(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 390 317**

(51) Int. Cl.:
A61K 35/18 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **05849361 .0**
(96) Fecha de presentación: **07.12.2005**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1819230**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **22.08.2007**

(54) Título: **Micropartículas derivadas de glóbulos rojos como agentes hemostáticos para el control de la hemorragia y para el tratamiento de trastornos hemorrágicos**

(30) Prioridad:
07.12.2004 US 633417 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.11.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.11.2012

(73) Titular/es:
UNIVERSITY OF MIAMI (100.0%)
1600 NORTHWEST 10TH AVENUE
MIAMI, FL 33136, US

(72) Inventor/es:
JY, WENCHE;
JIMENEZ, JOAQUIN J.;
HORSTMANN, LAWRENCE L.;
AHN, YEON S. y
AHN, EUGENE

(74) Agente/Representante:
SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 390 317 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Micropartículas derivadas de glóbulos rojos como agentes hemostáticos para el control de la hemorragia y para el tratamiento de trastornos hemorrágicos

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

La invención se refiere al uso de micropartículas derivadas de glóbulos rojos que promueven la adhesión y agregación plaquetarias, la formación de coágulos sanguíneos en un método para tratar trastornos hemorrágicos, particularmente trastornos de la coagulación sanguínea, trastornos de la función plaquetaria en el caso de bajos recuentos de plaquetas. La invención también es útil en la minimización de la pérdida de sangre en un mamífero, en particular en pacientes con traumatismo, pacientes que se someten a procedimientos quirúrgicos o médicos invasivos en los que puede ser sustancial la pérdida de sangre.

2. Antecedentes

(A) Trastornos hemorrágicos clínicos

(B) Micropartículas derivadas de células (C-MP, *cell-derived microparticles*).

2(A). Trastornos hemorrágicos clínicos

Varios trastornos médicos que se manifiestan con una hemorragia prolongada pueden clasificarse en (i) trastornos plaquetarios, (ii) trastornos de la coagulación y (iii) trastornos hemorrágicos indefinidos.

(i) Trastornos plaquetarios. Los pacientes con trastornos plaquetarios a menudo sangran de manera excesiva debido a que el número de plaquetas es insuficiente (trombocitopenia) o la función plaquetaria está alterada, aunque los recuentos de plaquetas son normales (disfunción plaquetaria). Por ejemplo, los pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) tienen insuficientes plaquetas y padecen una fácil aparición de hematomas y hemorragia. La trombocitopenia (bajos recuentos de plaquetas) puede estar causada por medicamentos, especialmente tras regímenes intensos de quimioterapia. Muchos fármacos, por ejemplo la aspirina, alteran la función plaquetaria, conduciendo a una hemorragia excesiva aunque los recuentos de plaquetas de los pacientes pueden ser normales. Alguna enfermedad sistémica también puede causar una forma adquirida de trastornos plaquetarios. Las trombocitopenias o disfunciones plaquetarias pueden ser congénitas o adquiridas.

(ii) Trastornos de la coagulación. Un grupo de trastornos hemorrágicos genéticos, incluyendo la enfermedad de von Willebrand (EvW) y otros trastornos de la coagulación, se caracterizan por el aspecto común de hemorragia prolongada. En muchos de estos pacientes con trastornos de la coagulación, existe una insuficiencia en la cantidad y/o función de factores de coagulación tales como el factor ocho (FVIII) o el factor de von Willebrand (FvW) en la sangre u otros factores de coagulación. FvW promueve la adhesión y agregación plaquetarias y porta el factor de coagulación VIII (FVIII). FVIII es esencial para la generación de trombina y la posterior coagulación sanguínea.

(iii) Existen muchos trastornos hemorrágicos indefinidos, algunos de los cuales implican la pared del vaso sanguíneo.

Aunque están disponibles diversos tratamientos para los trastornos hemorrágicos, existe una necesidad de métodos de tratamiento con una eficacia aumentada y/o efectos secundarios reducidos. Por ejemplo, actualmente, la transfusión de hemoderivados alogénicos (hemoderivados de donantes, no del paciente) tales como plaquetas y factores de coagulación es la piedra angular del tratamiento de trastornos hemorrágicos. Sin embargo, tales agentes conllevan un riesgo de transmisión de infecciones transmitidas por la sangre tales como hepatitis, virus VIH y pueden inducir reacciones transfusionales mediadas por el sistema inmunitario. Para soslayar estos problemas, se persigue activamente la producción de factores de coagulación recombinantes o pequeñas moléculas eficaces. Algunos de tales agentes están disponibles para uso clínico (Coagulin-A®, Kogenate®, por ejemplo), sin embargo, éstos son todavía muy caros y no todos los pacientes responden a estos agentes. Otros tratamientos comprenden administrar FvW purificado humano o un crioprecipitado de plasma humano que contiene FvW. El FvW inyectado directamente tiene un tiempo de aclaramiento muy corto, complicando adicionalmente la terapia. Además, algunos pacientes rechazan las proteínas foráneas y no responden a estas terapias de sustitución. Otros agentes hemostáticos tales como desmopresina (DDAVP) se usan para tratar a algunos pacientes de hemofilia y EvW, pero muchos pacientes no responden a este tratamiento. Por tanto, sigue habiendo la necesidad de nuevos tratamientos para trastornos hemorrágicos en los que la hemorragia espontánea o inducida por traumatismos son complicaciones frecuentes, algunas veces potencialmente mortales.

La presente invención se ocupa de todos estos problemas mediante el desarrollo de un tratamiento eficaz y seguro

que usa hemoderivados autólogos o hemoderivados heterólogos con capacidad reducida para la transmisión de patógenos transmitidos por la sangre y una capacidad reducida de inducción de respuestas inmunitarias. Este método mejorará la calidad de vida en pacientes con trastornos hemorrágicos y salvará muchas vidas y resolverá adicionalmente una grave escasez de suministro de sangre, un problema creciente en la medicina de transfusión.

2(B). Micropartículas (MP) derivadas de células

Se ha demostrado la liberación de micropartículas (MP) derivadas de membrana celular durante la apoptosis o activación celular. Se ha demostrado la liberación de MP desde plaquetas (MPP), leucocitos (MPL), glóbulos rojos (MPGR) y células endoteliales (MPE) (1-3). La mayor parte de MP tienen expuestos fosfolípidos aniónicos procoagulantes tales como fosfatidilserina (PS) (4-7), que tiene actividad de factor plaquetario 3 (FP3) (8). Se cree que esta actividad es una función principal de las MP *in vivo*. Más recientemente, se ha identificado el factor tisular (FT) en MP de leucocitos (MPL) (9-11), MP endoteliales (MPE) (11-14) y MP de plaquetas (MPP) (10, 15) lo que sugiere además papeles importantes en la hemostasia y la trombosis. Antes de esta descripción, no se ha localizado FT en MPGR.

Los presentes inventores han demostrado previamente que las MPP, MPL, MPE desempeñan papeles importantes en la hemostasia y la trombosis y la inflamación (1-3). Notificaron que los antígenos de superficie en las MPE son distintivos pero que varían dependiendo del tipo de lesión de células endoteliales, por ejemplo apoptosis, activación (34). Las MPE han mostrado que presentan actividad procoagulante y que están relacionadas con muchos estados trombóticos e inflamatorios, incluyendo lupus, EM y otros trastornos inflamatorios crónicos (2, 3, 10). Se conoce además que la MPE porta el factor tisular (FT). No obstante, no se ha dado a conocer un papel funcional de las MP en la mejora de enfermedades. La hipótesis de los presentes inventores era que dado que las MP son procoagulantes, podrían aprovecharse como agentes terapéuticos en trastornos hemorrágicos (3).

Coller y colaboradores conjugaron RGD con glóbulos rojos para hacer que fuesen hemostáticamente activos y denominaron el producto tromboeritrocitos en 1992 [(53) y patente estadounidense n.º 5.328.840)]. Sin embargo, la invención de Coller no da a conocer ni anticipa los usos de las micropartículas de la presente invención. Se han notificado otras preparaciones de liposomas hemostáticos, incluyendo la conjugación de factores de coagulación tales como FVIII (54,55) y fibrinógeno (56,57) con los mismos o partículas de albúmina para producir vesículas hemostáticamente activas. Las modificaciones químicas de liposomas artificiales incluyen moléculas de adhesión específicas de plaquetas tales como GpIIb/IIIa y Ib/IX conjugadas con liposomas sintéticos o con albúmina para producir “plaquetas artificiales” (58-61).

Existen desventajas en estos enfoques. Las micropartículas sintéticas pueden activar la cascada del complemento, creando complicaciones adversas y pueden inducir reacciones inmunitarias, lo que conduce a respuestas autoinmunitarias. Aún no ha surgido ningún método que use MP o células sanguíneas sintéticas que pueda ponerse en práctica clínicamente y existen pocos estudios clínicos de seguimiento. La presente invención emplea micropartículas (MP) novedosas, en particular micropartículas de glóbulos rojos (MPGR, *red cell microparticles*), como agentes para este fin. En una realización, las micropartículas derivadas de células son conjugados con una proteína o factor ausente en un paciente. En la realización preferida, se usan micropartículas de glóbulos rojos derivadas de células autólogas como agentes hemostáticos. Esta realización del método tiene claras ventajas: debido a que la composición es autóloga, se evita la activación del sistema inmunitario causada a menudo por las transfusiones alogénicas o sustancias sintéticas y elimina el riesgo de transmisión de agentes patógenos transmitidos por la sangre. Debido a que los glóbulos rojos son la célula sanguínea más abundante, puede extraerse una pequeña fracción de sangre (50-100 ml de sangre del volumen de sangre completa de más de 5000 ml) de manera segura de los pacientes y pueden generarse MPGR para infundirse de nuevo a los mismos pacientes. El suministro de la composición es seguro y cómodo para el paciente.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para el uso de micropartículas derivadas de glóbulos rojos (MPGR) o sus variantes modificadas químicamente para reducir la hemorragia. En particular, la presente invención es tal como se define en la reivindicación 1.

Las micropartículas derivadas de glóbulos rojos (MPGR) o sus variantes modificadas químicamente pueden usarse para promover la coagulación sanguínea y para potenciar la adhesión y agregación plaquetarias, mejorar la eficacia de coagulación y acortar el tiempo de hemorragia en una variedad de enfermedades y trastornos, incluyendo, pero sin limitarse a, púrpura trombocitopénica idiopática o inmunitaria (PTI), trombocitopenia inducida por fármacos y quimioterapia y otras trombocitopenias de diversas causas, trastornos de la coagulación incluyendo la enfermedad de von Willebrand, hemofilia, y otros trastornos hemorrágicos. También se prevé que la invención incluya una modificación química de MPGR que potenciará la propiedad biológica deseada de las MPGR. Están disponibles comercialmente y se conocen bien en la técnica factores de sustitución recombinantes y purificados. Sin limitarse a un mecanismo, los inventores creen que las micropartículas funcionan provocando una adhesión y agregación plaquetarias más eficaces al inicio de la coagulación, al menos en parte proporcionando factores de coagulación

tales como una forma de FvW, FVIII o sustancia(s) similar(es) en la superficie de las micropartículas, promoviendo y acelerando de ese modo la formación de coágulos sanguíneos. No obstante, los inventores no pretenden verse limitados por esta o cualquier otra teoría.

Pueden formularse micropartículas adecuadas para su uso en la invención en una variedad de maneras. Las MPGR pueden generarse mediante sonicación o incubación con ionóforos de calcio. Las MP así generadas pueden modificarse para aumentar adicionalmente su eficacia para promover la coagulación sanguínea para fines específicos.

En la sangre normal, se encuentra que la abundancia relativa de las MPP, MPE, MPL y MPGR es del 50-70%, el 5-10%, el 10-15% y el 10-15% de las MP totales, respectivamente (figura 13) (63). Diferentes especies de micropartículas muestran diferentes funciones hemostáticas (figura 14) (63).

Las micropartículas pueden administrarse mediante cualquier medio cómodo y eficaz conocido por los expertos en la técnica, particularmente por vía intravenosa, o mediante aplicación directa (por ejemplo tópicamente, o mediante inyección) en un sitio en el que se necesita o se desea la hemostasia. Tales medios se conocerán y/o determinarán fácilmente sin una excesiva experimentación.

La invención también incluye el uso de MPGR tal como se define en las reivindicaciones, por ejemplo para potenciar la adhesión y agregación plaquetarias, mejorar la eficacia de coagulación y acortar el tiempo de hemorragia en una variedad de enfermedades y trastornos, incluyendo, pero sin limitarse a, púrpura trombocitopénica idiopática o inmunitaria, trombocitopenia inducida por fármacos y quimioterapia y otras trombocitopenias, la enfermedad de von Willebrand, hemofilia y otros trastornos hemorrágicos.

