prolongado; la galactosilación más la refrigeración conserva algunas funciones plaquetarias mejor que la refrigeración sola.

Fig. 34

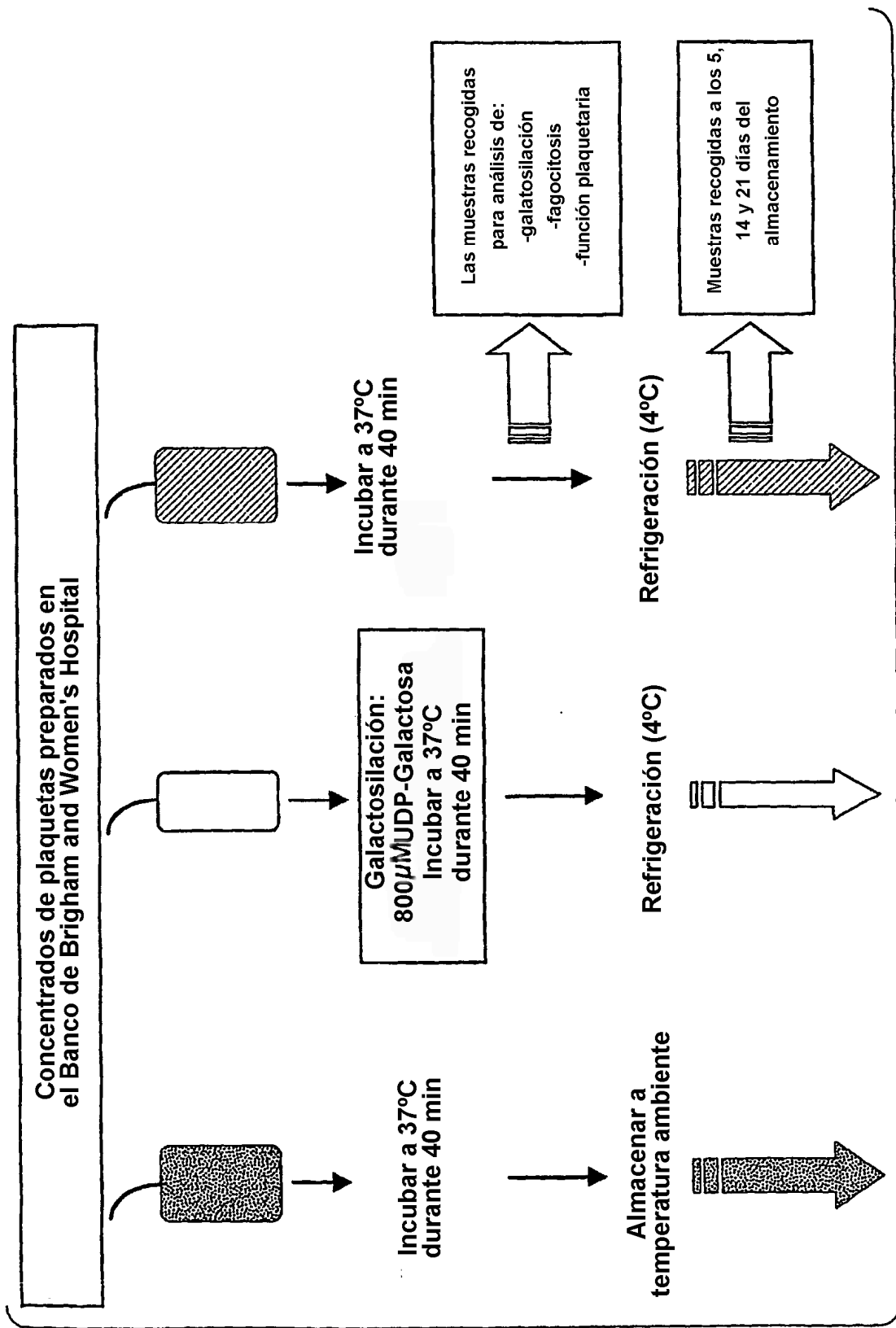


Fig.35

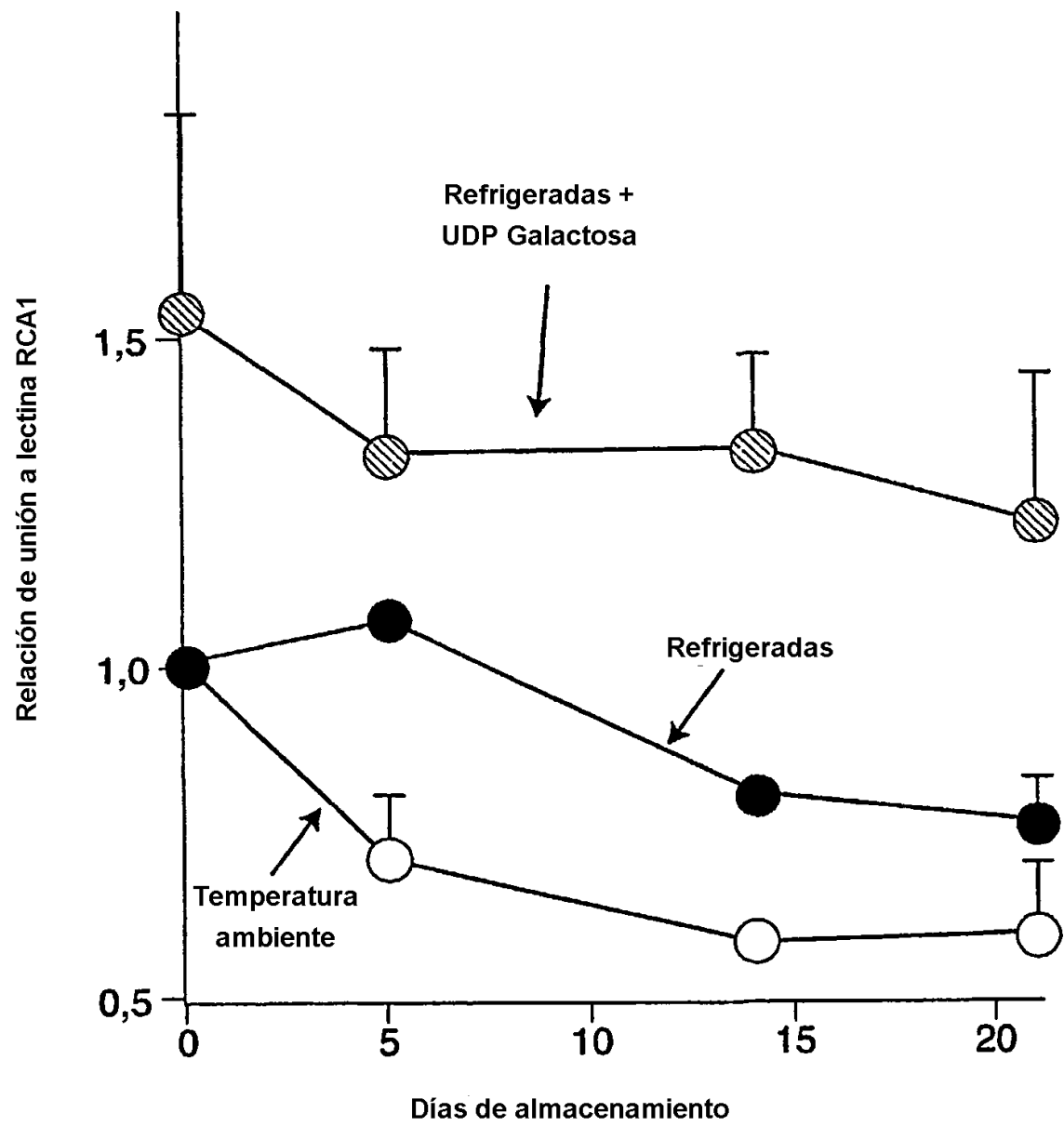


