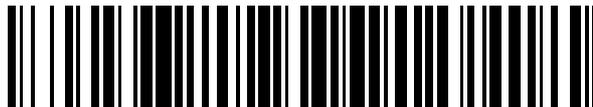


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 901**

51 Int. Cl.:

A61K 35/18 (2015.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2012 PCT/US2012/023020**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.08.2012 WO12103512**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2012 E 12739559 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2668262**

54 Título: **Utilidad ampliada de las micropartículas derivadas de glóbulos rojos (RMP) para el tratamiento de la hemorragia**

30 Prioridad:

28.01.2011 US 201161457203 P

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

07.03.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MIAMI (100.0%)
1951 NW 7th Avenue, Suite 310
Miami, FL 33136, US**

72 Inventor/es:

**AHN, YEON S.;
HORSTMAN, LAWRENCE L. y
JY, WENCHE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 657 901 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

Utilidad ampliada de las micropartículas derivadas de glóbulos rojos (RMP) para el tratamiento de la hemorragia

Referencia cruzada a solicitudes anteriores

5 La presente solicitud es una solicitud no provisional y reivindica el beneficio y la prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos No. 61/457.203, presentada el 28 de enero de 2011.

Apoyo del gobierno de Estados Unidos.

N/A

Antecedentes de la invención

Campo de la técnica

10 La presente invención pertenece al campo de la hematología y, más específicamente al campo de nuevo tratamiento de la hemorragia.

Descripción de los antecedentes

15 La invención se refiere a composiciones mejoradas que comprenden micropartículas derivadas de la membrana de los glóbulos rojos (RPM) que aumentan la coagulación de la sangre, la actividad de las plaquetas, y que promueven la formación de coágulos de sangre y a un método para tratar las hemorragias excesivas que incluyen, pero no se limitan a las debidas a trastornos de las plaquetas y de la coagulación sanguínea y a métodos para fabricar tales composiciones. Las composiciones de la invención son útiles en la minimización de la pérdida de sangre en un mamífero, en particular en los pacientes sometidos a procedimientos invasivos quirúrgicos o médicos y aquellos con traumatismos en los que la pérdida de sangre puede ser sustancial. Las micropartículas derivadas de los glóbulos rojos corrigen las anomalías hemostáticas que surgen de deficiencias del factor de coagulación de la sangre, así como de la deficiencia en el número de plaquetas (trombocitopenia) y/o en la función de las plaquetas (disfunción plaquetaria).

25 La hemorragia excesiva es una de las complicaciones más comunes que ponen en peligro la vida en traumatismos y complicaciones hemorrágicas tanto en los consultorios como en los hospitales. El paciente con hemorragia plantea un desafío médico importante en todas las especialidades médicas tales como la cirugía, traumatología, obstetricia/ginecología, cardiología, neurología, hematología, etc. En la actualidad, la transfusión de productos sanguíneos procedentes de bancos es el pilar de tratamiento de la hemorragia excesiva, pero una transfusión es muy cara [1] y conlleva riesgos de complicaciones graves a corto y largo plazo.

30 El tiempo es crítico en los pacientes con hemorragia. La intervención rápida es esencial para el control del paciente, pero a menudo se requieren muchas horas para determinar el grupo sanguíneo, realizar las pruebas cruzadas, y administrar al paciente la sangre procedente del banco de sangre. Por lo tanto, la transfusión de sangre como se utiliza en la actualidad a menudo no salva la vida de muchas víctimas de hemorragia. Además, puesto que los productos sanguíneos a menudo se deben administrar antes de que se identifique la causa de la hemorragia, la transfusión puede que no detenga la hemorragia, sino que simplemente reemplace la pérdida de sangre, mientras que la hemorragia continúa. Pueden ser necesarios días o semanas de investigación para encontrar la causa subyacente de una hemorragia excesiva.