Un mamífero que necesita tratamiento puede padecer trastornos plaquetarios o de la coagulación hereditarios o adquiridos. Las trombocitopenias de diversas causas tales como púrpura trombocitopénica idiopática, exposición terapéutica o accidental a agentes citotóxicos que causan trombocitopenia (por ejemplo, quimioterapia contra el cáncer), o funciones plaquetarias alteradas causadas por fármacos o enfermedad sistémica o formas congénitas o adquiridas. Los trastornos de la coagulación incluyen EvW, hemofilias y otras deficiencias de factores de coagulación. Otros trastornos de la hemostasia, no bien definidos, tales como trastornos de los vasos sanguíneos, pueden beneficiarse de la invención. Las micropartículas descritas en el presente documento potenciarán la coagulación y la hemostasia, aliviando de ese modo la hemorragia excesiva. Pueden determinarse dosificaciones eficaces de micropartículas sin una excesiva experimentación por los expertos en la técnica y se espera generalmente que estén entre 10^6 y 10^{12}/kg, más habitualmente entre 10^8 y 10^{10}/kg.

Las MPGR pueden administrarse en cualquier composición farmacéutica adecuada según las técnicas farmacéuticas, incluyendo solución salina tamponada con fosfato (PBS) u otros tampones fisiológicamente aceptables conocidos por los expertos en la técnica, y opcionalmente con compuestos terapéuticos adicionales, excipientes y vehículos tal como pueda considerarse ventajoso. El pH del tampón debe ser generalmente igual a o menor que 7,4.

Aunque la utilidad de la presente invención no depende de ninguna teoría, los inventores creen que las MPE liberadas durante una lesión vascular pueden ayudar a detener la hemorragia al interaccionar rápidamente con factores de coagulación y/o plaquetas mediante adhesinas y multímeros de FvW asociados a membrana para estabilizar los agregados plaquetarios en el microentorno local y las MPGR liberadas de los glóbulos rojos pueden proporcionar factores de coagulación tales como el factor tisular y superficies de fosfolípidos para promover la formación de coágulos sanguíneos.

Se ha encontrado que el uso de las MPGR puede ser particularmente ventajoso. En una realización, se usan los propios glóbulos rojos de un individuo para producir MPGR que van a administrarse a ese individuo. Puesto que los glóbulos rojos son abundantes, se recogerá una pequeña parte de los glóbulos rojos de manera segura de, por ejemplo, un paciente que necesita tratamiento de un trastorno hemorrágico, o aquéllos que se someten a cirugías o lesionados por un traumatismo, se producirán MPGR para usarse para el tratamiento y para reducir la pérdida de sangre. Las MPGR pueden expresar FT y/o FVIII de forma natural o las MPGR pueden tratarse *ex vivo* para que expresen o suministren tales factores. Un método de preparación de MPGR para el tratamiento de trastornos hemorrágicos se describe a continuación en el presente documento. En una realización de la invención, pueden usarse MPGR que expresan FT como el agente hemostático básico o universal en la prevención de la hemorragia en pacientes con trastornos hemorrágicos o cualquiera en riesgo de desarrollar hemorragia, tal como pacientes en cirugía, lesión traumática o determinados procedimientos terapéuticos o de diagnóstico invasivos tales como cateterización cardiaca, broncoscopia, colonoscopia y endoscopia, punción pleural o espinal, arteriograma, venograma y diversos procedimientos de biopsia, etc. para fines de diagnóstico así como la inserción de vías i.v. o centrales o la inserción de catéteres especiales para diálisis, endoprótesis para el corazón u otros órganos, plasmaféresis, recogida de células madre, etc. para fines terapéuticos.

Las MPGR generadas mediante sonicación u otros métodos parecen ser hemostáticamente activas y útiles para el

fin de reducir la hemorragia. Pero en determinados estados, pueden ser necesarias medidas adicionales para mejorar su eficacia. Según se requiera, pueden modificarse las MPGR para hacer que sean más eficaces, denominadas MPGR modificadas hemostáticamente (MPGRmh). Las MPGRmh también pueden transfundirse a pacientes para reducir la pérdida de sangre o tratar estados hemorrágicos. El uso de las MPGR en comparación con otras terapias convencionales eliminará las infecciones transmitidas por la sangre tales como WV, hepatitis, etc. lo que potencia la seguridad de los pacientes. También se eliminará el riesgo de reacción autoinmunitaria frente a materiales sintéticos o foráneos, que puede producirse cuando se usan vesículas sintéticas, etc., y elimina de ese modo el riesgo de enfermedades autoinmunitarias como complicaciones a largo plazo. Además, la preparación de las MPGR es mucho más económica que la preparación de otras micropartículas derivadas de células o vesículas de membrana sintéticas. Por tanto, este enfoque novedoso del uso de MPGR obtenidas de la propia sangre del individuo para tratar sus complicaciones hemorrágicas anticipadas o activas eliminará los posibles efectos secundarios graves y comunes de la transfusión de sangre o la infusión de materiales foráneos.

Se realiza un aumento por adición a las MPGR. Por ejemplo, pueden unirse el factor tisular (FT), fibrinógeno, péptido RDG u otras adhesinas a las MPGR. Muchos productos purificados químicamente o recombinantes, esencialmente libres de agentes infecciosos transmitidos por la sangre, están disponibles y pueden usarse para este fin. En particular, según la presente invención, las MPGR o variantes modificadas químicamente de las mismas se producen mediante injerto o conjugación de moléculas de adhesión o factores de coagulación recombinantes en la superficie de las MPGR. Se conocen bien en la técnica métodos de conjugación de proteínas o péptidos específicos con vesículas de fosfolípidos (PL), véase en particular el texto completo de Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques (54). Las micropartículas derivadas de células son esencialmente vesículas de PL, se espera razonablemente que puedan aplicarse los mismos métodos.

Pueden tratarse pacientes específicos que padecen una insuficiencia de factor particular con MP conjugadas con ese factor para corregir o mejorar ese trastorno hemorrágico particular. Por ejemplo, los pacientes con hemofilia pueden tratarse con MP conjugadas con FVIII, usando MP generadas a partir de sus propios glóbulos rojos (MPGR autólogas). De manera similar, el FvW puede conjugarse con MPGR en el tratamiento de aquellas personas con enfermedad de von Wilbrand. Están disponibles productos purificados o recombinantes o libres de agentes infecciosos transmitidos por la sangre para la conjugación con MPGR para dar MPGR modificadas hemostáticamente (MPGRmh).

La terapia con MPGR reducirá o eliminará la necesidad de transfusión de sangre alogénica en muchos pacientes. Al reducir la necesidad de una transfusión de sangre repetida o intensa, esta terapia disminuirá sustancialmente las escaseces en el suministro de sangre, un problema cada vez más crítico en la medicina.

Los individuos que se benefician de MPGR y MPGRmh y sus variantes modificadas químicamente incluyen pacientes con diversos trastornos de la coagulación sanguínea, trastornos plaquetarios tales como trombocitopenia o disfunciones plaquetarias así como trastornos hemorrágicos y trastornos hemorrágicos indefinidos causados por problemas en la pared de vasos sanguíneos. Además, los individuos que debe someterse a cirugía mayor o procedimientos de diagnóstico invasivos en los que la hemorragia es a menudo una complicación, o los individuos que esperan de otro modo una pérdida significativa de sangre, pueden beneficiarse mediante la infusión de MPGR o MPGRmh. Puede derivarse un beneficio o bien de la preparación de MP preparación de la propia sangre del paciente, si el tiempo lo permite, o bien derivarse de MPGR o MPGRmh derivadas de sangre de un donante. Además, los individuos que son propensos a lesión o traumatismo pueden beneficiarse de la infusión previa de sus propias MPGR (por ejemplo, individuos con problemas de equilibrio, y los que participan en actividades en las que un traumatismo físico es un riesgo, tales como jugadores de hockey, boxeadores profesionales, etc.). También se beneficiarán de la terapia con MPGR pacientes que se someten a quimioterapia o cualquier terapia médica que predispone a un paciente a un aumento del riesgo de hemorragia, los pacientes que desarrollan coagulopatía o disfunción plaquetaria u otros estados hemorrágicos asociados con una terapia médica o quirúrgica, los pacientes que tienen complicaciones hemorrágicas debidas a sobredosis de medicamentos tales como Coumadin u otros diluyentes de la sangre o fármacos antiplaquetarios para prevenir los coágulos sanguíneos, y los pacientes con enfermedades crónicas que predisponen a un aumento del riesgo de hemorragia tales como insuficiencia renal crónica, enfermedades hepáticas crónicas o cualquier otra enfermedad que aumente los riesgos de hemorragia.

Las MPGR pueden almacenarse (por ejemplo, como componentes en kits) y usarse cuando se necesiten por aquellas personas que son propensas a sangrar o que esperan procedimientos que provocan una hemorragia significativa.

Tal como se usa en el presente documento, un “estado de hemorragia excesiva” es cualquier estado que causa o puede causar que una hemorragia se prolongue o sea mayor de lo normal. Tales estados incluyen, pero no se limitan a, trastornos hemorrágicos clínicos tales como púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia inducida por fármacos o quimioterapia, trombocitopenias de diversas causas, tanto congénitas como adquiridas o disfunciones plaquetarias debidas a diversas causas, tanto congénitas como adquiridas o trastornos de la coagulación incluyendo la enfermedad de von Willebrand o hemofilia u otros trastornos de la coagulación, tanto congénitos como adquiridos, traumatismo físico, procedimientos de diagnóstico invasivos y cirugía.

Breve descripción de los dibujos

Los ejemplos 1-8 y las figuras 1-8 son únicamente para fines ilustrativos y no reflejan la presente invención.

Figura 1. Comparación de la formación de agregados plaquetarios inducida por MPE en presencia o ausencia de ristocetina. En presencia de ristocetina (1 mg/ml), las MPE renales ($4x10^7$ /ml) indujeron una fuerte agregación plaquetaria similar a la que se indujo mediante un 8% de plasma. Ambas agregaciones plaquetarias inducidas por MPE y plasma se inhibieron mediante un Acm anti-CD42b de bloqueo (CD42b es el sitio de unión al receptor para el factor de von Willebrand (FvW) y la trombina ubicados en plaquetas). En cambio, las MPE indujeron una escasa agregación plaquetaria en ausencia de ristocetina. N= 5; media ± D.E. * indica p <0,01 comparando entre el grupo de "plasma+ristocetina+a-CD42b" y el grupo de "plasma+ristocetina", y ** indica p < 0,03 comparando entonces entre el grupo de "MPE+ristocetina+a-CD42b" y el grupo de "MPE+ristocetina".

Figura 2. Curvas de dosis-respuesta de la formación de agregados plaquetarios inducida por plasma, Humate-P o MPE en presencia de ristocetina. Las curvas de dosis-respuesta de la agregación plaquetaria inducida por MPE renales/ristocetina mostraron que la actividad del cofactor FvW de $1x10^7$ MPE/ml es equivalente a un 3,5% de plasma o 0,075 U/ml de Humate-P. N= 5; media ± D.E.

Figura 3. Efectos de la filtración a través de 0,1 μm sobre la formación de agregados plaquetarios inducida por plasma, Humate-P o MPE en presencia de ristocetina. La filtración a través de un filtro de 0,1 μm suprimió enormemente la agregación plaquetaria inducida por las MPE renales pero tuvo un pequeño efecto o ningún efecto sobre la agregación plaquetaria inducida por plasma o Humate-P. N= 4; media ± D.E. * indica p < 0,01 comparando entre el grupo de "MPE filtradas "y el grupo de "MPE no filtradas".

Figura 4. Transcurso temporal de la disociación de agregados plaquetarios formados por plasma o MPE. Tras inducirse los agregados plaquetarios durante 20 min., se diluyeron las mezclas con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (1:20) para iniciar la disociación de agregados. A intervalos, se sometieron las muestras a ensayo para determinar aumentos de plaquetas libres según se mide mediante citometría de flujo. El tiempo de la disociación al 50% para plasma, Humate-P y MPE fue de 15, 25 y 60 min. respectivamente. N = 4; media ± D.E.

Figura 5. Los agregados plaquetarios inducidos por MPE o plasma de púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) son más resistentes a la disociación que los inducidos por plasma normal con o sin filtración a través de 0,1 μm. Se incubaron el cuatro por ciento de PPP de cuatro pacientes con PTT diferentes en fases agudas y plasma de control con plaquetas y ristocetina durante 20 min., luego se diluyeron las mezclas con un gran volumen de PBS (1:20) para iniciar la disociación de los agregados tal como se describe en la figura 5. Esta figura muestra que los agregados plaquetarios inducidos por MPE o plasma de PTT son más resistentes a la disociación que los inducidos por plasma normal. La filtración de plasma de PTT dio como resultado una pérdida de aproximadamente el 20-30% de la disociación de los agregados. Para los controles, cada punto de datos es la media de 6 muestras. Para plasma de PTT, cada punto de datos es la media de 4 muestras diferentes.

Figura 6. La adición de MPE a plasma de EvW rescató la actividad de agregación plaquetaria de plasma de EvW. La adición de MPE o Humate-P a plasma de EvW restauró la actividad de agregación plaquetaria de plasma de EvW. Se logró un efecto sinérgico combinando una baja concentración de MPE (5×10^6/ml) con una dosis baja de Humate-P (0,1 U/ml). N = 4; media ± D.E.