Fig. 36

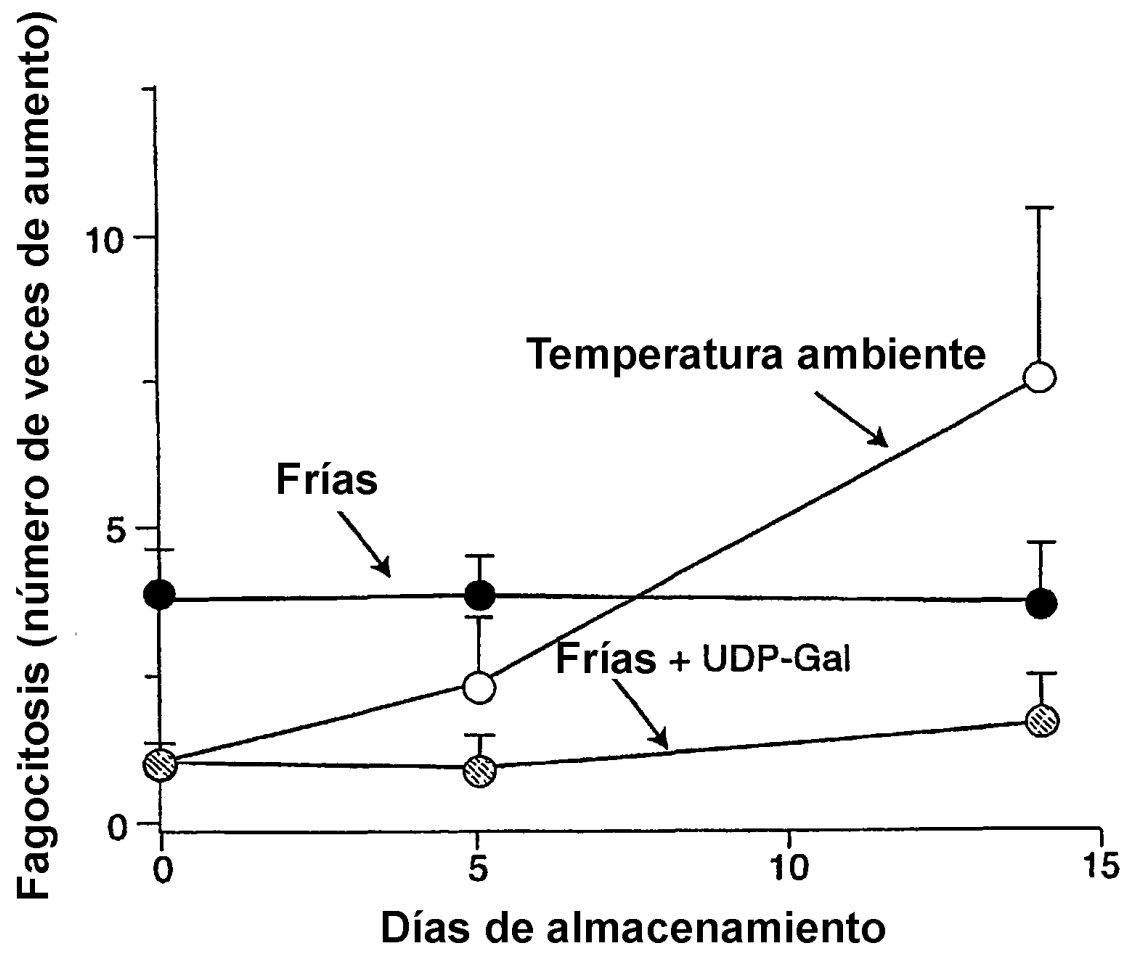


Fig. 37

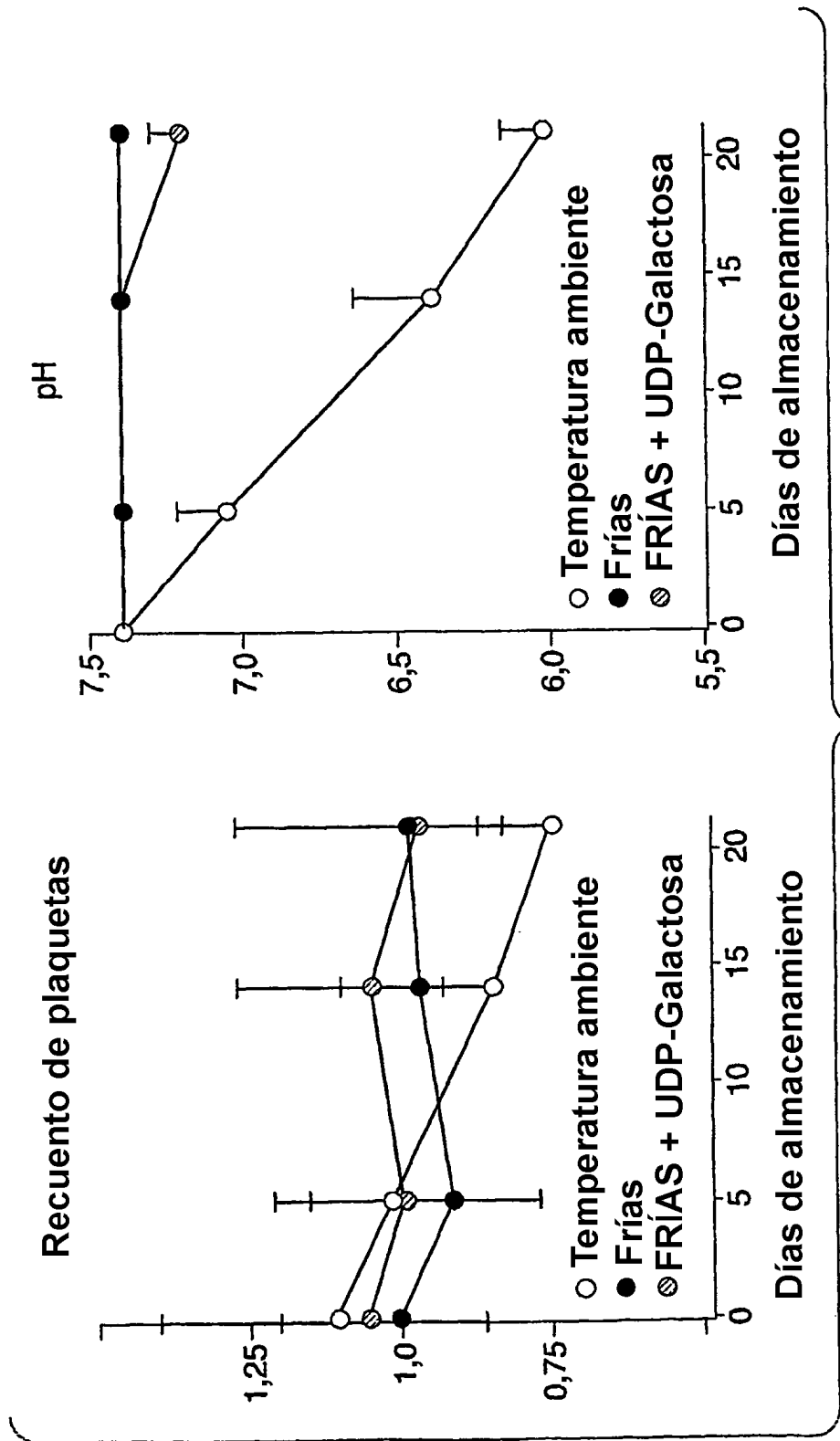


Fig. 38

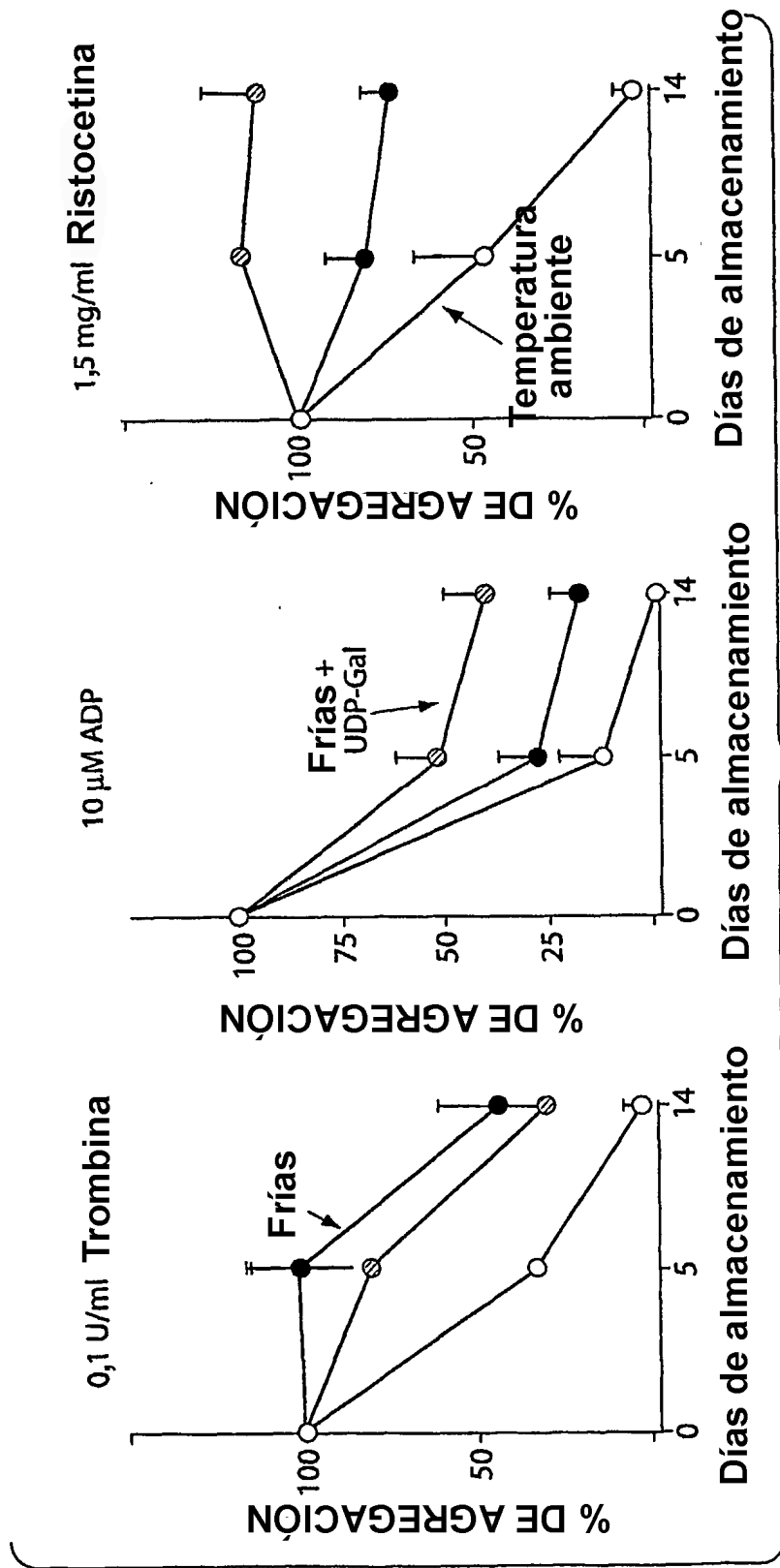


Fig. 39

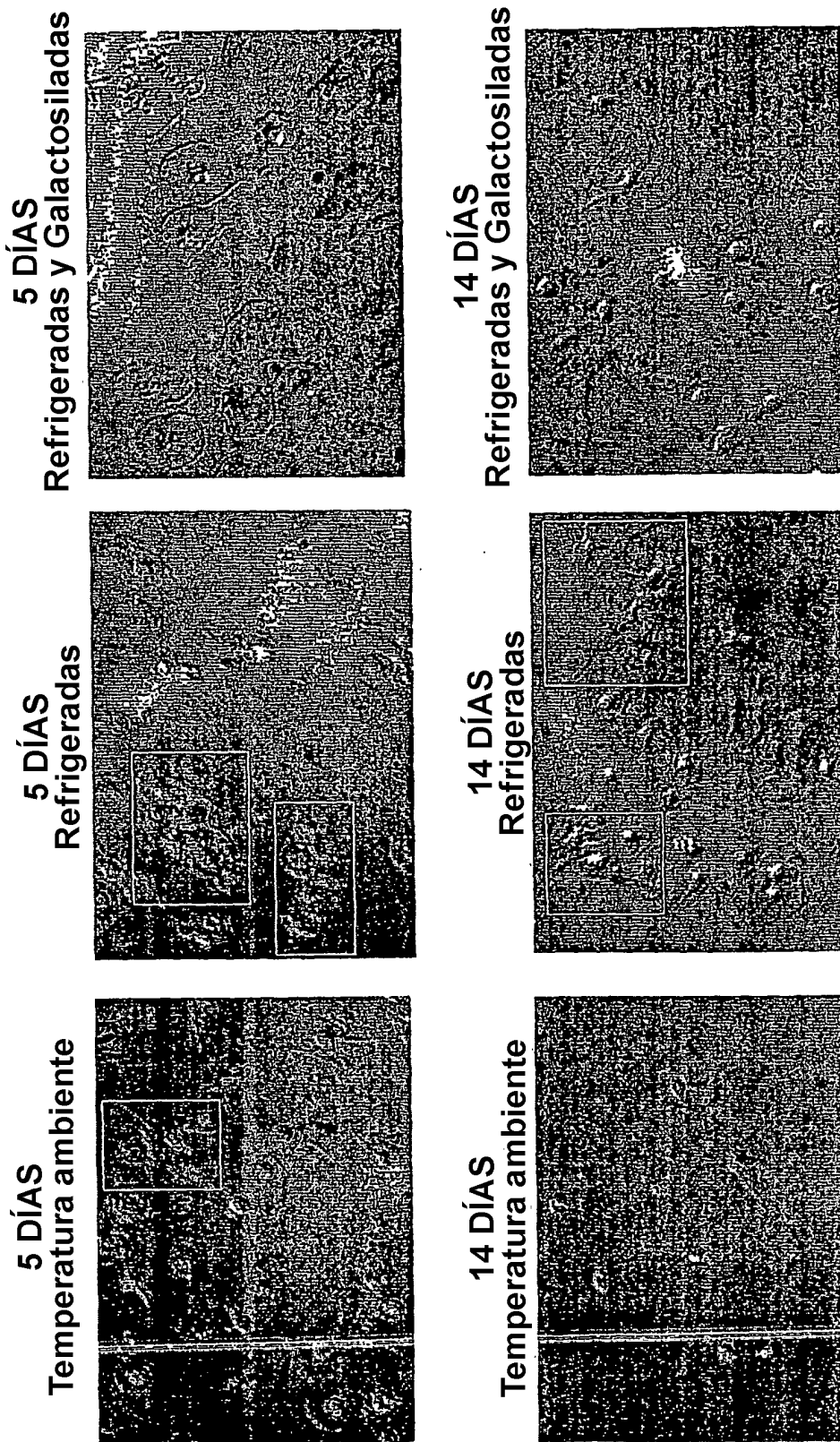


Fig. 40

Figura 41