40 Los tratamientos para la hemorragia difieren dependiendo de la etiología de la hemorragia. Por ejemplo, (1) cuando se desarrolla una hemorragia excesiva debido a un bajo número de plaquetas (trombocitopenia) se debe utilizar la transfusión de plaquetas u otras medidas para aumentar el número de plaquetas para detener la hemorragia. En el caso de deterioro de la función plaquetaria (disfunción) se utiliza un tratamiento para mejorar la función plaquetaria o una transfusión de plaquetas. (2) En el caso de trastornos de la coagulación, en los que uno o más de 13 factores de coagulación están bajos de nivel o son defectuosos o están inhibidos, se deben suministrar los factores de coagulación que faltan para detener la hemorragia. En la hemofilia A, se debe administrar el factor VIII mientras que en la hemofilia B se debe administrar el factor IX. Sin estas terapias específicas para corregir la etiología subyacente, la hemorragia no se detiene y los pacientes estarán expuestos a un sinnúmero de transfusiones.

45 Para salvar la vida de las víctimas de hemorragia, se necesitan agentes que se puedan administrar de forma segura e inmediata, a un costo razonable. Un producto ideal debería poder ser administrado a los pacientes de inmediato, independientemente de la etiología subyacente de la hemorragia. Todavía no está disponible tal agente, a pesar de una búsqueda que ya dura un siglo.

50 Se necesitan urgentemente productos nuevos y mejores para detener rápidamente la hemorragia en todas las situaciones, independientemente de la causa de la hemorragia. Tales productos salvarán muchas vidas y evitarán las transfusiones innecesarias y las complicaciones asociadas. El producto RMP de la invención cumple todos los requisitos de seguridad y eficacia requeridos de un agente hemostático universal y rentable. Las RMP se pueden infundir de inmediato y son eficaces en el tratamiento de la mayoría de las condiciones de hemorragia. También se

espera que sean menos costosas y más seguras en comparación con otros productos destinados a este fin.

Como ya se ha explicado, la sangre puede ser un recurso que salva vidas, pero la sangre es cada vez más escasa y costosa debido a la creciente demanda, la oferta limitada, y las regulaciones más estrictas. Según el National Blood Data Resource Center, 4,5 millones de personas reciben transfusiones anualmente. El costo de las transfusiones de glóbulos rojos solos es de 24 mil millones de dólares al año. Esto no incluye las plaquetas y otros productos sanguíneos. El coste del hospital por los efectos adversos relacionados con las transfusiones supera los 10 mil millones de dólares al año [1]. Las transfusiones se asocian con muchas complicaciones a corto y largo plazo que incluyen anafilaxia, reacciones hemolíticas, depresión inmunitaria inducida por la transfusión, enfermedad del huésped contra el injerto, lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión (TRALI) y transmisión de patógenos tales como la hepatitis, el VIH y las enfermedades priónicas (enfermedad de las vacas locas).

Esta situación sólo puede empeorar con el envejecimiento de la población. Por ejemplo, para prevenir los infartos de miocardio, ictus y otras trombosis que afectan a los ancianos, un número creciente de pacientes están siendo tratados con anticoagulantes o antiagregantes plaquetarios. Los primeros incluyen cumadina, heparina, LMWH (heparina de bajo peso molecular), fondaparinux (Arixtra) y una nueva generación de trombina oral o inhibidores de FXa tales como dabigatrán (Pradaxa) y rivaroxabán (Xarelto). Los últimos incluyen aspirina, Plavix (clopidogrel) y otros fármacos antiagregantes plaquetarios. Todos estas nuevas medicaciones anticoagulantes y antiagregantes plaquetarios tienen efectos secundarios graves de promoción de la hemorragia y, de este modo, aumentan la complicación hemorrágica y, por lo tanto, la demanda de más transfusiones.

Algunos de los medicamentos más antiguos, tales como la cumadina y la heparina tienen antídotos. Por lo tanto, las hemorragias procedentes de sobredosis de cumadina se pueden tratar con vitamina K, y la heparina puede ser neutralizada por un antídoto, tal como protamina, para limitar de este modo la hemorragia. Sin embargo, no existe un antídoto eficaz para los nuevos anticoagulantes tales como la heparina de bajo peso molecular, por ejemplo, Lovenox (enoxaparina) (que puede ser parcialmente revertida por la protamina) y Fragmin (dalteparina), Arixtra (fondaparinux), Pradaxa (dabigatrán) y Xarelto (rivaroxabán) y para la mayor parte de los fármacos antiagregantes plaquetarios (por ejemplo, aspirina, Plavix y sus análogos). Por lo tanto, la hemorragia resultante de los nuevos fármacos anticoagulantes y antiagregantes plaquetarios impone nuevos retos en el control del paciente. En la actualidad, esta hemorragia es tratada a ciegas con la transfusión de sangre/productos sanguíneos. La administración de las RMP puede corregir o mejorar las anomalías de la coagulación inducidas tanto por los nuevos tipos como por los tipos más antiguos de "diluyentes sanguíneos" así como por los fármacos antiagregantes plaquetarios como se muestra en las figuras 4A, 4 B, 4C, 4D, 4E y 4H.