Figura 7. Análisis de multímeros de FvW de diferentes fuentes mediante electroforesis en gel del agarosa al 0,8% e inmunotransferencia de tipo Western. Carril 1, plasma de un paciente con EvW de tipo 1 (5 μl); carril 2, plasma de un paciente con PTT en fase aguda (5 μl); carril 3, plasma de un control normal (5 μl); carril 4, MPE renales (recuentos de 2×10^7); carril 5, Humate-P diluido (0,01 U).

Figura 8. Efecto de micropartículas endoteliales sobre la actividad hemostática en un modelo de trombocitopenia *in vivo*. Se les administró a ratas Fischer adultas una dosis única de ciclofosfamida (CTX, 75 mg/kg) por vía intraperitoneal para inducir trombocitopenia, y se expusieron después de 4-5 días mediante corte de la cola. Los resultados muestran el tiempo de hemorragia en animales control, tratados con CTX y tratados con CTX+MPE.

Figura 9. Estudios de laboratorio clínico que comparan MPGR en pacientes con PTI clásica con aquéllos (véanse los pacientes A y B de estudios de casos en el texto) que se han liberado a largo plazo de la hemorragia. Los datos sobre dos pacientes con PTI (casos A y B) con PTI grave (recuentos de plaquetas de 10.000 o inferior) que han mostrado escasas hemorragias a lo largo de 30 años se compararon con los de pacientes con PTI típica, que manifiestan síntomas de hemorragia habituales, y con controles sanos. Las MPP, MPE, MPL, pruebas de coagulación y bioquímicas sanguíneas fueron similares entre todos los pacientes con PTI, incluyendo los casos A y B. La única distinción de los casos A y B fue MPGR excepcionalmente alta.

Figura10. Expresión de FT, FVIII, anexina V en MPGR generadas mediante tres métodos (ionóforo, sonicación y

anti-D). Los resultados muestran una expresión positiva en MPGR para FT (mostrado en barras en blanco), FVIII (barras de sombreado sencillo), AnnV (barras de sombreado doble), expresada como una fracción de las MPGR totales; las MPGR totales se define como el número de partículas positivas para glicoforina.

Figura 11. Actividad procoagulante de MPGR y MPL *in vitro*. Se añadieron MPGR o MPL a 1 x 10^8 a PRP en presencia de inhibidor de tripsina de maíz (1 U/ml), luego se añadió calcio (10 mM) para iniciar el proceso de coagulación. Los resultados mostraron que las MPGR son más potentes que las MPL en la promoción de la formación de coágulos.

Figura 12. Actividad hemostática de MPGR *in vivo*. A tres ratas Fischer adultas se les administró una dosis única de ciclofosfamida (CTX, 75 mg/kg) por vía intraperitoneal para inducir trombocitopenia (bajo recuento de plaquetas), luego se sometieron a prueba para determinar el tiempo de hemorragia después de 4-5 días mediante corte de la cola. Tal como se muestra, el tratamiento con CTX da como resultado un tiempo de hemorragia prolongado (760 s) en comparación con 60 s de la rata control (no tratada con CTX). Cuando se les infundió a las ratas tratadas con CTX dos dosis de MPGR at 1 x 10^7 y 1 x 10^8, se acortaron drásticamente sus tiempos de hemorragia. A una dosis mayor (1 x 10^8), se acortó el tiempo de hemorragia hasta 220 s.

Figura 13. Abundancia relativa de micropartículas derivadas de células en sangre normal. Se sometieron a ensayo los números de MPP, MPE, MPL y MPGR en plasma mediante citometría de flujo. El diagrama de sectores circulares muestra la abundancia relativa de estos cuatro tipos de micropartículas en plasma normal.

Figura 14. Diferentes especies de micropartículas ejercen diferentes funciones hemostáticas. Tal como se muestra en la figura, micropartículas de FvW+ inducen la adhesión y agregación plaquetarias. Micropartículas de FT+/PS+ inician y promueven la coagulación sanguínea. Las micropartículas CD62+/CD54+ sirven como mensajeros difundibles para activar los leucocitos.

Descripción detallada

Se ha mostrado previamente que el FvW se une a subespecies de MPE (32), pero no se conocía la significación funcional. Los resultados descritos a continuación en el presente documento demuestran que la interacción plaqueta-MPE está mediada a través de FvW, y se compara la estabilidad de los agregados plaquetarios formados por MPE con los formados por plasma normal, Humate-P y plasma de PTT. Además, se estudió el efecto de MPE positivas para FvW sobre la capacidad de agregación inducida por ristocetina de plasma de pacientes con la enfermedad de von Willebrand (EvW). Además, se ha comparado y correlacionado el tamaño de los multímeros de FvW entre FVW unido a MPE frente a FvW soluble de plasma normal y de PTT, y Humate-P con la estabilidad de los agregados plaquetarios. Adicionalmente, se presentan resultados de dos pacientes con PTI grave que se correlacionan con altos niveles de MPGR con un número reducido de episodios hemorrágicos en comparación con la población promedio de pacientes con PTI, y datos de laboratorio *in vitro* que demuestran que las MPGR son agentes hemostáticos eficaces.

Materiales y métodos

Materiales

Se obtuvieron células endoteliales cultivadas humanas de origen renal o cerebral, y de arteria coronaria de Cell Systems (Kirkland, WA). Se obtuvo el anticuerpo anti-CD62E marcado con FITC (clon 1.2B6, n.º de cat. F-0674) de Sigma (St. Louis, MO). Se obtuvieron el anticuerpo anti-CD42b (clon SZ2, n.º de cat. IM0409) y CD41 (n.º de cat. IM0649) de Beckman-Coulter (Miami, FL). Se adquirió anticuerpo anti-FvW conjugado con HRP (n.º de cat. AHP 062-P) de Serotec Inc. (Raleigh, NC). Se obtuvieron los instrumentos y reactivos para la electroforesis en gel de Bio-Rad (Richmond, CA). Se adquirió ristocetina (Sigma, St. Louis, MO) de Chrono-Log. Se obtuvo Humate-P®, un reactivo terapéutico que contiene factor VIII concentrado y multímeros de FvW, de Aventis-Behring (Marburg, Alemania). Se adquirieron otros productos químicos de Sigma (St. Louis, MO).

Preparación de MPE y plaquetas Se activaron células endoteliales (CE) cultivadas humanas de origen renal, cerebral o de arteria coronaria con TNF-α (10 ng/ml) durante 24 h para inducir la generación de MPE (13). Luego se centrifugaron los sobrenadantes de cultivo a 15.000 x g durante 30 min. para sedimentar las MPE, que luego se lavaron 3X con tampón PBS y se resuspendieron en PBS hasta 1/10 de su volumen original. Se midió la concentración de MPE mediante citometría de flujo usando anticuerpo anti-CD62E marcado con FITC tal como se describió por Jimenez *et al*. (33). Se prepararon plaquetas lavadas mediante centrifugación de plasma rico en plaquetas (PRP) a 600 g durante 10 min. en presencia de 10 mM de EGTA y 1 μM de PGE_1. Se lavaron dos veces los sedimentos con PBS, y luego se suspendieron en PBS a 1x10^8/ml:

Ensayo de la interacción MPE-plaqueta y agregación dependiente de ristocetina mediante citometría de flujo. Se incubaron MPE a una concentración final de 5 – 1,00x 10^6/ml con plaquetas lavadas normales a 1x10^7/ml final, en presencia o ausencia de ristocetina (1 mg/ml) durante 10 min. con agitación orbital suave (100 rpm). Se sometió a

ensayo la unión de MPE a plaquetas mediante la coexpresión del marcador de MPE CD62E con el marcador de plaquetas CD41 en citometría de flujo. En esos experimentos, se usó plasma a desde el 1% hasta el 15% tal como se indica; y Humate-P a desde 0,02 hasta 0,4 U/ml tal como se indica. Se midió la agregación plaquetaria mediante citometría de flujo (34) mediante el recuento del número de plaquetas libres (<5 um) desplazado a un mapa de bits que representa los agregados plaquetarios (> 5 um). La velocidad de flujo del citómetro de flujo Coulter XL estaba en un ajuste medio y el discriminador era la dispersión frontal (DF), nivel 3. Se calibró el número de plaquetas con perlas convencionales con concentraciones conocidas. Se observó una disminución en las plaquetas libres individuales (acompañada por un aumento en el número de agregados plaquetarios) cuando estaba presente ristocetina en el plasma. Al máximo de plasma o Humate-P más ristocetina (1 mg/ml), sólo < 5% de plaquetas permanecieron siendo individuales (libres). Se midió la reducción del número de plaquetas individuales con y sin ristocetina como un indicador de la formación de agregados plaquetarios en vez de contar el número de microagregados debido a que esto último es ambiguo por una distribución de tamaño heterogénea y la adhesión a los tubos y la cámara de flujo.

Disociación de agregados plaquetarios inducidos por ristocetina Después de 20 minutes de la formación de agregados plaquetarios a temperatura ambiente, se diluyeron las mezclas con PBS (razón en volumen de 1:20) para inducir una disociación dependiente del tiempo. Se monitorizaron los aumentos en los recuentos de plaquetas libres tras dilución a intervalos para determinar el transcurso temporal de la disociación de los agregados plaquetarios mediante citometría de flujo.

Análisis de multímeros de FvW. Se empleó el método de Raines, *et al*. (36) con modificaciones menores tal como sigue. Se logró el enfriamiento durante la electroforesis apoyando el aparato de electroforesis en gel horizontal sobre un bloque de aluminio sumergido en una suspensión de hielo-agua y también se pusieron en hielo las cámaras de tampón. Se sometieron a prueba varias concentraciones de gel de agarosa y se encontró que el 0,8% era óptimo para mostrar un amplio intervalo de tamaños de multímero. La inmunotransferencia de tipo Western fue según Raines *et al* excepto porque el anticuerpo anti-FvW se conjugó previamente con HRP (Serotec Inc., Raleigh, NC; n.º de cat. AHP 062-P) y se usó a una dilución 1:500 (50 ul en 25 ml). Se transfirieron las proteínas en el gel a una membrana de PVDF mediante difusión capilar con capas de toallitas de papel encima de la membrana de PVDF durante la noche con PBS como tampón de transferencia. Luego se bloqueó la membrana de PVDF con disolución de caseína al 0,5%. Se logró la tinción de la membrana de PVDF mediante el método de Nakane (37) usando el colorante 4-cloro-1-naftol (4CN; Sigma, n.º de cat. C-8890) recién preparado disolviendo 30 mg en 5 ml de etanol, luego enrasando a 100 ml añadiendo tampón Tris 50 mM, pH 7,6 que contenía H_2O_2 al 0,03% (1 ml de H_2O_2 al 3% en 100 ml).

Estudios clínicos. Para los ejemplos 4-6, se obtuvo sangre citrada de cuatro pacientes con PTT y cuatro con EvW de tipo I. Los cuatro pacientes con PTT presentaban todos la clásica triada de PTT; trombocitopenia grave (recuento de plaquetas <2 x 10^7/ml), anemia hemolítica microangiopática y disfunción mental. Los pacientes con EvW de tipo I se caracterizaban por una baja cantidad de antígeno total de FvW y una actividad deficiente del cofactor de ristocetina. Se aprobó el protocolo por el comité de revisión institucional, y se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes. Para el ejemplo 8, se obtuvo sangre (citrada para optimizar la conservación) de pacientes con PTI atípica ("sin hemorragias"), se caracterizó en estudios clínicos convencionales y se comparó con controles normales y pacientes con PTI típica.

Análisis estadístico. Para comparar tres grupos o más, se usó ANOVA de una vía para determinar los valores de p. Si $p < 0,05$, entonces se usó una prueba de la t de Student de dos colas para analizar la significación ($p < 0,05$) de la diferencia entre la medias de dos grupos. En los casos en los que los datos no pasaron la prueba de normalidad, entonces se usó la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney. Todos los análisis de datos se realizaron usando el programa basado en Windows, Statmost.

Métodos para la producción de micropartículas.

1. MICROPARTÍCULAS DE PLAQUETAS.

Las micropartículas de plaquetas pueden prepararse mediante al menos tres métodos diferentes, tal como se indica a continuación, y tal como se conocen bien por un experto en la técnica.

1) Fuente de bancos de sangre. Las plaquetas almacenadas liberan abundantes MPP con el tiempo (véase la sección 4.5, "Lesión por almacenamiento de plaquetas", de la referencia 1) Este método puede utilizarse para hacer uso de concentrados de plaquetas que han caducado en hasta 5 días, que normalmente se desechan.

Procedimiento: se sedimentan las plaquetas caducadas en 1-5 días mediante centrifugación durante 10 min. a 200 x g, temperatura ambiente, de forma estéril. Observando una técnica estéril, se diluye el sobrenadante hasta un volumen doble añadiendo PBS/citrato, luego se sedimentan las micropartículas mediante centrifugación a 8.000 x g durante 30 min. Pueden refrigerarse las MPP resuspendidas para su almacenamiento, luego volverse a lavar antes de su uso. Se resuspenden en un medio i.v. deseado (por ejemplo, solución salina).