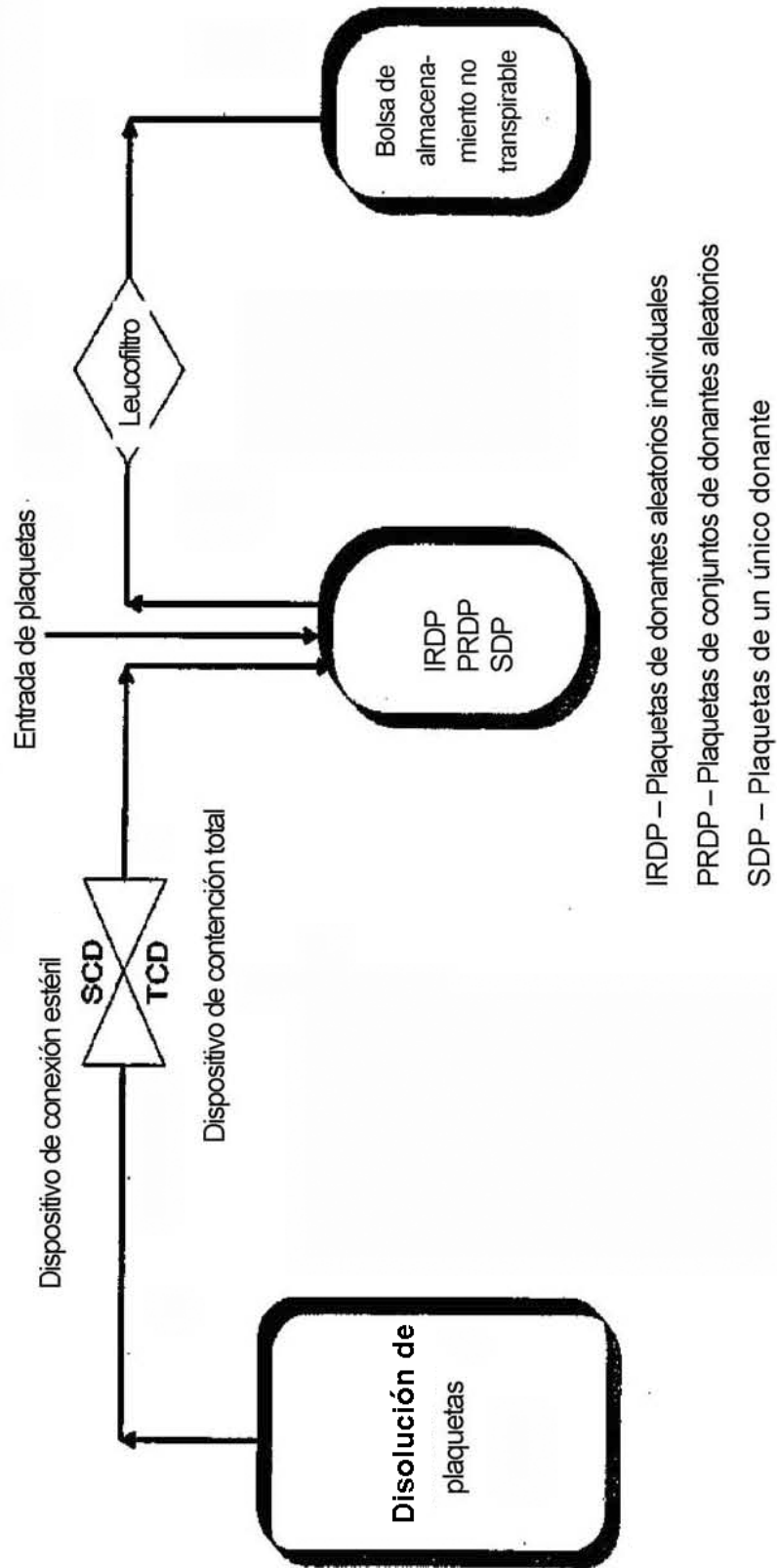


Figura 42

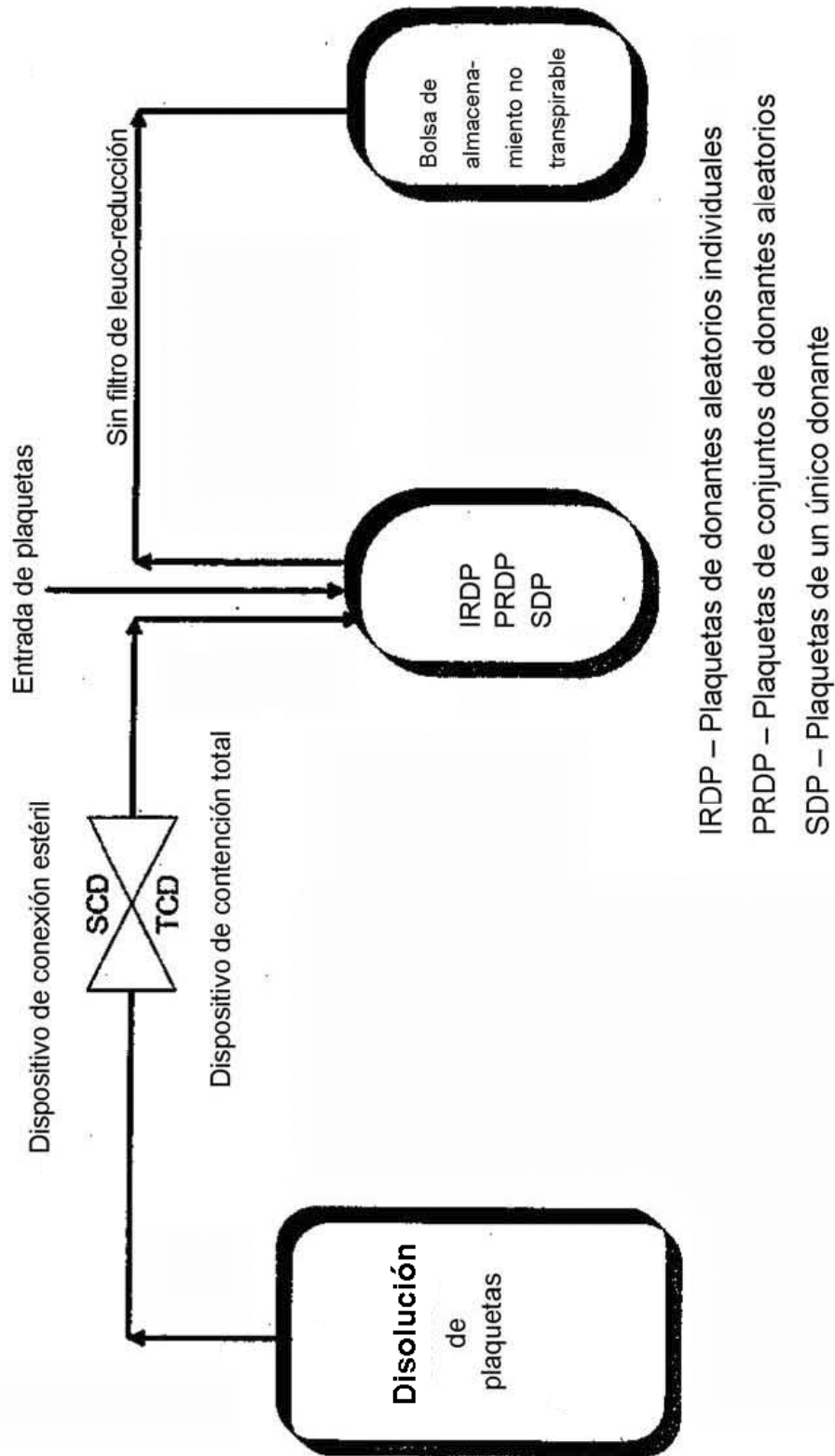


Figura 43

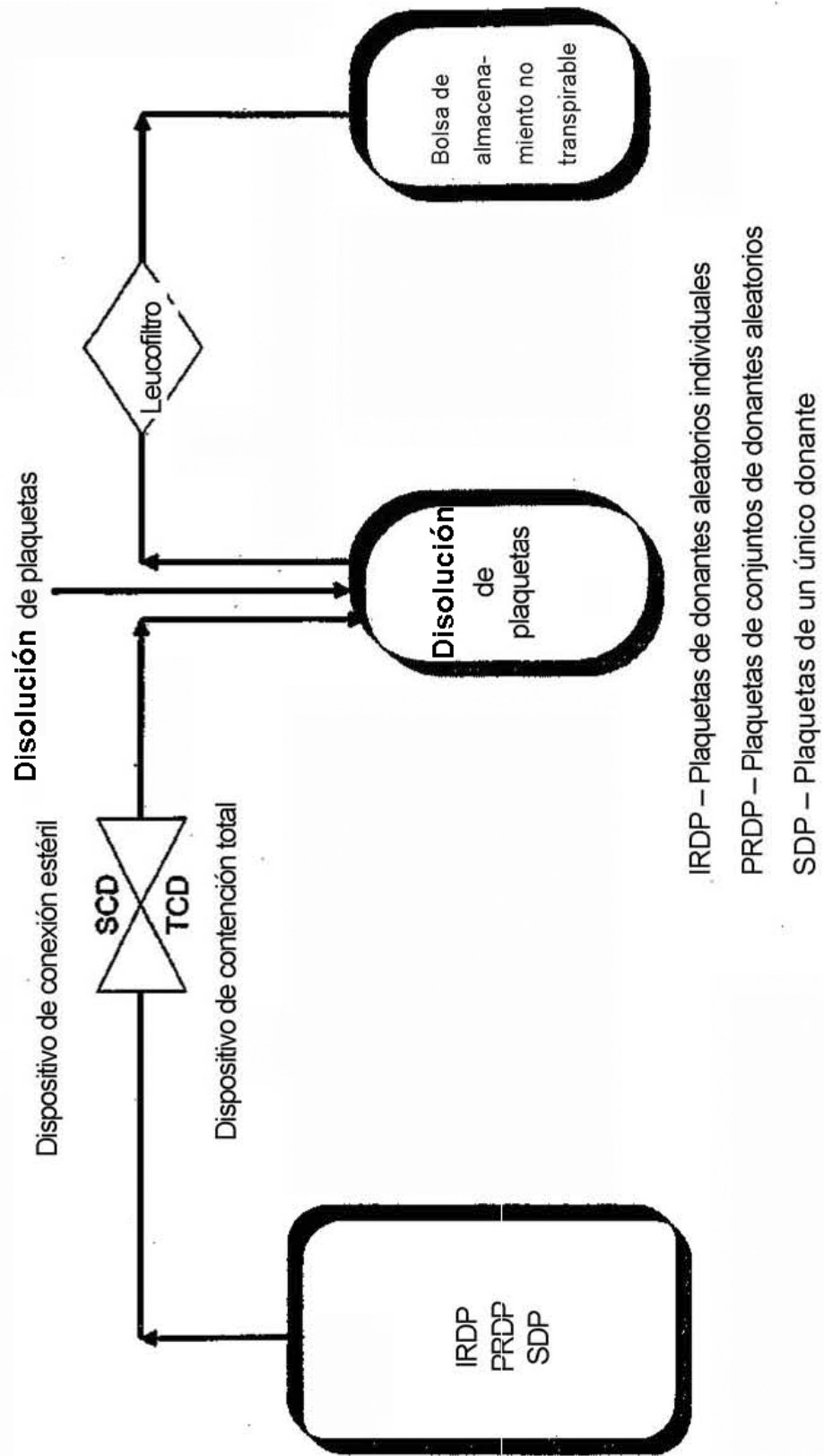


Figura 44

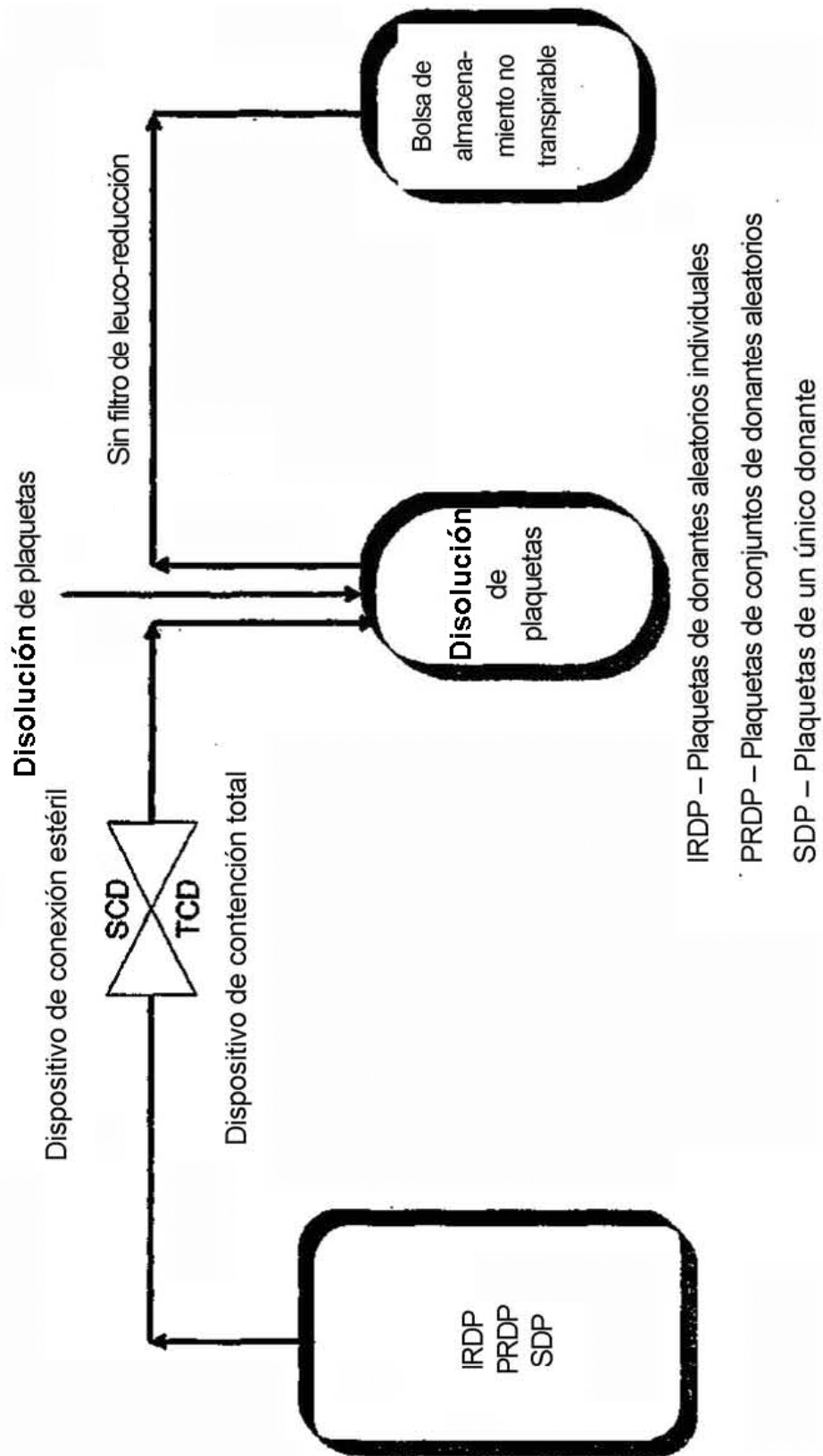


Figura 45

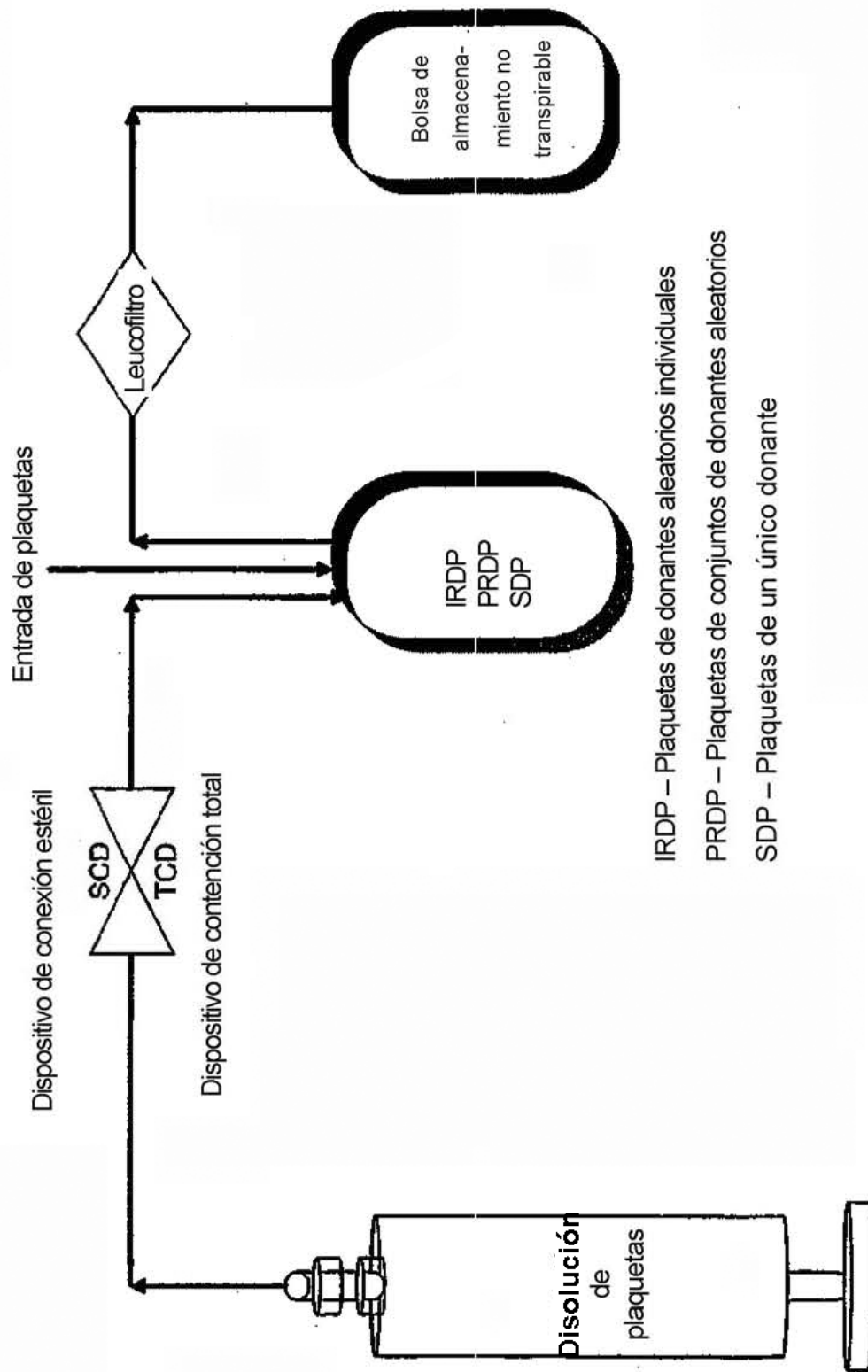


Figura 46

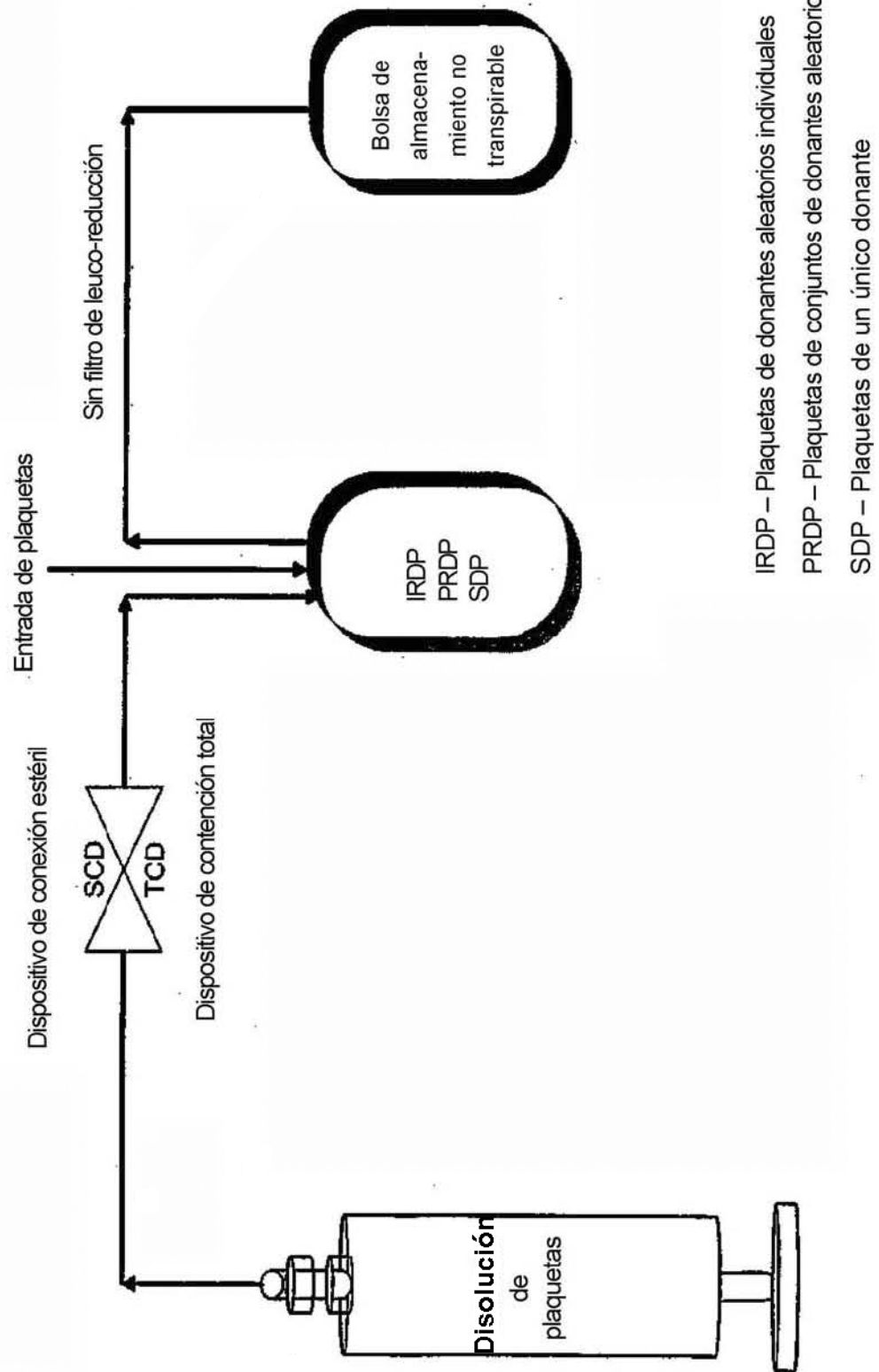


Figura 47

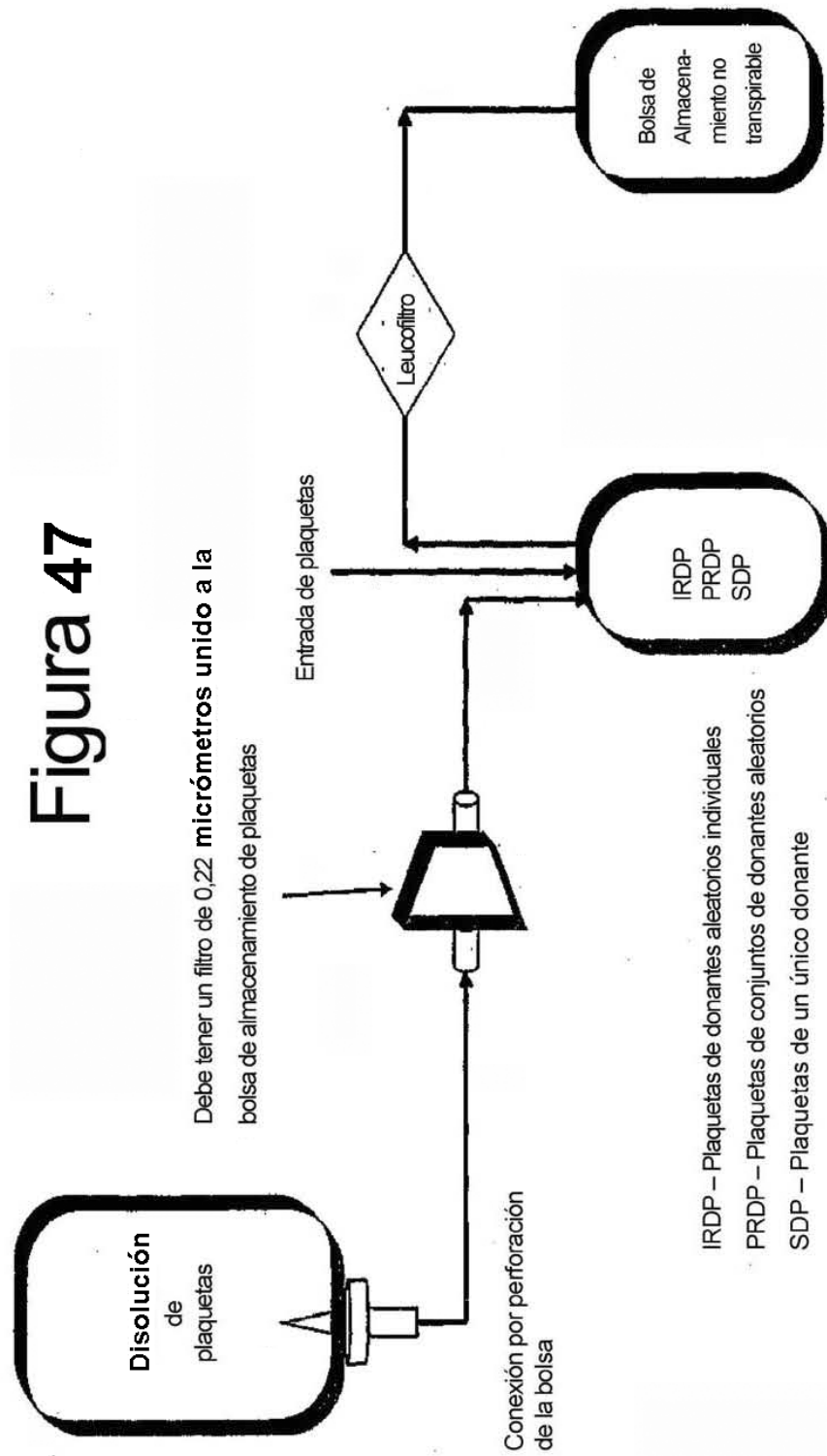


Figura 48

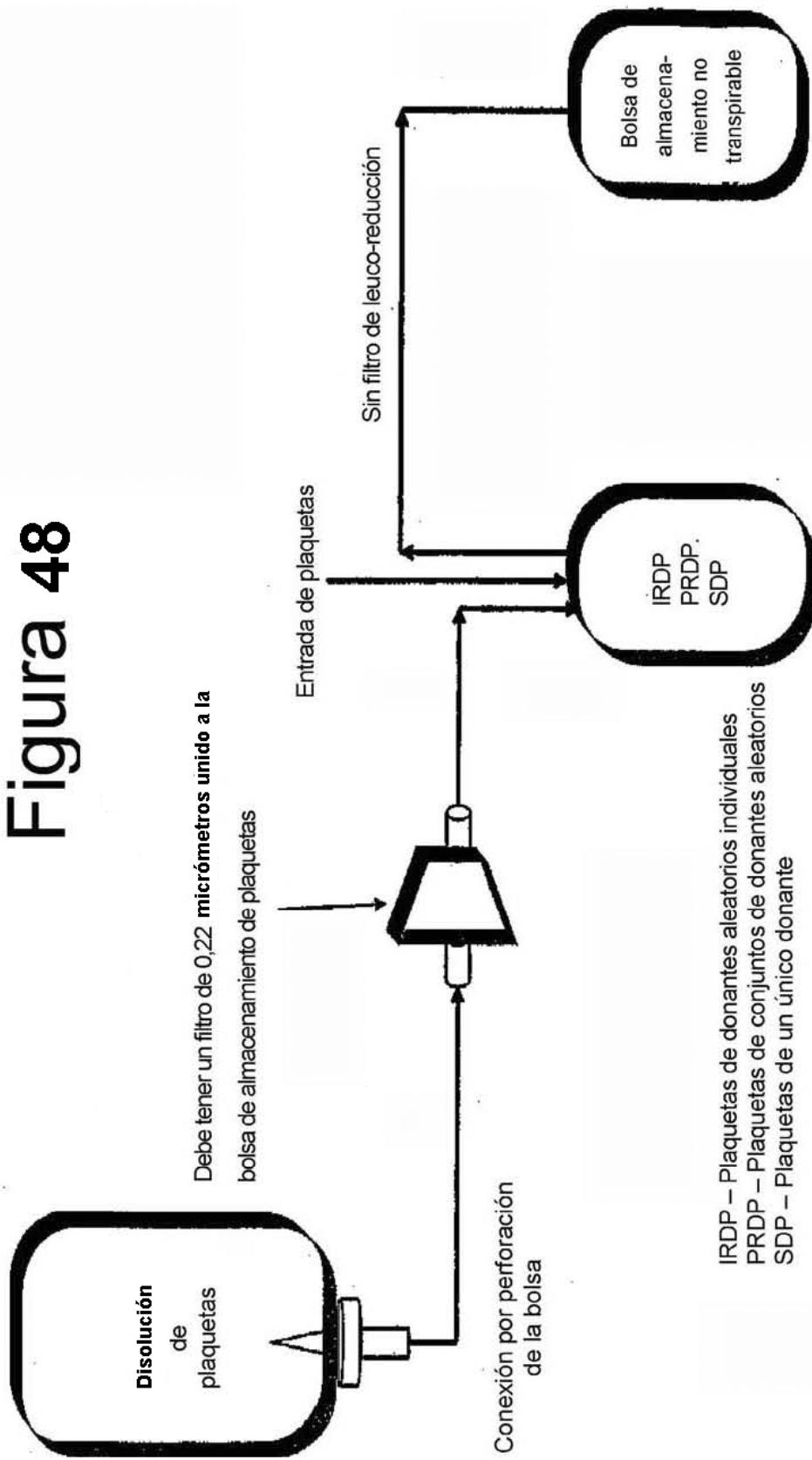
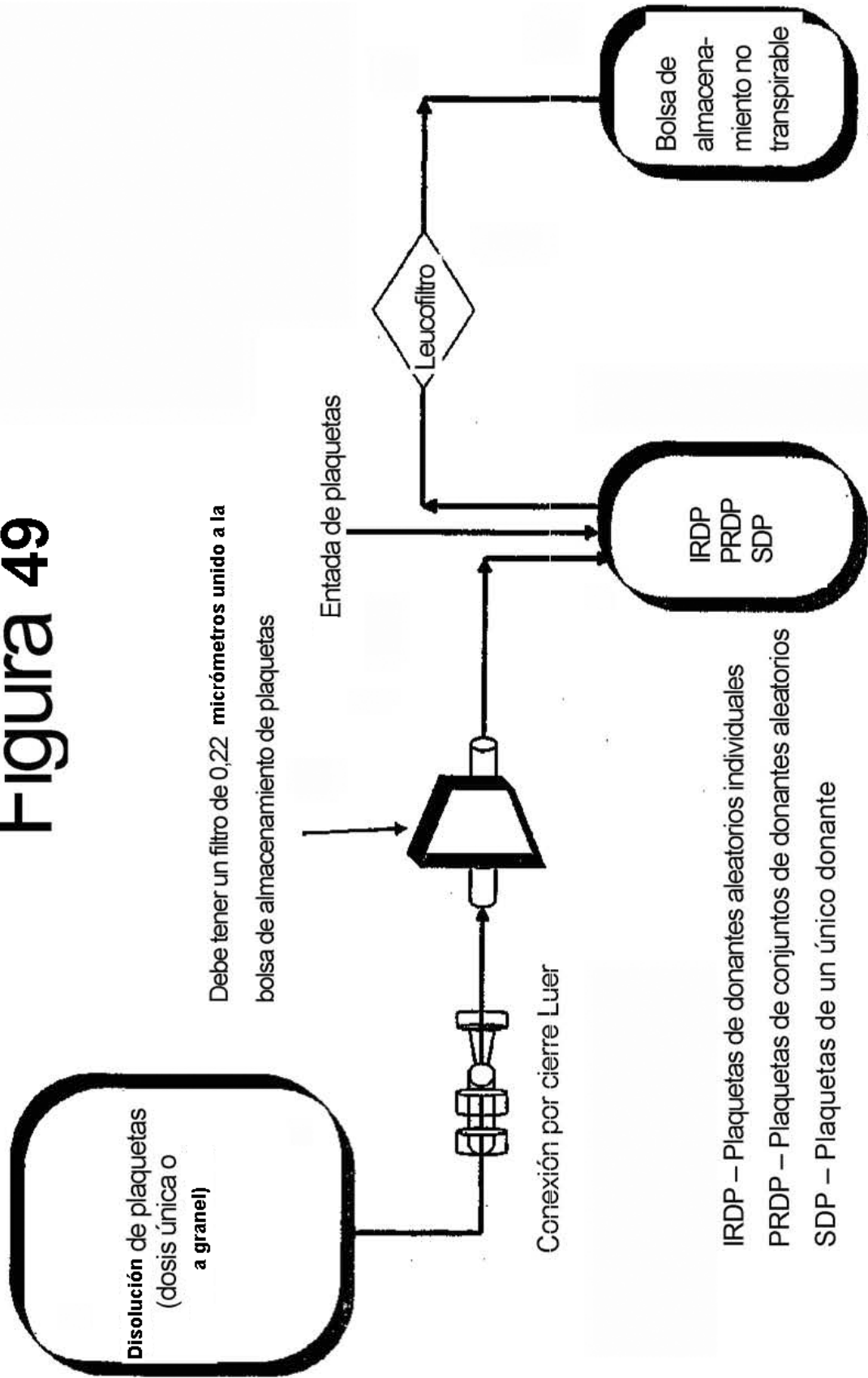