2) Método ultrasónico. Pueden obtenerse MPP con alto rendimiento mediante disrupción sónica.

Procedimiento: se exponen plaquetas frescas (o caducadas recientemente) a una concentración fisiológica (2,5 x 10^5/ul), lavadas previamente 2X en tampón PBS con EDTA 1 mM/$MgSO_4$ 5 mM (para minimizar la agregación), a disrupción ultrasónica [Branson Instruments; sonda de titanio de 5 mm] en un tubo de polipropileno de 50 ml para 3-5 ráfagas de 3-5 segundos cada una a temperatura ambiente. Se retiran los desechos y las plaquetas residuales mediante centrifugación y se sedimentan las MPP en el sobrenadante mediante centrifugación a alta velocidad, luego se lavan como anteriormente. La técnica estéril adecuada para estudios con animales consiste en un tapón de algodón en un orificio perforado en la tapa del tubo suficiente para admitir la sonda sónica, que se limpia con un hisopo con alcohol antes de insertarse a través del collar de algodón estéril. Para su uso en seres humanos, se conocen técnicas estériles apropiadas por los expertos en la técnica.

3) Método de activación con calcio. En la fisiología normal, un aumento en el calcio citosólico es la etapa final común de todas las rutas que conducen a activación celular. El uso de un reactivo de ionóforo de calcio, tal como A23187, crea un poro en la membrana que admite selectivamente calcio desde el medio externo, provocando una abundante liberación de MPP. Los resultados pueden ser más relevantes fisiológicamente.

Procedimiento. Puede usarse el método de Arnout *et al* (42) para preparar MPP, y las MPP resultantes expresan FvW significativo mediante electroforesis / inmunotransferencia [no publicado]. Brevemente, se suspende 1,0 ml de plaquetas lavadas a 2,5 x 10^5/ul en HEPES/solución salina, pH 7,4, luego se añade el ionóforo A23187 en cantidad suficiente para producir 1 umol/l final (diluido previamente a partir de una disolución madre de alcohol) en 50 ul de buffer, suficiente calcio para producir 2 mM final, luego se agita suavemente durante veinte minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga para eliminar los desechos pesados, y se recuperan las MPP del sobrenadante como anteriormente. Alternativa: pueden permeabilizarse las plaquetas con saponina en vez de ionóforo si existe alguna preocupación de que persista el ionóforo en las MPP; luego se procede como anteriormente. Alternativa: también pueden activarse las plaquetas con trombina + colágeno, lo que se notificó que tiene una potencia similar a la activación con ionóforo.

II. Micropartículas derivadas de eritrocitos (glóbulos rojos) (MPGR)

Tal como se describió en I (1) anteriormente, también se sabe que la propia sangre de los pacientes o sangre de un banco de sangre o libera de manera natural abundantes MPGR. Por tanto, pueden recogerse exactamente tal como se describió en I (1). Pueden usarse RBC frescos tal como se describió en I (2-4) así como RBC almacenados para la generación de MPGR.

III. Micropartículas sintéticas

Enfoque de liposomas (MP sintéticas). Con la suposición de que FvW junto con fosfolípidos (PL) procoagulantes son suficientes en sí mismos para proporcionar una protección hemostática significativa en pacientes con trombocitopenia, los liposomas de FvW-cefalina (o lecitina) deben ser eficaces. La experiencia de los inventores muestra que tanto la lecitina de soja como de huevo son casi tan activas en ensayos de coagulación (factor tisular, también anticoagulante lúpico) como lo es la cefalina, el lípido cerebral en bruto usado tradicionalmente para este fin. La ventaja sustancial de este enfoque son las proteínas inmunogénicas limitadas, distintas del propio FvW.

Procedimiento: brevemente, se expone concentrado de FvW (tal como Humate P® o equivalente preparado de manera interna a partir de plasma) a energía de ultrasonidos en presencia de liposomas de cefalina o lecitina, en concentraciones bien conocidas en la técnica. En condiciones apropiadas, esencialmente la totalidad del FvW se asocia fuertemente con los liposomas, o bien en la superficie o bien de forma transmembrana. Pueden determinarse las condiciones óptimas por los expertos en la técnica sin una excesiva experimentación.

Ejemplos

Los ejemplos 1-8 son únicamente para fines ilustrativos y no son parte de la presente invención.

EJEMPLO 1 (para fines ilustrativos)

Agregación plaquetaria inducida por MPE. Se incubaron MPE con plaquetas lavadas normales tal como se describió anteriormente. La presencia de MPE a $4x10^7$/ml final indujo una fuerte agregación plaquetaria que dependía de ristocetina. Tal como se observa en la figura 1, el grado de agregación plaquetaria dependiente de ristocetina provocada por MPE fue similar a la provocada por un 8% de plasma normal. En ausencia de ristocetina, se formaron agregados plaquetarios insignificantes con o bien MPE, Humate-P o bien plasma normal. Tanto la agregación plaquetaria inducida por MPE como por plasma se inhibió por el Acm de bloqueo anti-CD42b. Estos resultados demuestran que la formación de agregados plaquetarios inducida por MPE que depende de FvW. Las curvas de dosis-respuesta de la agregación plaquetaria inducida por MPE, plasma normal o Humate-P se muestran en la figura 2. Se observa que las formas de las curvas para los tres agentes son similares. Puesto que tanto las plaquetas como

las MPE se lavaron previamente y estaban esencialmente libres de plasma, estos resultados demuestran que el FvW unido a MPE puede sustituir a FvW soluble en plasma o Humate-P en la inducción de una agregación plaquetaria completa con ristocetina. Los datos indican que el 50% de agregación se produce con un 3,5% de plasma, equivalente a $1x10^7$/ml de MPE, y a 0,075 U/ml de Humate-P.

Para confirmar adicionalmente la existencia de FvW unido a micropartículas, se sometió a prueba el efecto de la filtración a través de un filtro de 0,1 μm, que se sabe que retiene la mayoría de las MPE. Tal como se muestra en la figura 3, esta filtración suprimió enormemente la agregación plaquetaria inducida por MPE pero no tuvo ningún efecto significativo sobre la agregación plaquetaria inducida por plasma normal o Humate-P.

Tabla 1. Comparación de la actividad de FvW de MPE derivadas de diferentes fuentes de cultivos de tejido humano.

	Subtipos de MPE					
	Renales	**Cerebrales**	**coronarias**			
% de agregados plaquetarios inducidos	**68 ± 13% ***	**54 ± 10%***	**29 ± 6%**			
por $2x10^7$/ml de MPE						

EJEMPLO 2 (para fines ilustrativos)

MPE de endotelios de diferentes orígenes. Se comparó la actividad de agregación de MPE de tres fuentes diferentes de CE: de arteria coronaria macrovasculares y renales y cerebrales microvasculares. Se cultivaron las tres CE en condiciones similares a las detalladas previamente (13, 33, 34) y se estimularon con la misma concentración de TNF-α durante 24 h. Se recogieron y se lavaron las MPE tal como se describió anteriormente, se contaron mediante citometría de flujo, y se ajustaron a concentraciones iguales. La tabla 1 muestra las actividades específicas relativas de las MPE de estas tres fuentes en la inducción de agregación plaquetaria dependiente de FvW con ristocetina. Se observa que las MPE derivadas de CE renales o cerebrales microvasculares fueron más potentes que las procedentes de CE de la arteria coronaria. Este concuerda con los hallazgos previos de que las MPR renales o cerebrales contenían un mayor porcentaje de FvW+ MPE (33) y con el hecho de que las manifestaciones clínicas de FvW activo de forma anómala están relacionadas principalmente con trombosis microangiopática. Se ajustaron las MPE obtenidas a partir de células endoteliales (CE) renales, cerebrales y de la arteria coronaria tal como se describe en la sección “Métodos”, a concentraciones iguales antes de evaluar su actividad proagregadora en presencia de ristocetina. La tabla muestra que las MPE de diferentes líneas de CE mostraron diferentes actividades en la agregación plaquetaria inducida por ristocetina, en el siguiente orden, CE renales > cerebrales » coronarias. N= 4, media ± D.E. * indica $p < 0,01$ como el grupo de “MPE renales” o “MPE cerebrales” comparado con el grupo de “MPE coronarias”.

EJEMPLO 3 (para fines ilustrativos)

Valoración de la estabilidad de los agregados. En el transcurso de estudios piloto, se observó que cuando se diluían los agregados plaquetarios inducidos por plasma más ristocetina 20 veces con tampón PBS, disminuía gradualmente la población de agregados y aumentaba el número de plaquetas libres de una manera dependiente del tiempo. La figura 4 representa el transcurso temporal de la disociación de agregados plaquetarios inducida por plasma, Humate-P y MPE. Tras inducirse los agregados plaquetarios durante 10 min., se diluyeron las mezclas con PBS (1:20) para iniciar la disociación. El tiempo para el 50% de disociación para plasma, Humate-P y MPE fue de aproximadamente 15, 25 y 60 minutos, respectivamente. Estos resultados demuestran que los agregados plaquetarios inducidos por MPE son más estables que los inducidos por plasma o Humate-P. Se postuló que la mayor estabilidad de los agregados formados por las MPE puede deberse a (i) la presencia de multímeros muy grandes de FvW en las MPE y/o (ii) la presencia de otras moléculas de adhesión que contribuyen a la reticulación entre las MPE y las plaquetas.

EJEMPLO 4 (para fines ilustrativos)

Efectos de plasma de PTT sobre la formación de agregados plaquetarios inducida por ristocetina. Debido a que se ha implicado el grado anómalo de multimerización de FvW en la PTT (37,38), se investigaron plasmas de cuatro pacientes con PTT en fases agudas (A) y de remisión (R), en comparación con plasma combinado normal. Tal como se muestra en la tabla 2, los pacientes con PTT mostraron un aumento significativo de la agregación plaquetaria inducida por ristocetina, tanto en fases agudas como de remisión.

Tabla 2. Comparación de la actividad de FvW de plasma de PTT en fases agudas y de remisión con control							
	Fuentes de plasma						
	Control	PTT-A	PTT-R				
% de agregados plaquetarios	45 ± 6%	79 ± 16%*	70 ± 12%*				
inducidos por un 4% de plasma	(N=8)	(N=4)	(N=4)				

Se incubaron PPP (4%) de cuatro pacientes con PTT diferentes en fases agudas (A) y de remisión (R) y plasma combinado, con plaquetas y ristocetina durante 10 min., luego se sometieron a ensayo las plaquetas libres estantes mediante citometría de flujo. Se comparó la formación de agregados plaquetarios por plasma de PTT en fase aguda o de remisión con el grupo control, media ± D.E. * indica p< 0,05 comparando PTT en fase aguda o PTT en fase de remisión frente al grupo "control".

Los agregados plaquetarios producidos por el plasma de PTT también eran notablemente más estables que con el plasma normal. Tal como se muestra en la figura 5, los agregados plaquetarios con plasma de PTT fueron mucho más resistentes a la disociación tras la dilución 1:20 que el plasma normal, y esto se observó tanto en las fases agudas (empeoramiento) y de remisión. La filtración del plasma de PTT a través de 0,1 um para eliminar las MP de tamaño ≥ 0,1 um facilitó la disociación parcialmente. El transcurso temporal de la disociación con plasma de PTT de plasma de fase aguda fue similar al de las MPE (figura 4). Estos resultados indican que el FvW unido a MPE en plasma de PTT puede contribuir en parte a estabilizar los agregados plaquetarios.

EJEMPLO 5 (para fines ilustrativos)

Aplicación de FvW unido a MPE a plasma de EvW Tal como se muestra en la figura 6, se usó plasma de cuatro pacientes con EvW para evaluar sus actividades de agregación plaquetaria dependiente de FvW. El plasma procedente de pacientes con EvW mostró una actividad de agregación plaquetaria muy débil. Sin embargo, esta actividad aumentó drásticamente tras la adición de Humate-P (0,1 U/ml, conc. final). La figura también muestra que la adición de MPE (5 x10^6 /ml, conc. final) al plasma de pacientes con EvW *in vitro* restauró parcialmente la actividad de agregación plaquetaria del plasma de EvW. Un efecto sinérgico de MPE y Humate-P combinados induce una fuerte formación de agregados plaquetarios.

EJEMPLO 6 (para fines ilustrativos)

Análisis de multímeros de FvW unido a MPE en comparación con FvW procedente de plasma normal, plasma de PTT y Humate-P. Se postuló que los efectos observados de las MPE sobre la agregación plaquetaria inducida por ristocetina podrían deberse a la presencia de multímeros inusualmente grandes de FvW (FvWIG) en las MPE. Tal como se muestra en la figura 7, el análisis de multímeros confirma que los multímeros de FvW unidos a MPE (carril 4) son mayores que los procedentes de plasma normal (carril 3), e incluso mayores que los procedentes de Humate-P (carril 5), o plasma procedente de pacientes con PTT cuyo plasma mostró FvWIG (carril 2). También se observó que los multímeros de FvW procedentes de un paciente con EvW de tipo I contienen muy pocas bandas (carril 1). Se ha observado que las bandas de multímeros de FvW procedentes de la muestra de MPE no están separadas claramente entre sí tal como se observa con el FvW soluble. Una posible explicación para esto es que los multímeros de FvW unidos a membrana pueden unirse estrechamente con determinados fosfolípidos de membrana que no se disocian totalmente por SDS, lo que puede producir bandas más difusas.