Figura 49



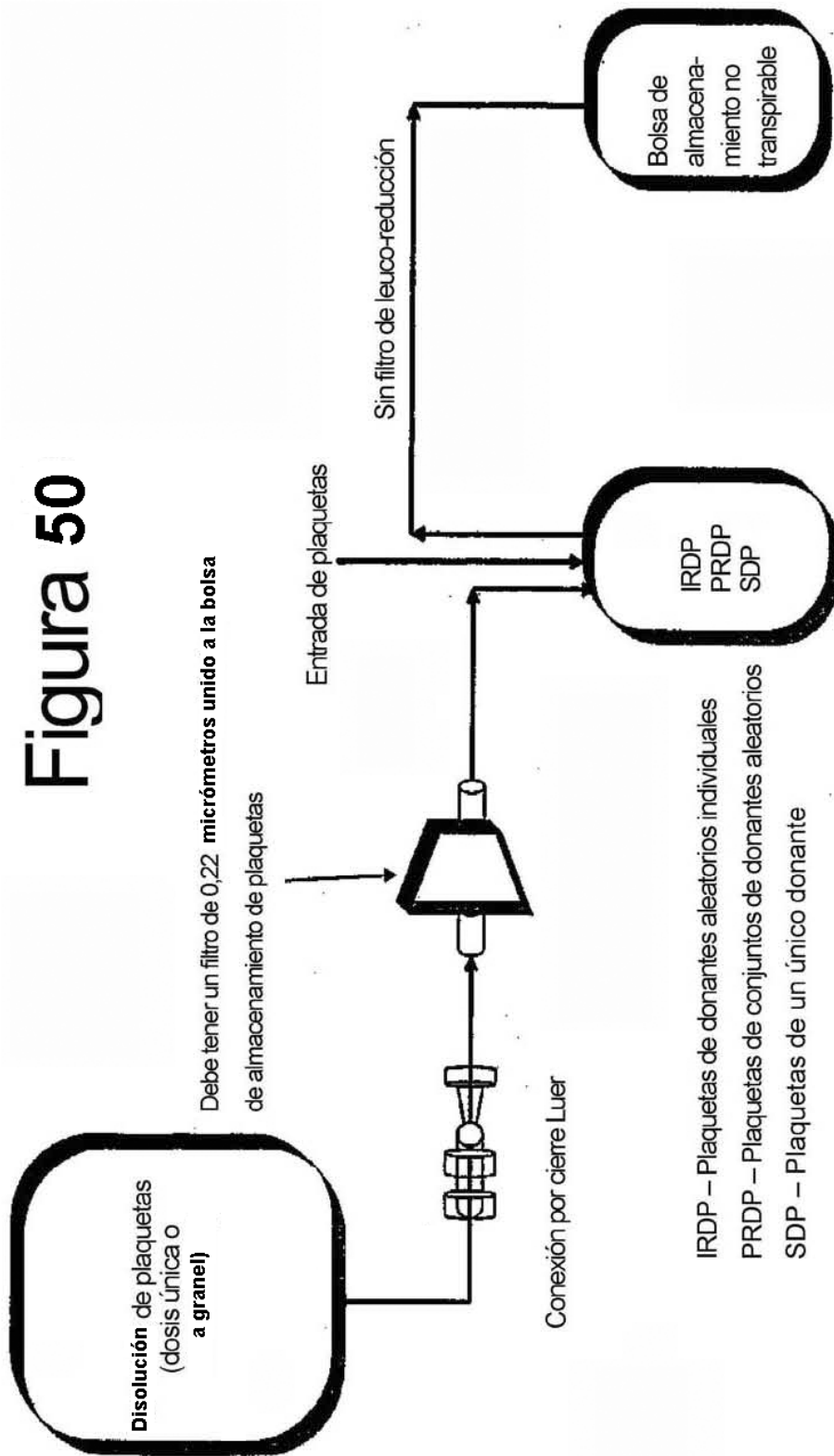


Figura 51

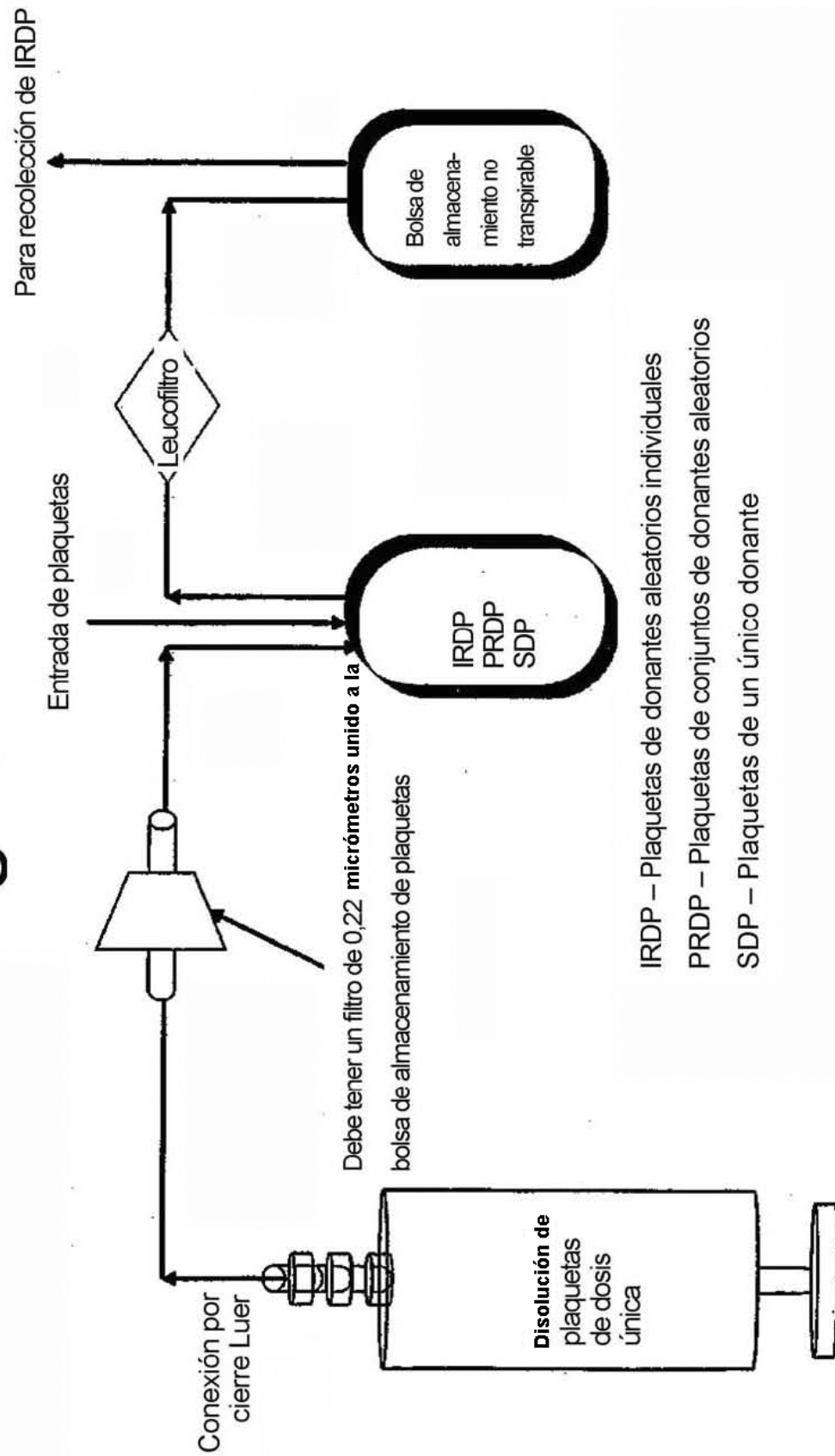


Figura 52

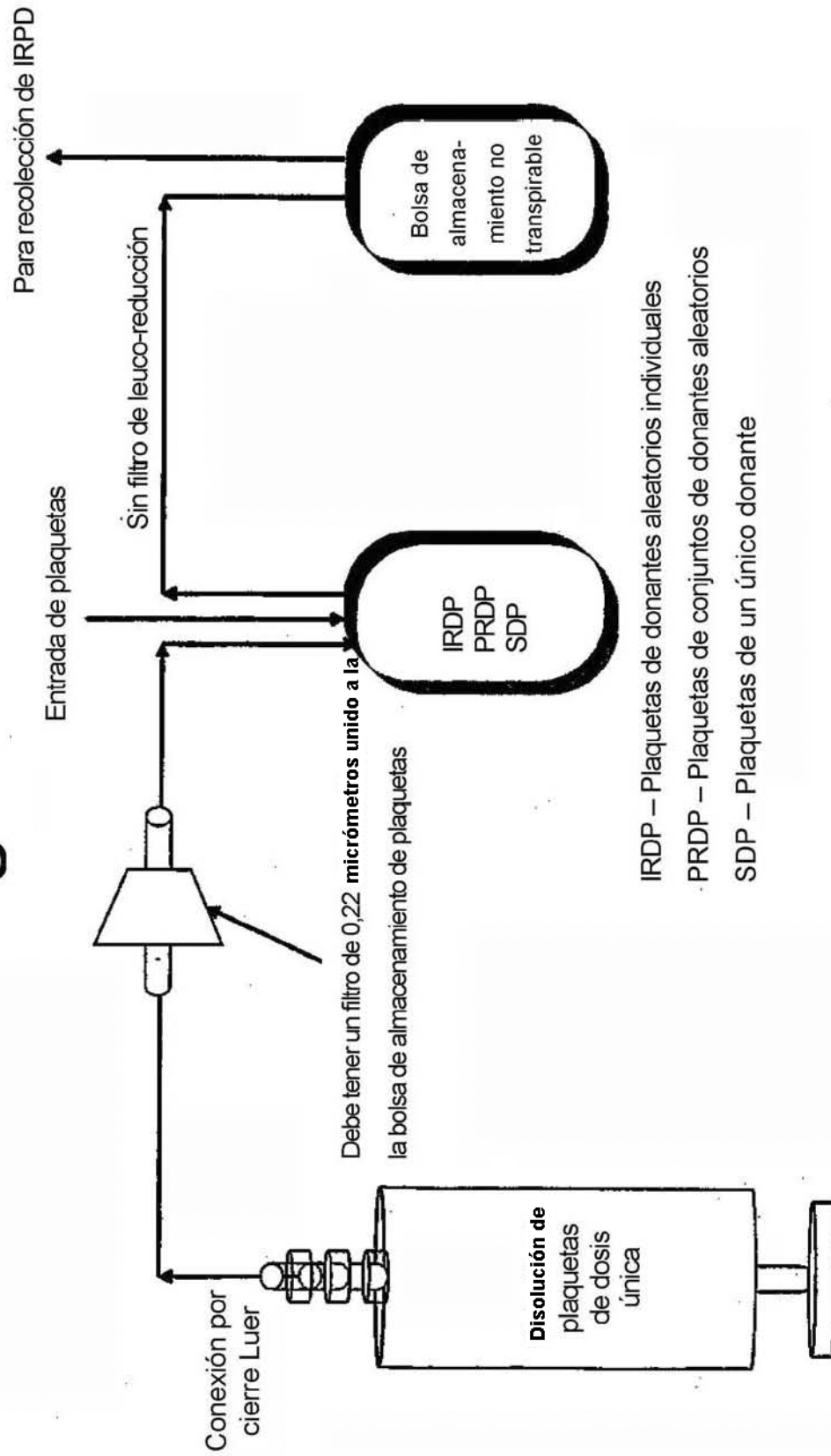


Figura 53

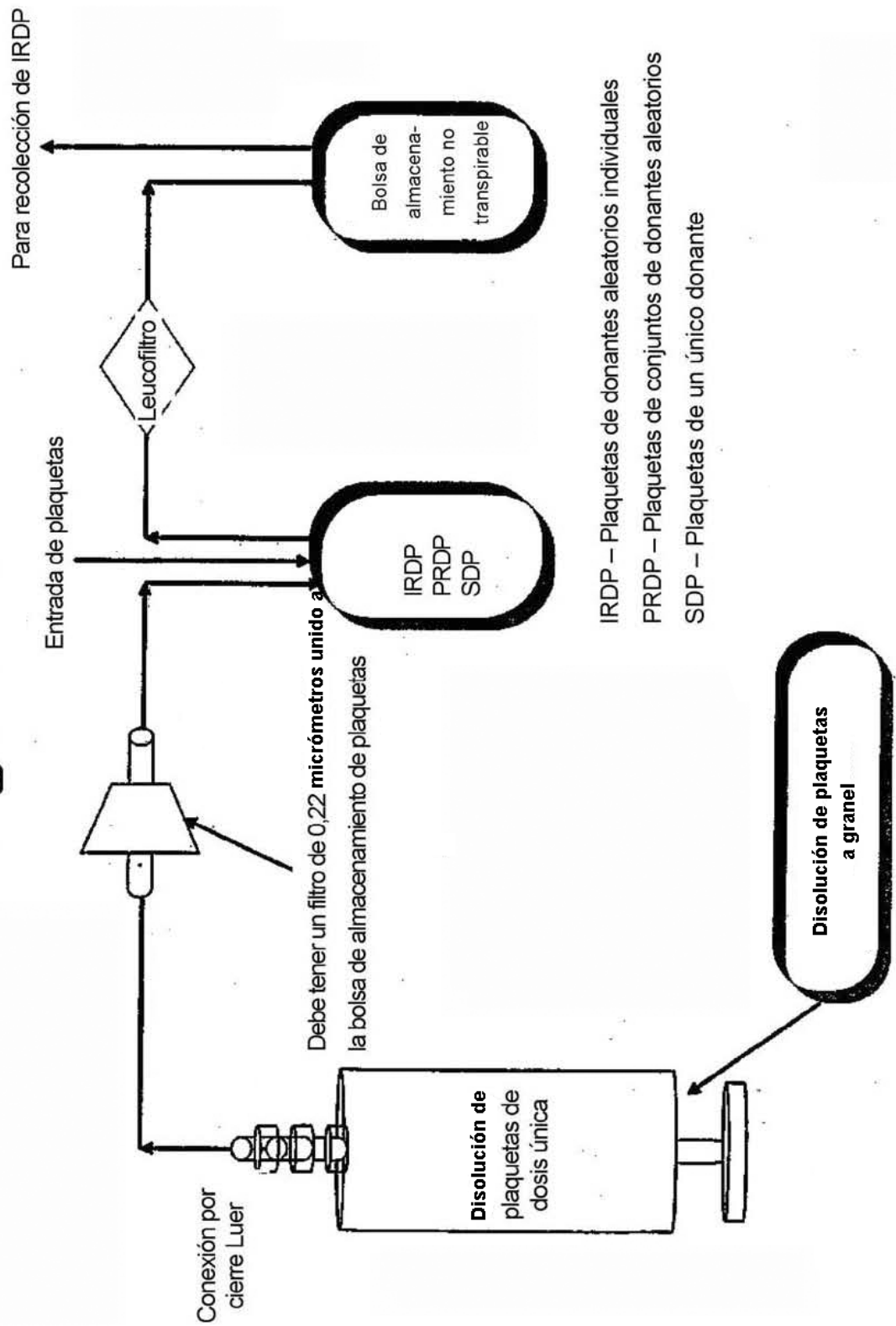


Figura 54

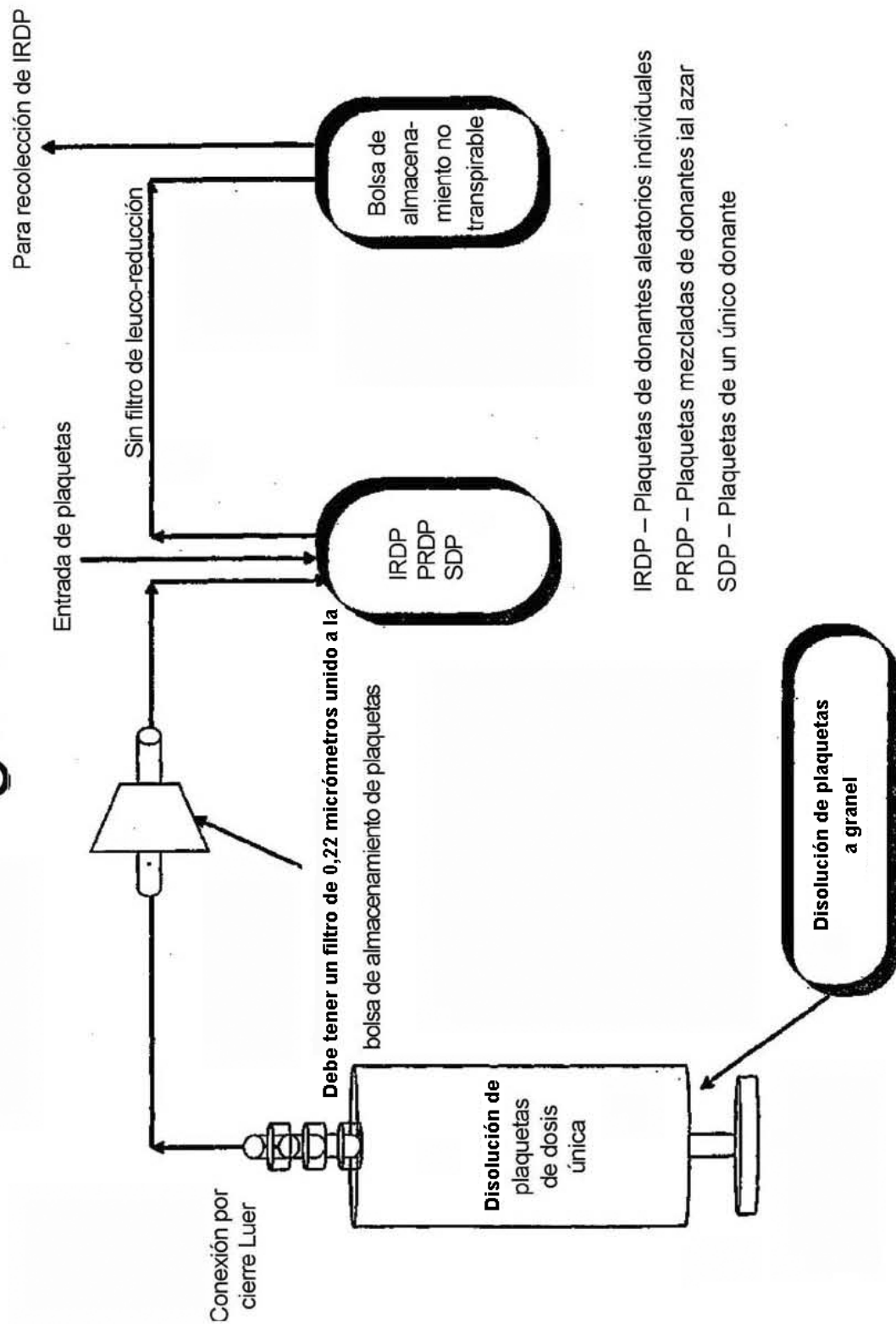


Figura 55

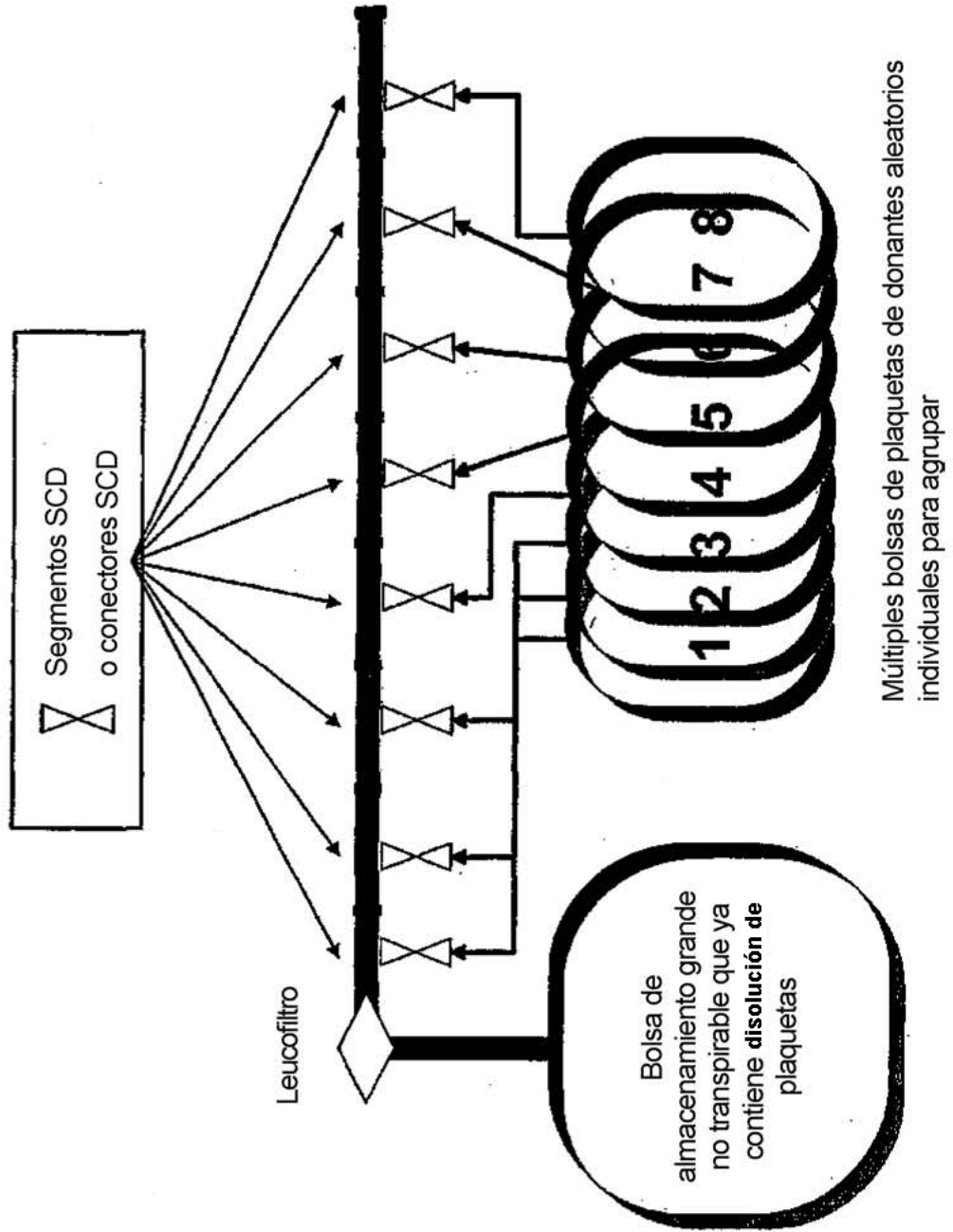


Figura 56

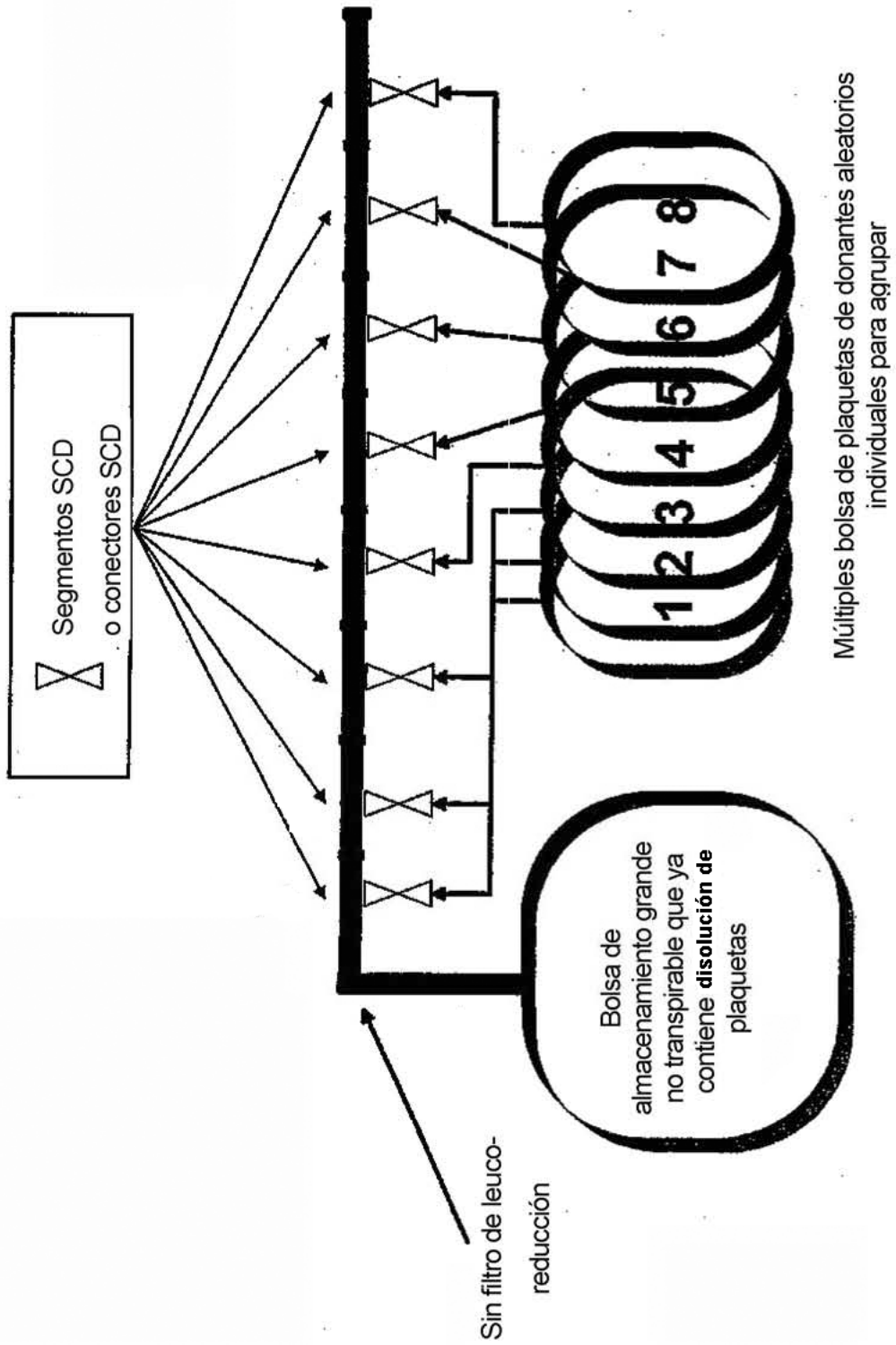


Figura 57

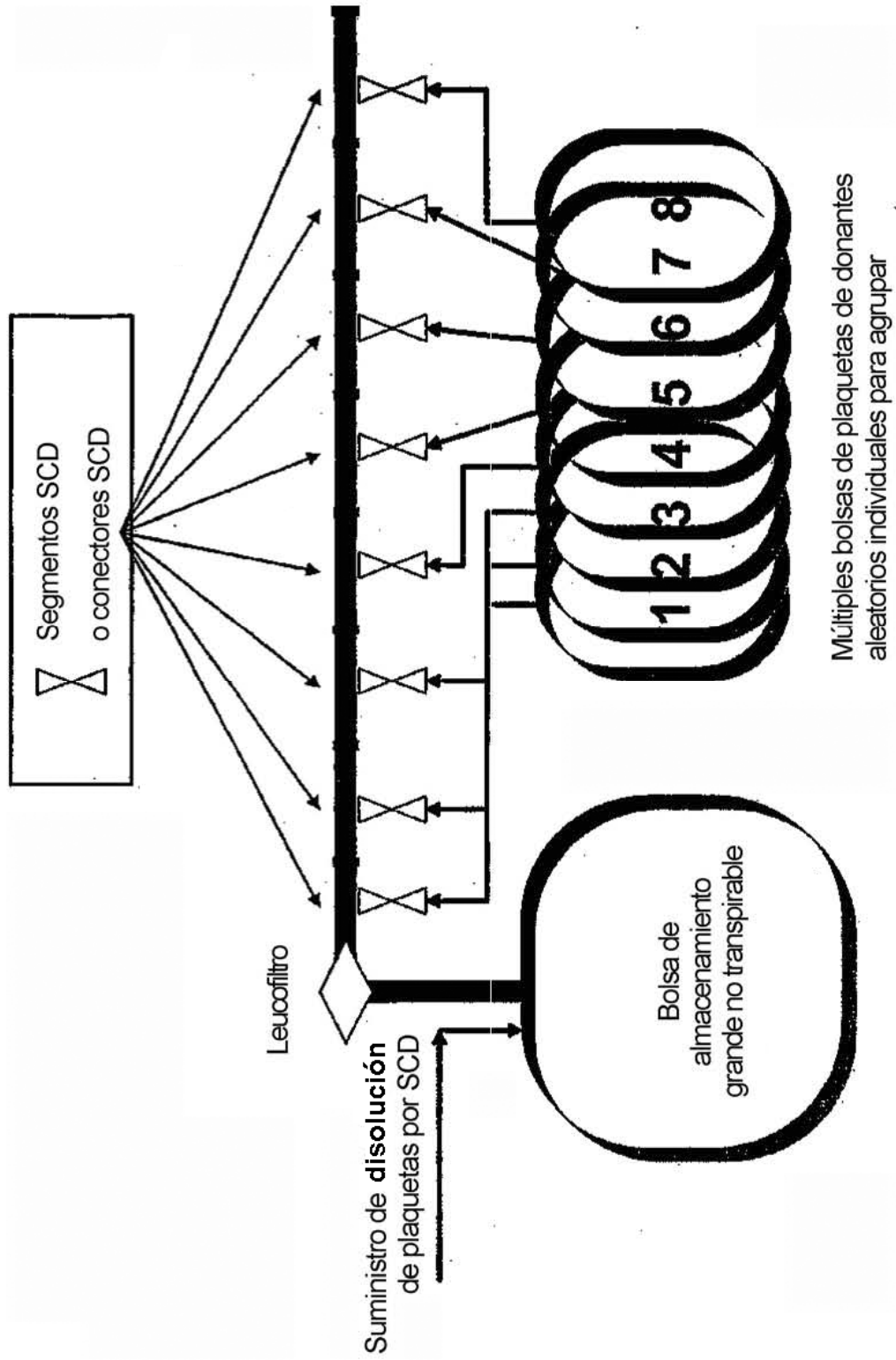