EJEMPLO 7 (para fines ilustrativos)

Uso de una composición de MPE para disminuir el tiempo de hemorragia *in vivo*. Con el fin de demostrar la eficacia *in vivo* de las MPE, se dividieron ratas Fischer adultas en tres grupos. El grupo 1 sirvió como controles normales. A los grupos 2 y 3 se les inyectó por vía intraperitoneal una dosis única de ciclofosfamida (CTX, 75 mg/kg) para inducir trombocitopenia. Después de 4-5 días, cuando se redujo el recuento de plaquetas hasta menos de 5 x 10^5/μl en los grupos tratados, se midió el tiempo de hemorragia cortando la cola a 2 mm desde la punta con anestesia. Antes de las pruebas, al grupo 3 se le inyectó por vía intravenosa 2 x 10^8 MPE en 0,5 ml de PBS dos minutos antes del corte de la cola. Tal como se muestra en la figura 8, en los controles normales, el tiempo de hemorragia fue inferior a un minuto. El grupo 2, que recibió CTX únicamente, tuvo un tiempo de hemorragia promedio de más de 800 segundos. El grupo 3, que recibió CTX + MPE, tuvo un tiempo de hemorragia enormemente reducido (menos de 200 segundos) en comparación con el grupo 2. Estos resultados demuestran la potencia hemostática de MPE *in vivo*.

EJEMPLO 8 (para fines ilustrativos)

Observaciones clínicas en pacientes con PTI sin hemorragias atípicos. Se ha observado recientemente un número limitado de pacientes con PTI que presentan una ausencia altamente inusual de síntomas hemorrágicos (asintomáticos) a pesar de trombocitopenias graves. Sus recuentos de plaquetas fueron de 10.000 o menos en la mayor parte del tiempo en sus transcursos clínicos de PTI a lo largo de 30 años pero nunca experimentaron una hemorragia mayor y disfrutaron de una vida bastante normal. La investigación sobre estos pacientes reveló que mostraban niveles excepcionalmente altos de MPGR (dos casos mostrados: A, B, véase la figura 9). No mostraron ninguna otra característica anómala que explicase la ausencia de hemorragias. Se atribuyen sus características asintomáticas al efecto protector de sus altas MPGR, tal como respaldan también los datos a continuación.

Se identificaron dos pacientes con PTI grave (recuentos de plaquetas de 10.000 o menos) que, no obstante, vivieron normalmente durante más de 40 años, sin un solo episodio de hemorragia mayor. Los estudios cuidadosos de estos pacientes revelaron que ambos tenían niveles extremadamente altos de micropartículas de glóbulos rojos (MPGR), en comparación con otros pacientes con PTI que tendían a presentar hemorragias (49,50). (Véase la figura 9). La observación clínica de estos dos pacientes (estudios de casos A y B a continuación) sugirió que las MPGR son hemostáticamente activas y que el alto nivel de MPGR podría explicar la ausencia inusual de hemorragias en estos pacientes.

Estudio de caso (A). La paciente A desarrolló PTI a la edad de 4 años, cuando su madre notó una fácil aparición de hematomas. Tras la posterior evaluación, se realizó un diagnóstico de PTI. Se sometió a esplenectomía tras terapias alternativas fracasadas. La remisión tras la esplenectomía duró un año; la PTI reapareció poco después tras la vacunación contra la polio. Su PTI respondió sólo de manera transitoria a los glucocorticoides a altas dosis, gammaglobulina IV y no respondió en absoluto a otras medidas (alcaloides de la vinca, danazol, colchicinas, columna de Prosorba, WinRho, etc.). Durante el transcurso de 47 años de PTI crónica, sus plaquetas permanecieron alrededor de 10.000/ul. Manifestó hematomas con un traumatismo menor, ocasionalmente petequias, pero rara vez padeció hemorragias nasales y nunca experimentó un acontecimiento de hemorragia mayor que requiriese la transfusión de sangre. Experimentó fuertes hemorragias menstruales que requirieron temporalmente la prescripción de píldoras anticonceptivas, que controlaron la hemorragia. Ahora vive una vida normal como madre y mujer activa. También padece frecuentes migrañas que requieren medicación para el dolor por vía parenteral. Debido a la trombocitopenia grave, se le realizaron múltiples exploraciones mediante TAC y RMI por miedo a hemorragia en el SNC pero fueron negativas. Nunca tuvo esta complicación.

Resultados clínicos: plaquetas de 7.000 /ul, hemoglobina de 13,3, hematocrito del 39,1%, WBC de 9,3 con diferencial normal. Las bioquímicas sanguíneas incluyendo LDH fueron todas normales. Las pruebas de TP, TTPa y otras pruebas de coagulación estuvieron todas dentro de los límites normales. ANA, C3, C4 fueron normales. Los anticuerpos antifosfolípidos y el anticoagulante lúpico fueron negativos.

Los anticuerpos contra la glicoproteína IIb/IIIa y Ib/IX de plaquetas, medidos mediante ensayos de caracterización de IgG asociadas a plaquetas, “PAICA” (52), fueron fuertemente positivos, respaldando el diagnóstico de PTI. Las micropartículas derivadas de células de plaquetas (MPP), leucocitos (MPL), endotelio (MPE) fueron todas normales, pero las MPGR estaban notablemente elevadas a 4,639/ul, aproximadamente 3 veces mayor que los controles normales y más de dos veces tan alto como el límite para PTI (media normal = 1500/l; media normal para PTI = 2200/ul).

Estudio de caso (B). Se encontró que la paciente B tenía PTI en la lactancia y se sometió a esplenectomía a la edad de 4 meses, proporcionando una remisión parcial. Su PTI respondió bien a los glucocorticoides los toleraba escasamente. Las plaquetas permanecieron habitualmente por debajo de 10.000 sin tratamiento. Tuvo una fuerte menstruación pero esto no interfirió con sus actividades normales. Durante el transcurso de su PTI crónica, ahora más de 50 años, llevó a cabo actividades y un empleo normales, nunca experimentó un episodio hemorrágico mayor ni requirió transfusión. Dio a luz a 2 hijos sin hemorragias inusuales, y toleró cirugías de tobillo y de rodilla. Aunque le aparecieron fácilmente hematomas con un traumatismo menor y tenía algunas petequias con un examen cuidadoso, nunca experimentó hemorragias mucosas prolongadas tales como hemorragias nasales o de las encías, ni hemorragias GI o GU.

Resultados clínicos: plaquetas a 9.000/ul, hemoglobina de 13,7, hematocrito del 44%, WBC de 10.300 con diferencial normal. Las bioquímicas sanguíneas fueron todas normales, como lo fueron los estudios de coagulación sanguínea. La prueba de anticuerpos antinucleares (ANA) del paciente fue negativa. Los anticuerpos antifosfolípidos y el anticoagulante lúpico fueron todos negativos. Los anticuerpos frente a las glicoproteínas IIb/IIIa y Ib/IX de plaquetas fueron todos fuertemente positivos, lo que concuerda con PTI. El análisis de sus estudios de coagulación, los ensayos de las micropartículas derivadas de células de plaquetas (MPP), leucocitos (MPL), células endoteliales (MPE) estuvieron todos dentro de los límites normales. Su única anomalía fueron las MPGR notablemente elevadas a 4,43 8/ ul, aproximadamente 2 veces mayor que en los pacientes con PTI habituales.

El estudio sobre estos dos pacientes con PTI crónica grave de una duración de más de 50 años reveló que las

MPGR estaban notablemente elevadas (inusual en comparación con otros pacientes con PTI) pero las micropartículas derivadas de otras células tales como micropartículas de plaquetas (MPP), micropartículas de leucocitos (MPL) y otros estudios de laboratorio no lo estaban. Estos hallazgos respaldan la conclusión de que las MPGR desempeñaron un papel clave en su protección frente a episodios hemorrágicos potencialmente mortales, puesto que todos los demás hallazgos de laboratorio eran comparables a los de otros pacientes con PTI.

EJEMPLO 9

Datos de laboratorio i*n vitro* que respaldan que las MPGR son agentes hemostáticos eficaces. Se desarrollaron varios métodos para generar MPGR *in vitro*. Tras la generación de las MPGR; se sometieron a ensayo la expresión del factor tisular (FT) y el factor de coagulación VIII (FVIII) mediante métodos inmunológicos. Además, se realizaron pruebas funcionales para determinar si las MPGR pueden acortar el tiempo de coagulación (50).

Métodos

Se prepararon MPGR que expresan de forma natural FT, FVIII, tal como se describió anteriormente y tal como se muestra en la figura 10. Las MPGR que expresan FT pueden usarse como el agente hemostático básico o universal en la prevención de hemorragias en pacientes con trastornos hemorrágicos así como personas sanas que corren el riesgo de presentar hemorragias en situaciones como intervenciones quirúrgicas o procedimientos de diagnóstico. Se prepararon las MPGR a partir de sangre recién extraída usando varios métodos. En breve: (a) Método del ionóforo. Se expusieron RBC lavados a ionóforo de calcio en presencia de calcio añadido. (b) Método de choque osmótico. Se expusieron RBC lavados a solución salina hipotónica (1/3 de isotónica). (c) Método ultrasónico. Se expusieron RBC lavados a breves ráfagas de sonda de ultrasonidos (sonicación). (d) Método con anticuerpo anti-D, con / sin complemento. El material de partida eran RBC frescos lavados 3 veces con solución salina isotónica tal como es habitual. Se sometieron a prueba dos niveles de anticuerpo anti-D (WinRho), 10 U y 50 U por ml de sangre original, añadidos al 50% de Ht, luego se incubaron con agitación suave durante 50 min. Luego se retiraron los RBC intactos mediante centrifugación a baja velocidad y se sedimentaron las MPGR mediante centrifugación a alta velocidad, tal como es habitual, y se resuspendieron para la citometría de flujo.

Citometría de flujo. Se identificaron las MPGR mediante el anticuerpo monoclonal (Acm) fluorescente contra el marcador de RBC, glicoforina A. También se midieron en las MPGR mediante el Acm, el factor tisular (FT) y el factor de coagulación VIII (FVIII). Se empleó anexina V (AnV) fluorescente para medir la exposición de fosfatidil-serina (PS) procoagulante, y lectina marcada con FITC, se usó *Ulex europaeus* (Ulex) para proporcionar una estimación de las MP totales (50).

La citometría de flujo reveló que los tres métodos (a, b, c) produjeron abundantes MPGR. Es de especial interés que expresan débilmente pero de manera significativamente positiva para el factor tisular (FT), un potente iniciador de la coagulación (activo a niveles muy bajos). Se identificó el FVIII a niveles similares. (Véase la figura 10).

Resultados representativos de nueve experimentos mediante tres métodos (ionóforo, sonicación y anticuerpo anti-D). La figura 10 muestra las MPGR totales tal como se definen por el número de partículas positivas para glicoforina y que esta fracción es positiva para FT, FVIII y AnnV. Obsérvese que la exposición a PS (reflejadas en positivos para AnV) es habitualmente baja. Esto sugiere una buena semivida en circulación dado que PS es un desencadenante para la fagocitosis.

Ensayo de actividad procoagulante de las MPGR. Se sedimentaron las MPGR procedente de 1,5 ml de MPGR preparadas de manera convencional, mediante centrifugación durante 15 min. a 8.000 x g (microcentrífuga Eppendorf) y se retiró el sobrenadante. Luego se añadió plasma convencional (normal), se resuspendieron las MPGR. Para valorar la actividad procoagulante, se añadieron las MPGR a la mezcla y se midió el tiempo de recalcificación añadiendo (2 mM). Se midió manualmente el tiempo de coagulación.

Los resultados (mostrados en la figura 11) demuestran que las MPGR tienen una actividad procoagulante significativa, tal como se detalla adicionalmente a continuación. Existen al menos dos rutas conocidas de coagulación sanguínea. Una es una ruta “intrínseca” que se inhibe completamente por el inhibidor de tripsina de maíz, y una ruta “extrínseca” mediada por el FT. Sin limitarse a ninguna ruta particular, los inventores conjeturan que dado que la actividad procoagulante de las MPGR persiste en presencia del inhibidor de tripsina de maíz, es probable que la actividad procoagulante de las MPGR se deba a la mediación del FT. No se muestran los experimentos que incluyeron el inhibidor de tripsina de maíz (que suprime la actividad procoagulante no mediada por el FT).

Actividad procoagulante de MPGR. La figura 11 muestra el tiempo de coagulación por recalcificación en minutos, la media de los duplicados +/- la desviación estándar usando el método descrito anteriormente. Tal como puede observarse, existe un acortamiento notable del tiempo de coagulación en presencia de las MPGR. De manera sorprendente, las MPGR fueron más eficaces en este experimento que una cantidad similar de MP derivadas de leucocitos (MPL) pero la diferencia no fue significativa. Se confirmaron resultados similares en presencia del

inhibidor de tripsina de maíz (50).