Figura 58

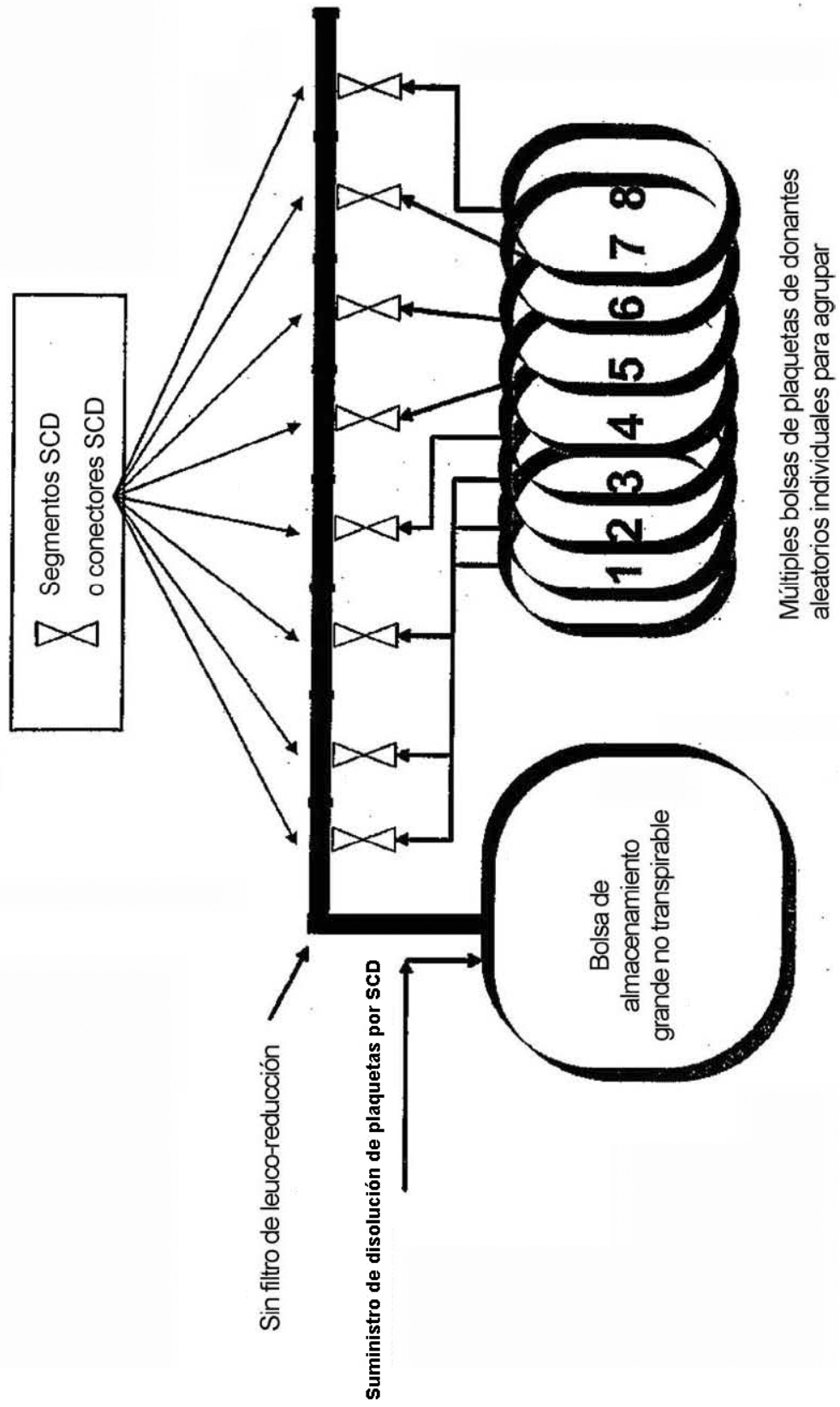


Figura 59

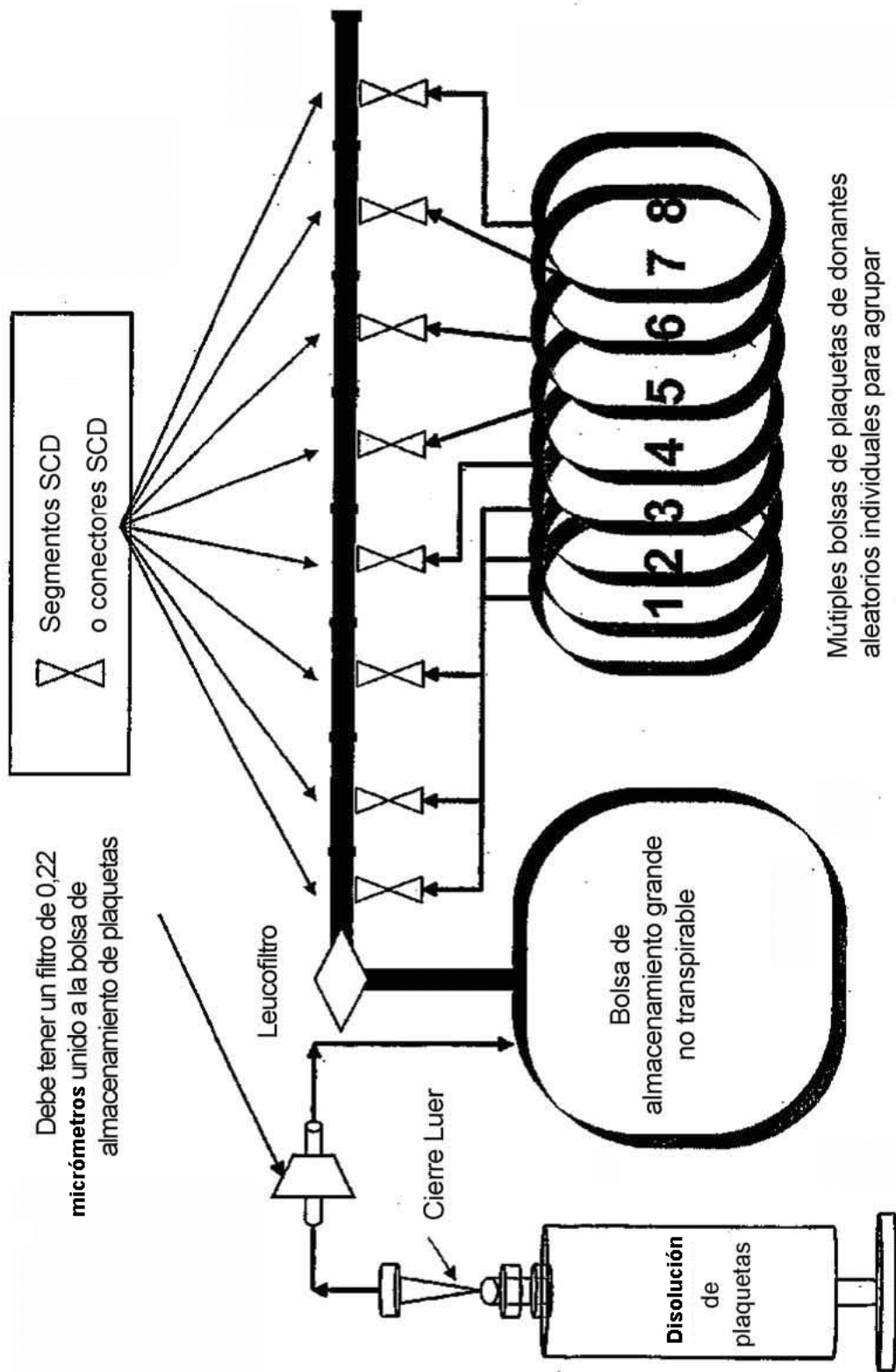


Figura 60

Debe tener un filtro de 0,22 micrómetros
unido a la bolsa de almacenamiento
de plaquetas