EJEMPLO 10

Datos de animales *in vivo* que demuestran que las MPGR son hemostáticamente activas. Se estudió la eficacia de las micropartículas de glóbulos rojos (MPGR) de una manera dependiente de la dosis en ratas Fischer adultas. Se aleatorizaron los animales en 4 grupos. El grupo 1 sirvió como controles normales. A los grupos 2, 3 y 4 se les inyectó por vía i.p. una dosis única de ciclofosfamida (75 mg/kg) para inducir trombocitopenia. A los 5 días, cuando se redujo el recuento de plaquetas hasta menos de $5X10^5$/microlitro en los grupos tratados, se midió el tiempo de hemorragia mediante el corte de la cola a 2 mm desde la punta con anestesia. Dos minutos antes de someter a prueba el tiempo de coagulación, se les inyectó a los grupos 3 y 4 $1X10^7$ y $1X10^8$ MPGR, respectivamente. Se prepararon las MPGR esencialmente tal como sigue: observando técnicas estrictamente estériles en todo el proceso, se lavaron RBC completos procedentes de sangre recién extraída tratada con citrato, dos veces con 10 volúmenes de solución salina isotónica y luego se suspendió hasta un hematocrito del 17%, luego se expuso a ráfagas ultrasónicas (Cole-Parmer, modelo 4710, homogeneizador ultrasónico, dotado de una sonda pequeña) durante 1 segundo. Se eliminaron grandes desechos mediante centrifugación a baja velocidad (8 min., 200 x g en centrífuga clínica de Beckman, luego se centrifugó el sobrenadante durante 15 min. a 8.000 x g en microcentrífuga Eppendorf (en tubos de polipropileno de 1,5 ml) y se retiró el sobrenadante de color granate. Se suspendió el pequeño sedimento de MPGR en un pequeño volumen, se contó mediante *Ulex europaeus* marcado con FITC, y luego se diluyó hasta la concentración indicada antes de la inyección en el animal de experimentación. Los resultados se muestran en la figura 12. En los controles normales, el tiempo de hemorragia fue inferior a un minuto. El grupo 2, tras la inducción de trombocitopenia y que recibió únicamente ciclofosfamida, tuvo un tiempo de hemorragia de más de 700 segundos. El grupo 3, que recibió $1X10^7$ MPGR tras la inducción de trombocitopenia, tuvo un tiempo de hemorragia enormemente reducido en comparación con el grupo 2. Se observó un efecto dependiente de la dosis de la administración de las MPGR, con una disminución todavía mayor en el tiempo de hemorragia observado en los animales tratados con $1X10^8$ MPGR.

EJEMPLO 11

Conjugación de factores de coagulación o adhesiones con MPGR. Las MPGR pueden modificarse de manera bioquímica para aumentar su actividad hemostática para algunas aplicaciones. Por ejemplo, las MPGR pueden modificarse mediante la incorporación ultrasónica de polietilenglicol (PEG) puesto que se ha mostrado que los liposomas pegilados adsorben luego de forma ávida pero no covalente tanto FVIII como FvW (55). En otro enfoque, las MPGR pueden modificarse mediante la adición covalente del péptido RGD [53, 62]. Se conocen bien en la técnica métodos para conjugación de proteínas o péptidos específicos con vesículas de fosfolípidos (PL), véase en particular el texto completo de Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques (54). Puesto que las micropartículas derivadas de células son esencialmente vesículas de PL, se espera razonablemente que puedan aplicarse los mismos métodos. Se prevé que el agente que va a conjugarse con las MPGR (por ejemplo, el péptido RGD) puedan ser productos intermedios activados previamente y almacenados en forma liofilizada estéril (por ejemplo, véase (54), (página 236). Cuando sea necesario, pueden añadirse al paciente MPGR, dando como resultado conjugados de proteína-MPGR tras una incubación una hora, que sólo requiere luego que se laven las MPGR conjugadas para librarse del exceso de reactivos.

La bibliografía citada en el presente documento se enumera a continuación por comodidad:

1. Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: A wide-angle perspective (Review). Crit Rev Oncol/Hematol 1999; 30: 111-142.

2. Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Ahn YS. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction (Review). Frontiers in Bioscience 2004; 9: 1118-1135.

3. Ahn YS. Cell-derived microparticles: Miniature envoys with many faces. J Thromb and Hemostasis. 3:884-887, May, 2005.

4. Dachary-Prigent JD, Freyssinet J-M, Pasquet J-M, Carron J-C, Nurden AT. Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: A flow cytometric study showing a role for free sulfhydryl groups. Blood 1993; 81: 2554-2565.

5. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JN, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: A role for apoptosis in plaque thrombogenicity. Circulation 1999; 99: 348-353.

6. Zwaal RFA, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. Blood 1997; 89: 1121-1132. 7. Sims PJ, Wiedmer T. Unravelling the mysteries of phosphlolipid scrambling. Thromb Haemost 2001; 86: 266-275.

8. Jy W, Horstman LL, Wang F, Duncan R, Ahn YS. Platelet factor 3 in plasma fractions: Its relation to microparticle size and thromboses. Thromb Res 1995; 80: 471-482.

9. Satta N, Toti F, Feugeas O *et al*. Monocyte vesiculation as a possible mechanism of dissemination of membraneassociated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. J Immunol 1994; 153:3245-3255.

10.Biro E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GM Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. J Thromb Haemost. 2003; 1:2561-8.

11. Shet AS, Aras O, Gupta K *et al*. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. Blood. 2003; 102:2678-83.

12. Combes V, Simon AC, Grau GE *et al*. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. J Clin Invest 1999; 104: 93-102.

13. Abid Hussein MN, Meesters EW, Osmanovic N, Romijn FP, Nieuwland R, Sturk A. Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection ex vivo. J Thromb Haemost. 2003; 1:2434-43.

14. Jimenez J, Jy W, Mauro L, Horstman L, Ahn Y. Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP): Findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease. Br J Haematol 2001; 112: 81-90.

15. Siddiqui FA, Desai H, Amirkhosravi A, Amaya M, Francis JL. The presence and release of tissue factor from human platelets. Platelets. 2002;13:247-53.

16. Jy W, Mao WW, Horstman LL, Tao J, Ahn YS. Platelet microparticles bind, activate and aggregate neutrophils in vitro. BCMD (Blood Cells, Molecules and Diseases) 1995; 21: 217-231.

17. Barry OP, Pratico D, FitzGerald G. Platelet microparticles enhance adhesive interactions between monocytes and endothelial cells. J Clin Invest 1997; 45: 271ª

18. Barry OP, Pratico D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. J Clin Invest 1998; 102: 136-144.

19. Mesri M, Altieri DC. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor production in a JNK1 signalling pathway. J Biol Chem 1999; 274: 23111-23118.

20. Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? J Thromb Haemost 2003; 1: 1655-1662.

21. Ware JA, Heistad DD. Platelet-endothelium interactions. N Engl J Med 1993; 328(9): 628-635.

22. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF *et al*. The endothelial cell ecto ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. J Clin Invest 1997; 99: 1351-1360.

23. Moncada S, Vane JR. Prostacyclin and its clinical applications. Ann Clin Res 1984; 16(5-6): 241-252.

24. Alonso D, Radomski MW. Nitric oxide, platelet function, myocardial infarction and reperfusion therapies. Heart Fail Rev 2003; 8: 47-54.

25. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets. Blood 1999; 93: 3831-3838.

26. Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. J Thromb Haemost 2003; 1: 1335-1342.

27. Wilson JM, Ferguson JJ. Platelet-endothelial interactions in atherothrombotic disease: therapeutic implications (Review). Clin Cardiol 1999; 22: 687-698.

28. Fisher AB, Chien S, Barakat AI, Nerem RM. Endothelial cellular response to altered shear stress. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 281: L529-533.

29. Miyazaki Y, Nomura S, Miyake T *et al*. High shear stress can initate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. Blood 1996; 88: 3456-3464.

30. Cheresh DA, Berliner SA, Vicente V, Ruggeri ZM. Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen by related integrins on platelets and endothelial cells. Cell 1989; 58: 945-953.

31. Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 7450-7455.

32. Andre P, Denis CV, Ware J *et al*. Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins. Blood 2000; 96: 3322-3328.

33. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Soderland C, Ahn YS. Endothelial microparticles released in thrombotic thrombocytopenic purpura express von Willebrand factor and markers of endothelial activation. Br J Haematol 2003; 123: 896-902.

34. Jimenez JJ, Jy W, Mauro L, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. Thromb Res 2003; 109: 175-180.

35. Jy W, Horstman LL, Park H, Mao WW, Valant P, Ahn YS. Platelet aggregates as markers of platelet activation: Characterization of flow cytometric method suitable for clinical applications. Am J Hematol 1998; 57: 33-42.

36. Raines G, Aumann H, Sykes S, Stree A. Multimeric analysis of von Willebrand factor by molecular seiving electrophoresis in sodium dodecyl sulfate agarose gel. Thromb Res 1990; 60: 201-212.

37. Nakane PK. Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labeled antibody method: a study on pituitary glands of the rat. J Histochem Cytochem 1968; 16(9): 557-560.

38. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, *et al*. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. Nature 2001; 413: 488-494.

39. Moake JL. Thrombotic microangiopathies. N Engl J Med 2002; 347: 589-600.

40. Sabatier F, Roux V, Anfosso F, Camoin L, Sampol J, Dignat-George F. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. Blood 2002; 99: 3962-3970.

41. Jy W, Minagar A, Jimenez JJ, *et al*. Endothelial microparticles (EMP) bind to monocytes to activate and enhance transmigration: Elevated circulating EMP-monocyte conjugates in multiple sclerosis. Frontiers Biosci 2004; 9: 3137-44.

42. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T *et al*. Vitronectin receptor (alpha-V-beta-3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells. Circulation 1997; 96: 1809-1818.

43. J. Arnout, E. Huybrechts, M. Vanrusselt, J. Vermylen: A new lupus anticoagulant test based on platelet-derived vesicles. Brit J Haemat 1992; 80: 341-346.

44. Fiebig EW, Busch MP, Menitove JE: Transfusion transmitted diseases 2527-40. In Hematology, 4th edition, 2005. Elesvier Inc. (Edit) Hoffman R

45. Wu YY, Snyder EL: Transfusion Reactions 2515-26. In Hematology, 4th edition, 2005. Elesvier Inc. (Edit)Hoffman R *et al*.

46. Meier LG, Barthel HR, Seidl C: Development of polyarthritis after insertion of silicone breast implants followed by remission after implant removal in 2 HLA-identical sisters bearing rheumatoid arthritis susceptiblility genes. J Rheumatology. 1997 24 (9): 1838-41.

47. Tenenbaum SA, Rice JC, Espinoza LR *et al*: Use of antipolymer antibodiy assay in recipients of silicone breast implants. Lancet 1997 349 (9050): 449-54, 1997.

48. Zandaman-Goddard G, Blank M, Ehrenfield M *et al*: A comparison of autoantibody production in asymptomatic and symptomatic women with silicone breast implants. J Rhematology. 26 (1): 73-7.

49. Janowsky EC, Kupper LL, Hulka BS: Meta-analysis of the relation between silicone breast implants and the risk of connective-tissue diseases. NEJM 342(11):781-90, 2000.

50. Ahn YS, Jy W, Horstman LL, Fontana V, Jimmenez JJ, and Ahn E. Microparticles from RBC (RMP) exhibit hemostatic activity in vitro and in vivo and appear to protect ITP patients from thrombocytopenic bleeding. Atherosclerosis Supplements. 7 (3): 291, # 485 (abstract Number), June, 2006. (Presented at International

Symposium on atherosclerosis in June 20, 2006).

51. Jy W, Bidot L, Jimenez JJ, Horstman LL, Bang J, Lin A, Zambrano W Jr., Ahn E and Ahn YS. Thrombin Generation Profiles Are Qualitatively and Quantitatively Distinct in Microparticles Derived from Red Cells (RMP), Platelets (PMP), and Endothelia (EMP). Blood 108 (11): 499a #1759 (abstract Number), November 2006. (Presented at ASH Annual Meeting in December, 2006).

52. Macchi L *et al*: PAICA: a Method for characterizing platelet-associated antibodies. Thrombosis and Haemostasis 76:1020-9, 1996.

53. BS Coller, *et al*: Thromboerythrocytes: In vitro studies of a potential autologous, semi-artificial alternative to platelet transfusions. JClin Invest 1992; 89(Feb): 546-55.

54. G T Hermanson: Bioconjugate Techniques. New York: Academic Press, 1996.

55. M Baru, EtAl: Factor VIII efficient and specific non-covalent binding to PEGylated liposomes enables prolongation of its circulation time and haemostatic efficiency. Thromb Haemost 2005; 93(1061-1068).

56. G Agam, A A Livne: Erythrocytes with covalently bound fibrinogen as a cellular replacement for the treatment of thrombocytopenia. Eur J Clin Invest 1992; 22(2): 105-12.

57. M Levi, *et al*: Fibringogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. Nat Med 1999; 5(1): 107-11.

58. Y Teramura, *et al*: Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGP Ia/IIa in thrombocytopemic mice. Biochem Biophys Res Com 2003; 306: 256-60.

59. T Nishaya, *et al*: Targeting of liposome carryng recombinant fragments of platelet membrane glycoprotein 1balpha to immobilized von Willebrand factor underflow conditions. Biochem Biophys Res Com 2000; 270(755-760).

60. T Nishaya, *et al*: Reconstitution of adhesive properites of human platelets in liposomes carrying both recombinant glycoproteins Ia/IIa and Ib-alpha under flow conditions: specific synergy of receptor-ligand interactions. Blood 2002; 100(1): 136-42.

61. T Kamata, *et al*: Membrane-proximal alpha/beta stalk interactions differentially rgulate integrin activation. JBiol Chem 2005; 280(26): 24775-83.

62. A S Gupta, *et al*: RGD-modified liposomes targeted to activated platelets as a potential vascular drug delivery system. Thromb Haemost 2005; 93(1): 106-14.

63. W Jy, JJ Jimenez, LL Horstman, L Mauro, C Bidot Jr, M Yaniz, M Gonzalez, E R Ahn, CJ Bidot and YS Ahn. Microparticles Derived from Platelets (PMP), Endothelia (EMP), and Leukocytes (LMP) Exhibit Distinctive Hemostatic and Inflammatory Activities. Blood 2005; 106(11):1029a. [To be presented at the meeting of American Society of Hematology in December 12, 2005 at Atlanta, GA.]

64. A Gennaro, ed. Remington's Pharmaceutical Sciences, 1990; Mack Pub.

REIVINDICACIONES

1. Micropartículas derivadas de glóbulos rojos (MPGR) o variantes modificadas químicamente de las mismas producidas mediante injerto o conjugación de moléculas de adhesión o factores de coagulación recombinantes en la superficie de las MPGR para su uso en un método de tratamiento de un estado de hemorragia excesiva en un mamífero aumentando la hemostasia.

2. Micropartículas derivadas de glóbulos rojos (MPGR) o variantes modificadas químicamente de las mismas para su uso según la reivindicación 1, en las que el mamífero es un ser humano.

3. Micropartículas derivadas de glóbulos rojos (MPGR) o variantes modificadas químicamente de las mismas para su uso según la reivindicación 1, en las que el estado de hemorragia excesiva está causado por un trastorno clínico.

4. Micropartículas derivadas de glóbulos rojos (MPGR) o variantes modificadas químicamente de las mismas para su uso según la reivindicación 2, en las que el ser humano padece un trastorno de la coagulación sanguínea.

5. Micropartículas derivadas de glóbulos rojos (MPGR) o variantes modificadas químicamente de las mismas para su uso según la reivindicación 2, en las que el ser humano padece una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en púrpura trombocitopénica idiopática o inmunitaria, trombocitopenia inducida por fármacos y quimioterapia, trombocitopenias de diferentes causas tanto congénitas como adquiridas y alteración de la función plaquetaria, tanto congénita como adquirida.

6. Micropartículas derivadas de glóbulos rojos (MPGR) o variantes modificadas químicamente de las mismas para su uso según la reivindicación 3, en las que la trombocitopenia está inducida por un agente quimiotóxico.

7. Micropartículas derivadas de glóbulos rojos (MPGR) o variantes modificadas químicamente de las mismas para su uso según la reivindicación 6, en las que el agente quimiotóxico se administra durante la quimioterapia.

8. Micropartículas derivadas de glóbulos rojos (MPGR) o variantes modificadas químicamente de las mismas para su uso según la reivindicación 1, en las que el estado de hemorragia excesiva está causado por una lesión traumática, intervenciones quirúrgicas o procedimientos terapéuticos o de diagnóstico invasivos, en los que pueden ser sustanciales la hemorragia y la pérdida de sangre.

9. Micropartículas derivadas de glóbulos rojos (MPGR) o variantes modificadas químicamente de las mismas para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 8, en las que las MPGR se han derivado de los glóbulos rojos del individuo que va a tratarse.

10. Micropartículas derivadas de glóbulos rojos (MPGR) o variantes modificadas químicamente de las mismas para su uso según la reivindicación 1, promoviendo las micropartículas derivadas de glóbulos rojos (MPGR) la formación de coágulos sanguíneos y estimulando la adhesión y agregación plaquetarias.

11. Micropartículas derivadas de glóbulos rojos (MPGR) o variantes modificadas químicamente de las mismas para su uso según una de las reivindicaciones anteriores, siendo las micropartículas derivadas de glóbulos rojos (MPGR) o variantes modificadas químicamente de las mismas para la administración en una dosificación de micropartículas de entre 10^6 y 10^{12}/kg.

12. Micropartículas derivadas de glóbulos rojos (MPGR) o variantes modificadas químicamente de las mismas para su uso según la reivindicación 11, siendo las micropartículas derivadas de glóbulos rojos (MPGR) o variantes modificadas químicamente de las mismas para la administración en una dosificación de entre 10^8 y 10^{10}/kg.

13. Micropartículas derivadas de glóbulos rojos (MPGR) o variantes modificadas químicamente de las mismas para su uso según una de las reivindicaciones anteriores, siendo las micropartículas derivadas de glóbulos rojos (MPGR) o variantes modificadas químicamente de las mismas para la administración por vía intravenosa.

14. Micropartículas derivadas de glóbulos rojos (MPGR) o variantes modificadas químicamente de las mismas para su uso según una de las reivindicaciones anteriores, siendo las micropartículas derivadas de glóbulos rojos (MPGR) o variantes modificadas químicamente de las mismas para la administración local o tópicamente.