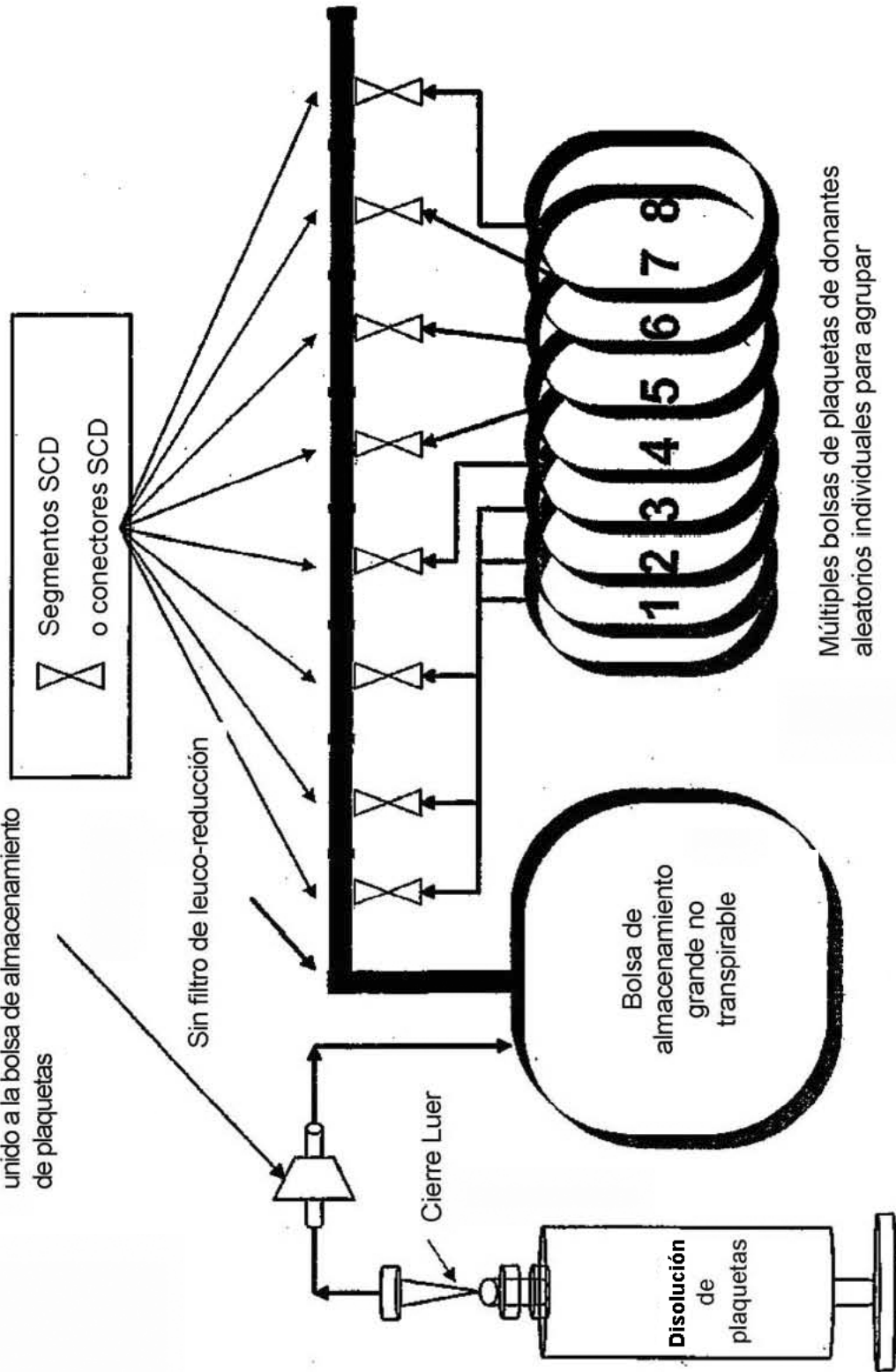


Figura 61

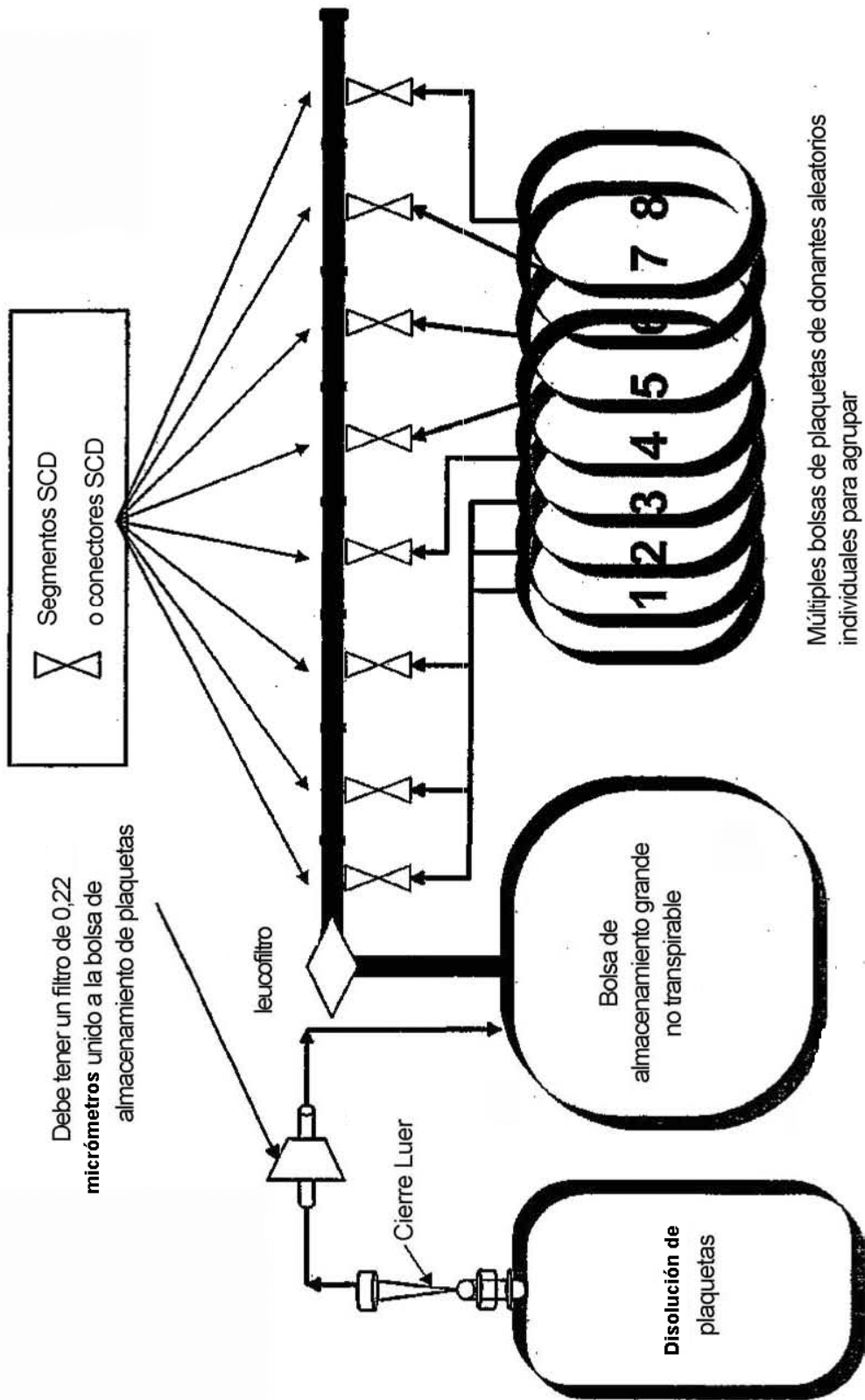


Figura 62

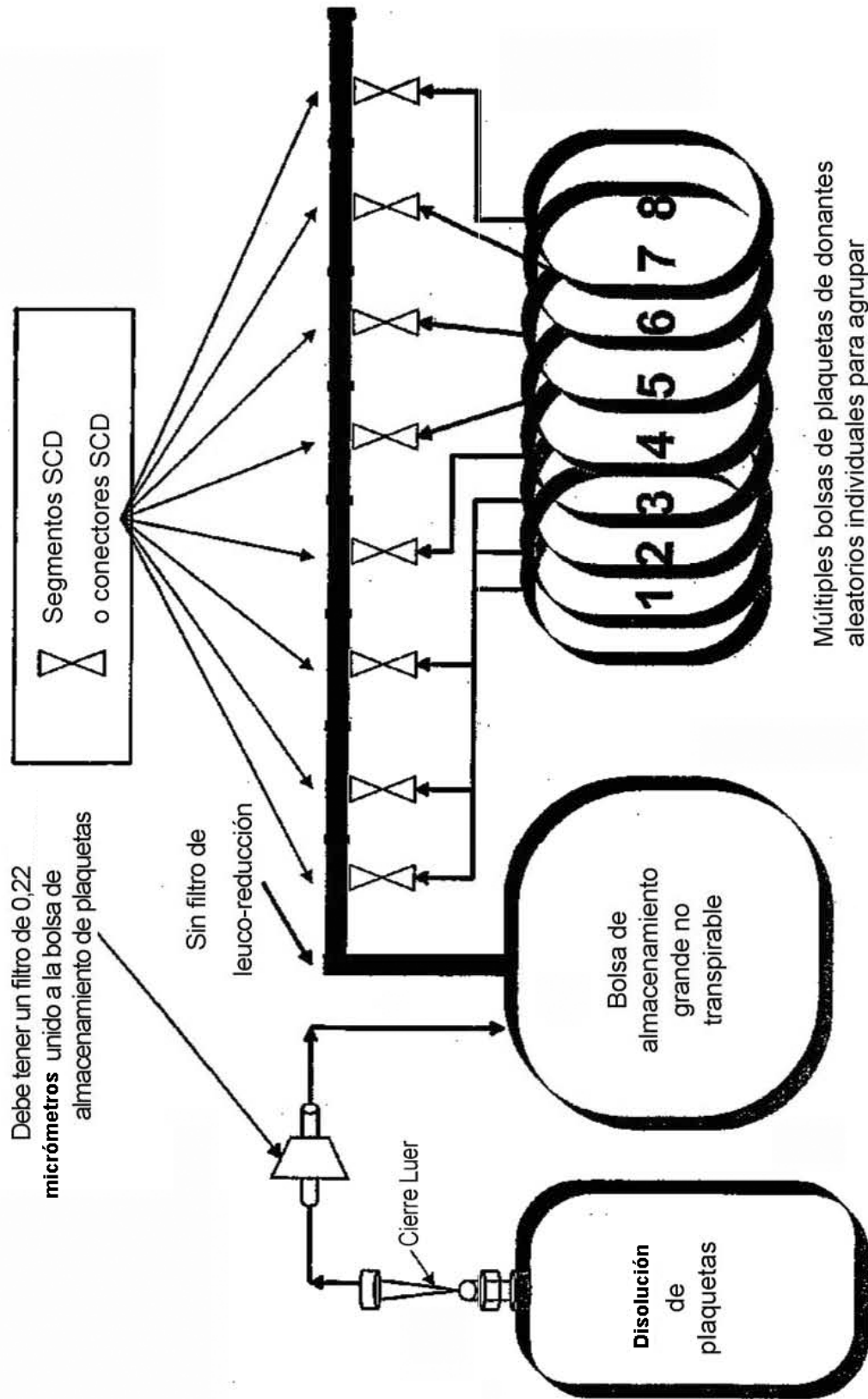


Figura 63

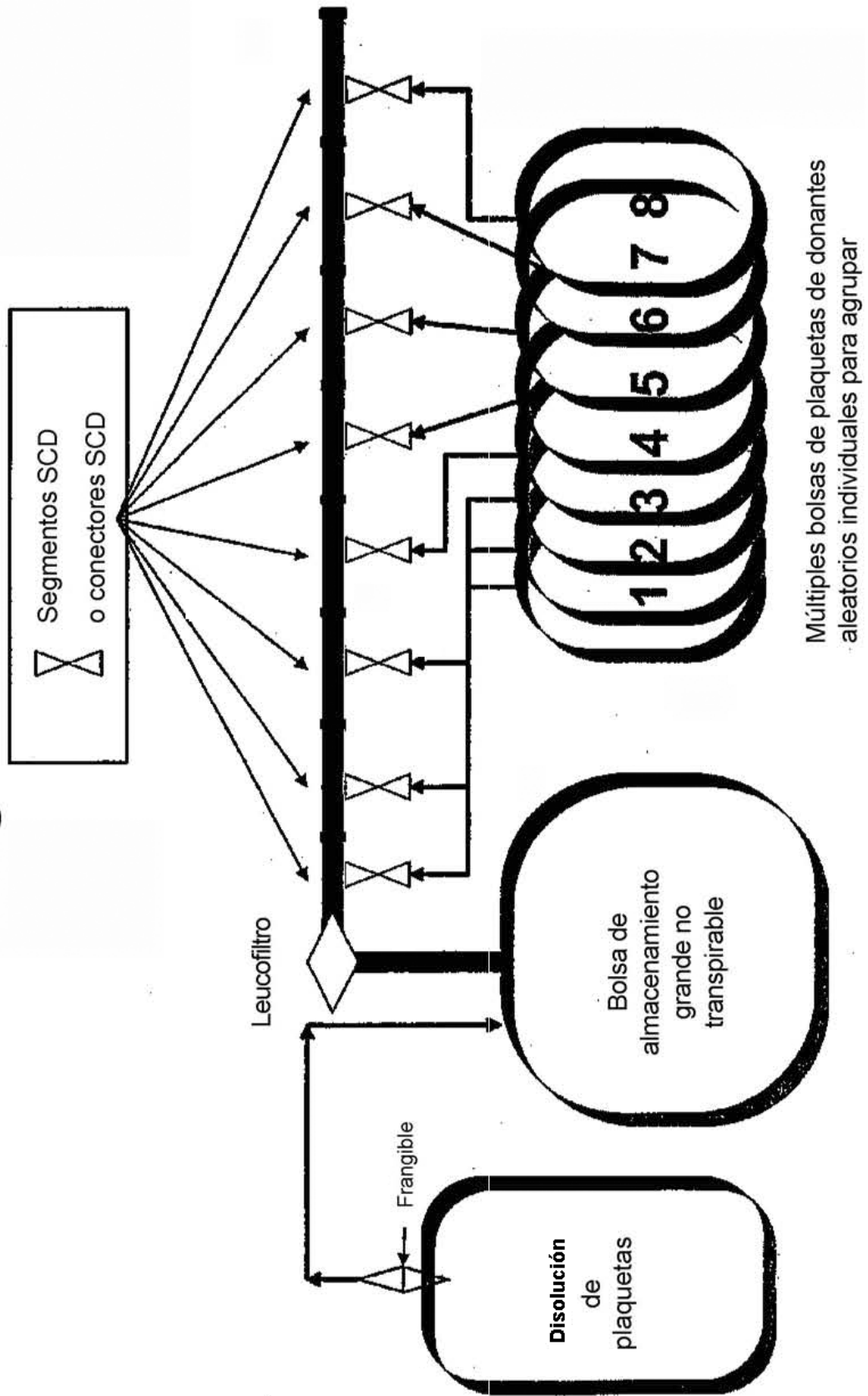


Figura 64

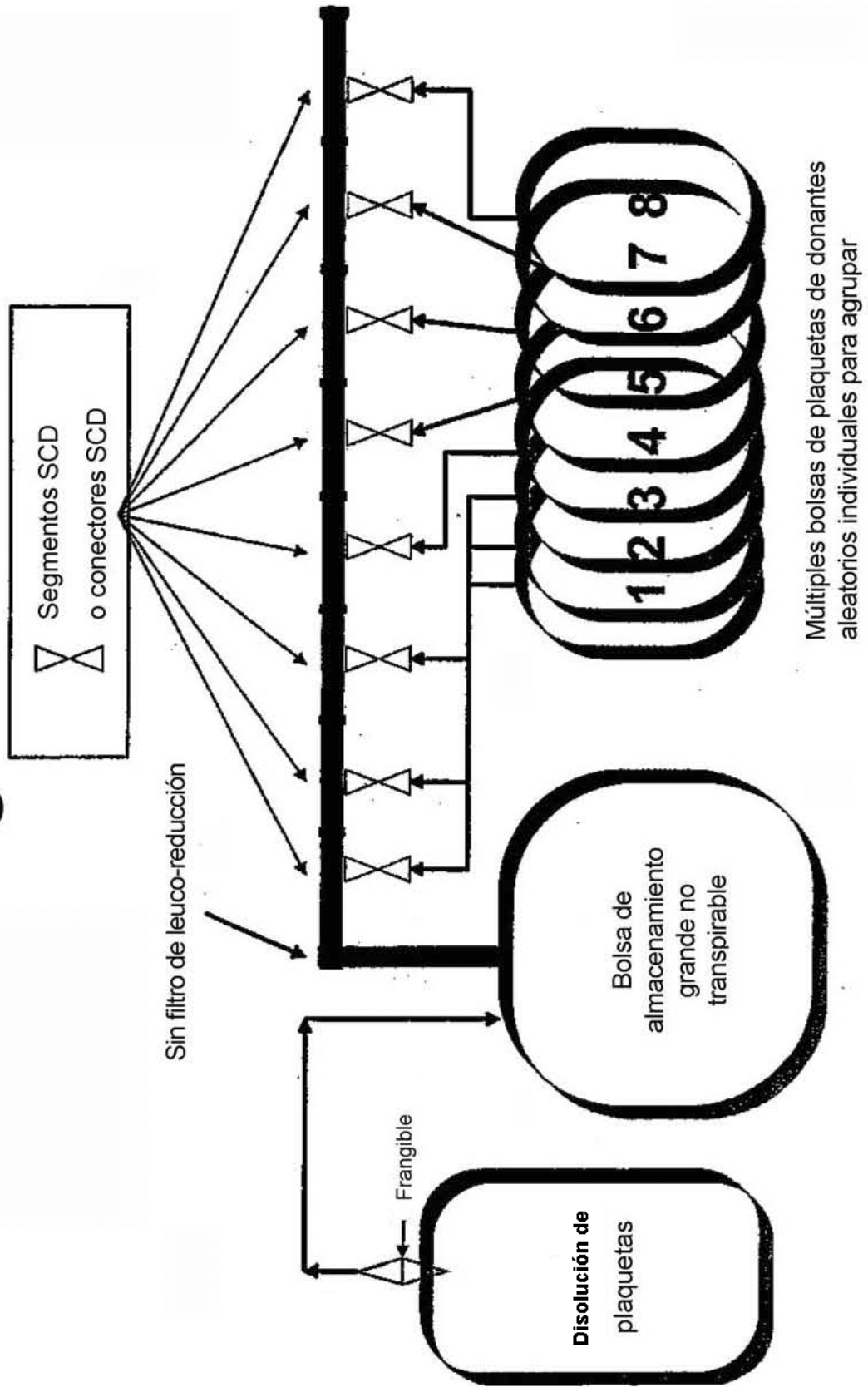


Figura 65

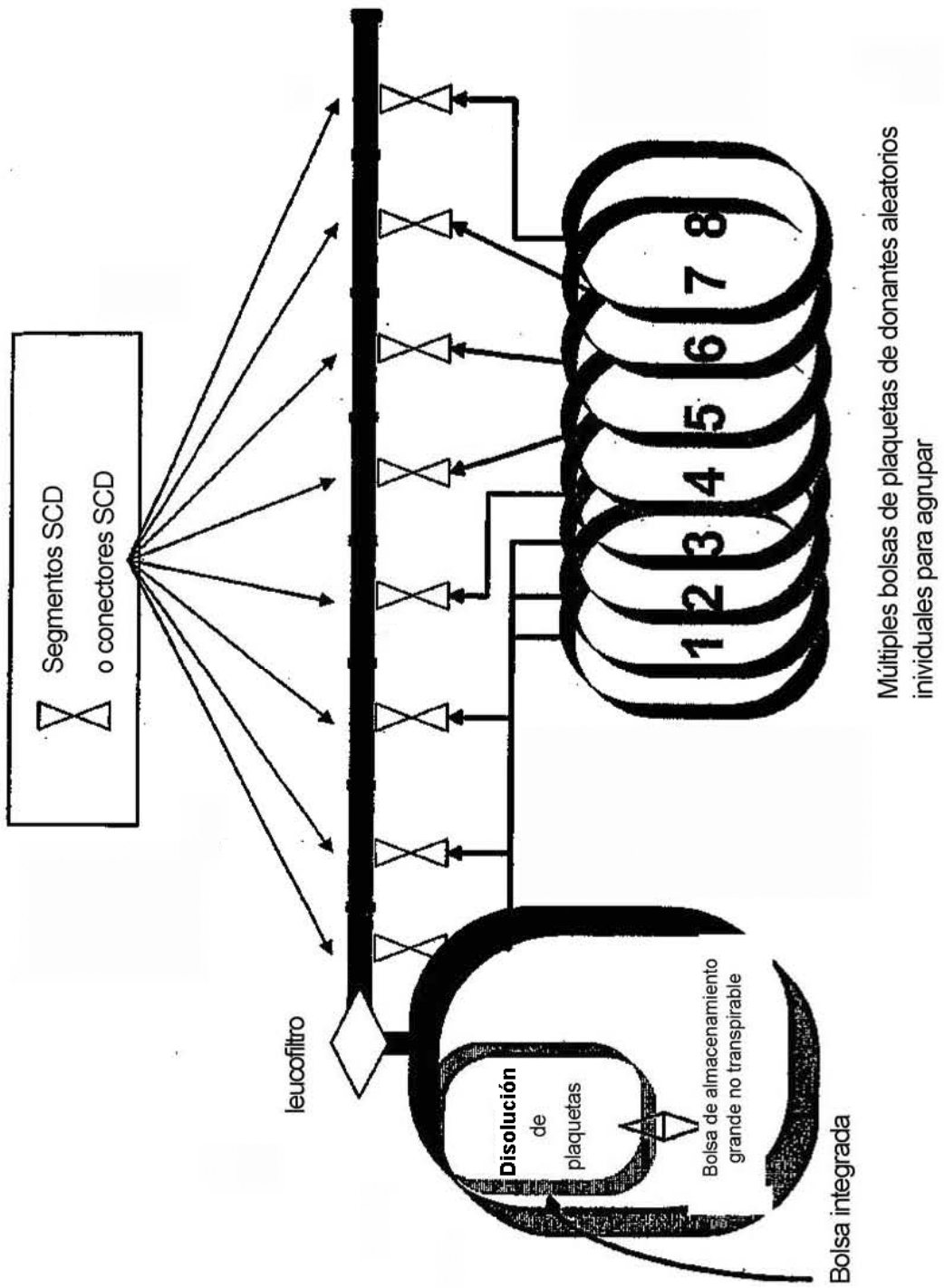


Figura 66