Figura 1

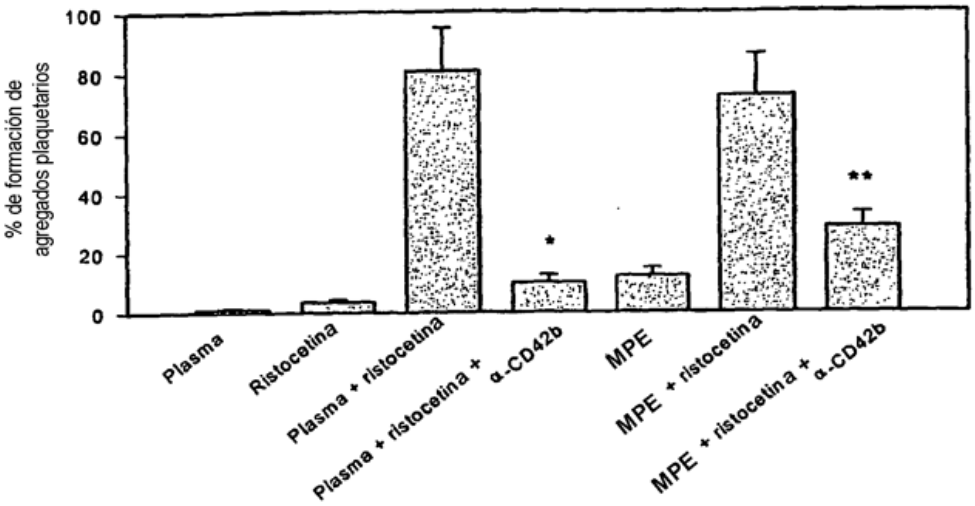

Figura 2

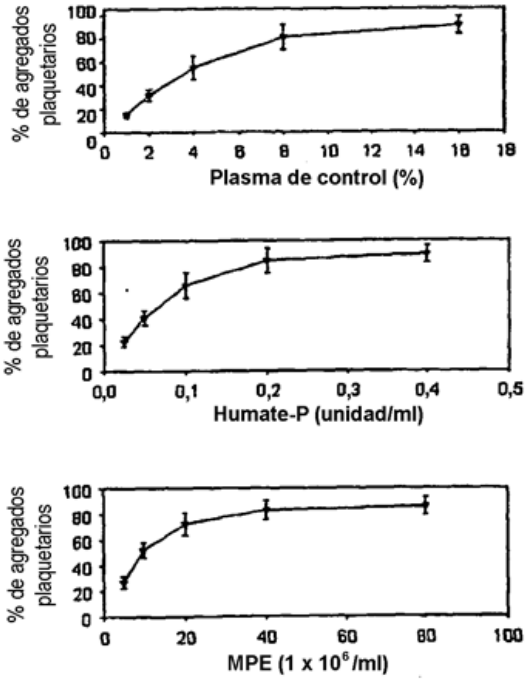

Figura 3

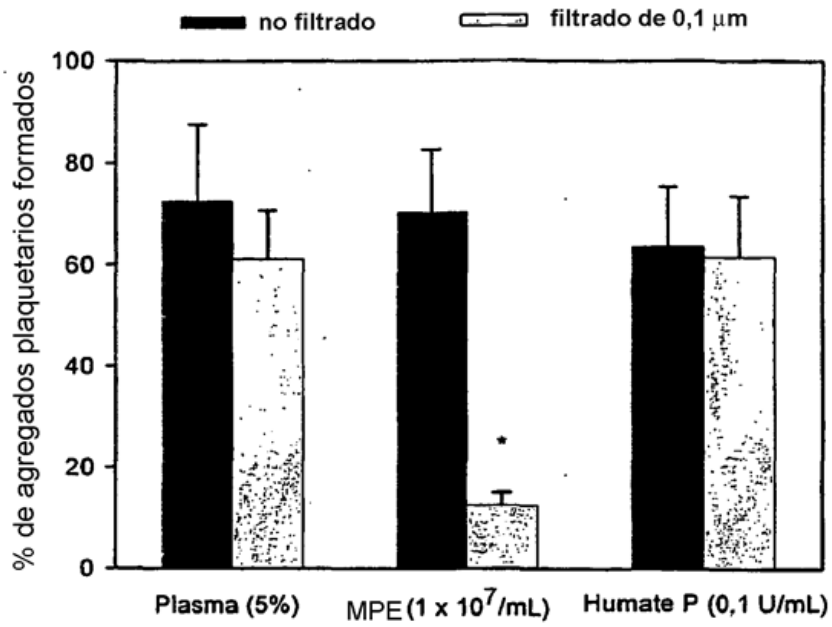

Figura 4

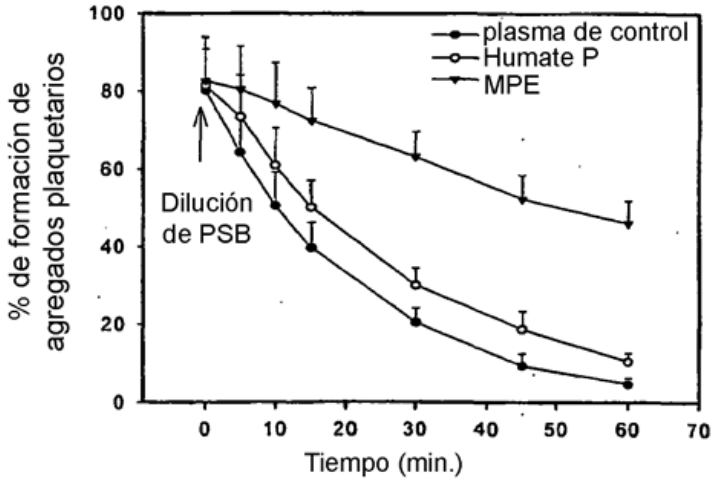

Figura 5

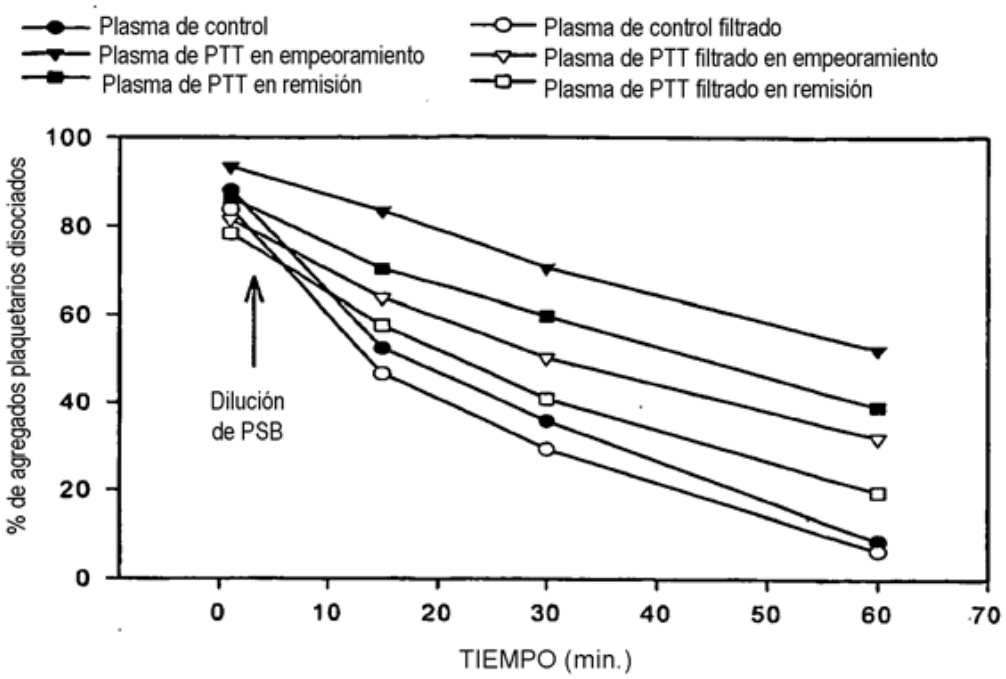

Figura 6

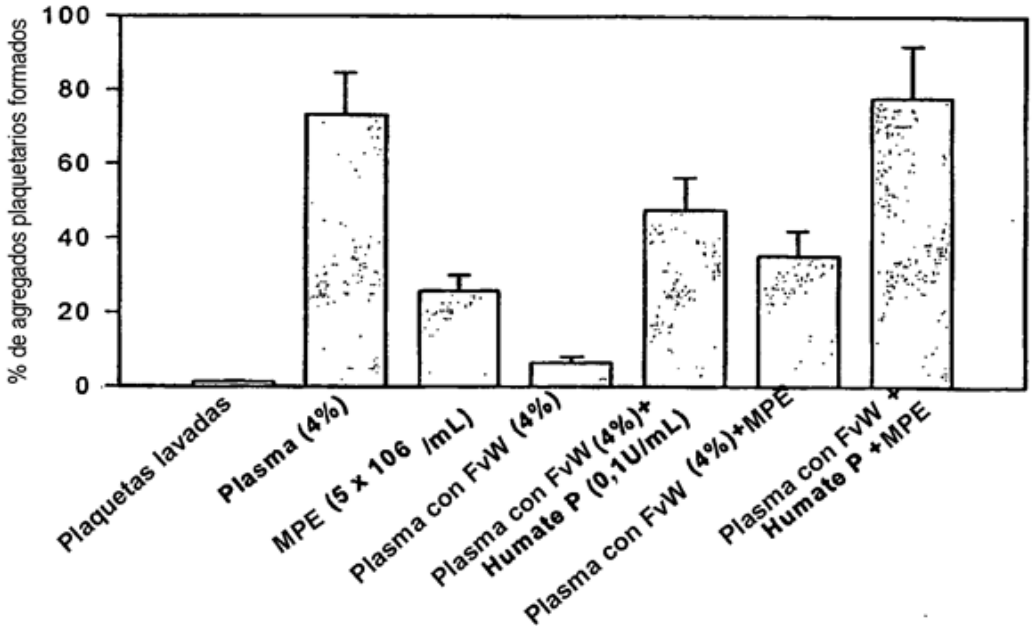

Figura 7

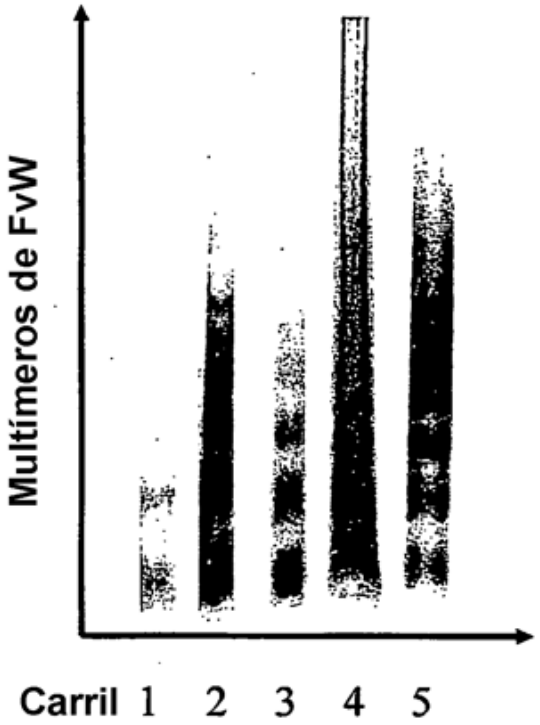

Figura 8

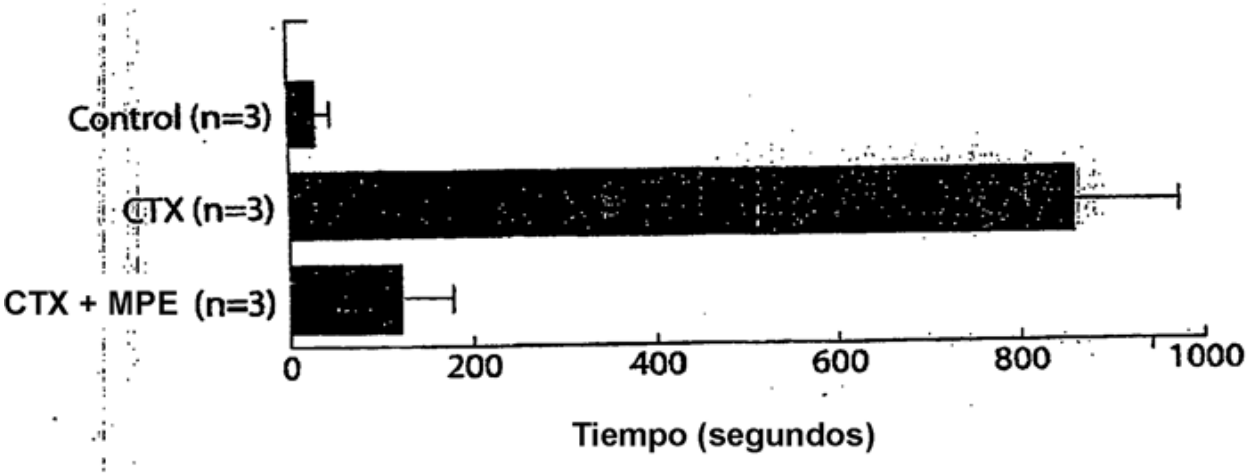

Figura 9

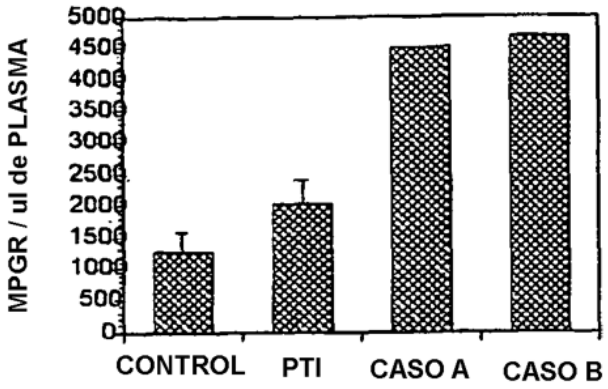

Figura 10

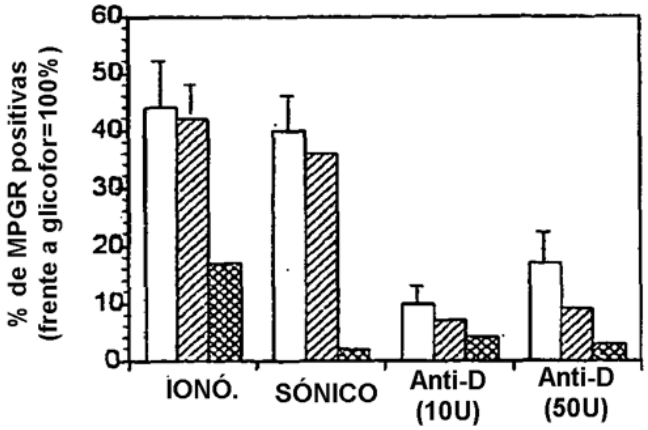

Figura 11

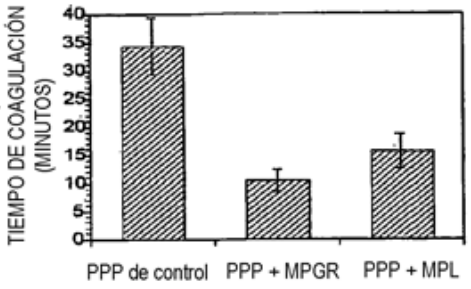

Figura 12

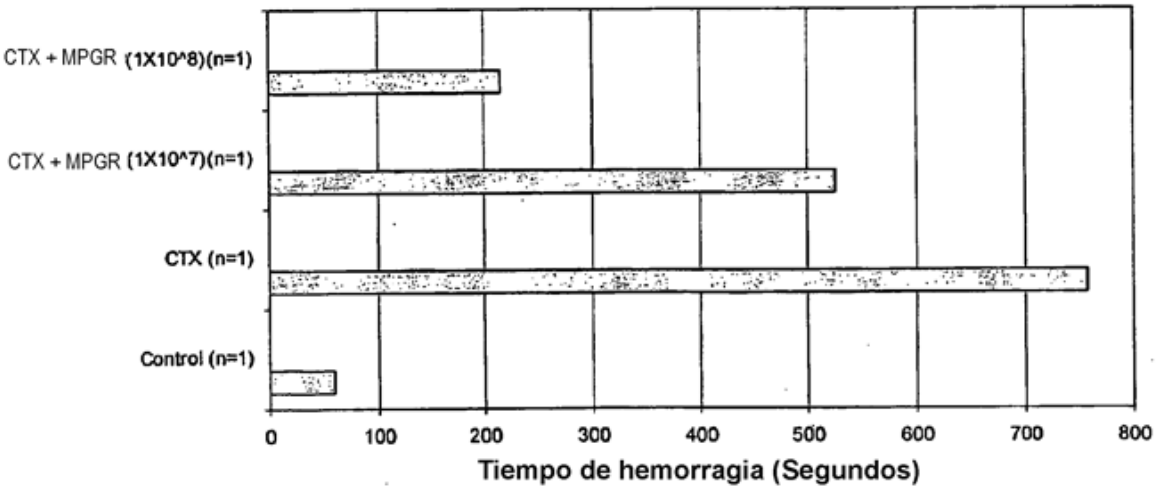

Figura 13

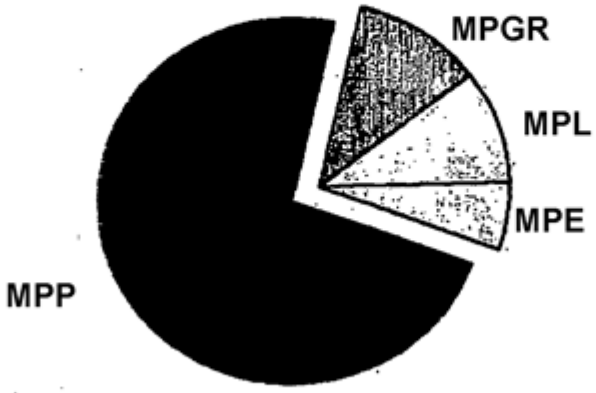
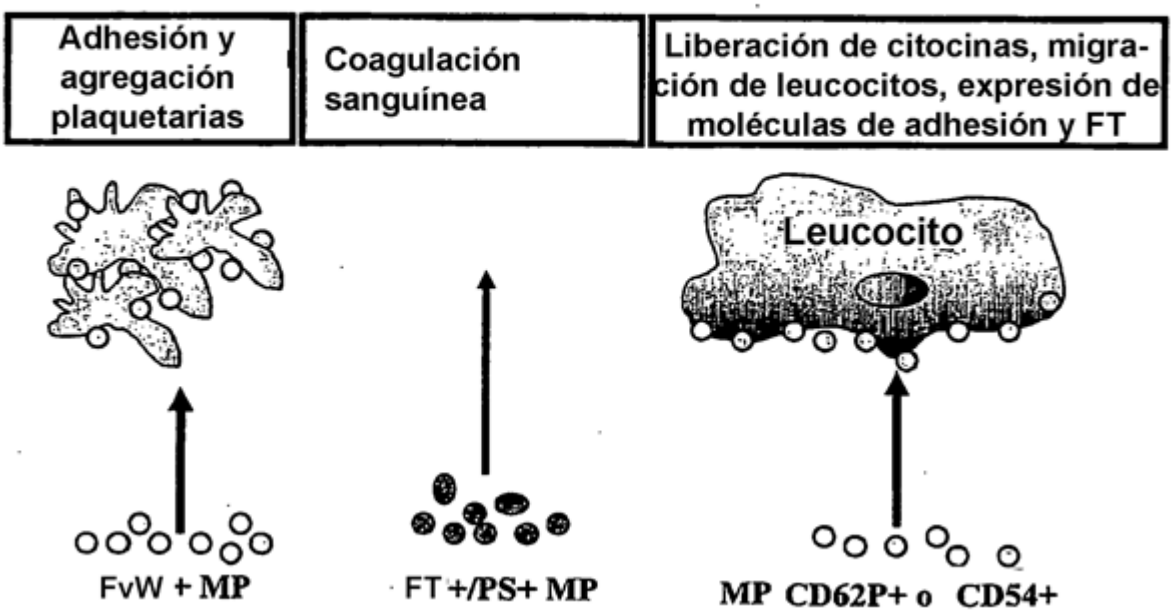
Figura 14