Aunque la transfusión de sangre procedente de un banco es un pilar en el tratamiento de las hemorragias, se han propuesto otras medidas, tales como los agentes antifibrinolíticos, DDAVP [2], pero estos tratamientos no se utilizan mucho porque su eficacia no está probada. El factor VIIa recombinante (esto es, NovoSeven) ha merecido mucha atención y se ha mostrado muy prometedor [3], pero su uso está limitado por el coste prohibitivo (por ejemplo, más de 1 millón de dólares para un único paciente con altos niveles de inhibidores de FVIII) y por los informes de graves complicaciones trombóticas. Las RMP tienen un gran potencial para una amplia aplicación en diversos trastornos hemorrágicos y corrigen las anomalías hemostáticas inducidas por la mayoría de los anticoagulantes incluyendo los anticoagulantes de nueva generación, así como por la mayoría de los fármacos antiagregantes plaquetarios. Se pueden conservar en las ambulancias para su uso en la medicina de urgencias (por ejemplo, en sitios de accidentes) y en quirófanos, clínicas, clínicas dentales, farmacias y hospitales, puesto que son estables a temperatura ambiente, son de coste razonable y no presentan signos de efectos adversos.

Las micropartículas derivadas de plaquetas (PMP) y las plaquetas enteras liofilizadas (LyoPLT) [4] se han propuesto también para el tratamiento de la hemorragia. Las plaquetas liofilizadas (LyoPLT) están en estudio actualmente, pero pueden ser poco prácticas en comparación con las RMP debido a (i) los altos costos de las plaquetas que son escasas, (ii) el riesgo de trombogénesis, y (iii) la inmuno-reactividad. El volumen total de plaquetas circulantes en la sangre es sólo de 20 mL, aproximadamente 1/250 del de los glóbulos rojos, por lo tanto, el material de partida es costoso y escaso. Las plaquetas son altamente inmunogénicas debido a HLA (antígeno leucocitario humano), sistemas ABO, Rh, y antígenos específicos de plaquetas, que son poco prácticos para las pruebas cruzadas, y por lo tanto, las reacciones adversas son frecuentes. Además, se sabe que las plaquetas llevan un factor tisular (TF), que es trombogénico. Por el contrario, las RMP no tienen ninguno de estos inconvenientes.

Sumario de la invención

La presente invención (RMP) muestra ventajas significativas sobre las opciones de tratamiento existentes. En contraste con los productos de banco de sangre, (a) las micropartículas derivadas de glóbulos rojos (RMP) tienen una vida útil indefinida con almacenamiento a temperatura ambiente y no necesitan ser almacenadas en bancos de sangre; (b) las RMP producidas a partir de glóbulos rojos tipo O Rh negativo (RMP universales) se pueden administrar inmediatamente sin pruebas cruzadas; y (c) las RMP pueden sustituir a menudo a los productos de bancos de sangre. Además, el uso de RMP autólogas (fabricadas a partir de la propia sangre del paciente), se pueden utilizar para eliminar los principales riesgos de complicaciones de la transfusión.

Las micropartículas derivadas de glóbulos rojos (RMP) tienen muchas ventajas como agentes hemostáticos, entre

otras:

5 (1) Facilidad y economía de producción. Los glóbulos rojos (RBC) son con mucho las células sanguíneas más abundantes, lo que asegura una fuente esencialmente ilimitada y económica para la producción de las RMP. Una sola donación de sangre convencional (500 mL) es suficiente para producir RMP para tratar al menos dos pacientes. Los glóbulos rojos caducados en el banco de sangre, que de otro modo serían desechados, se pueden utilizar como una fuente de producción de RMP.

10 (2) Reacciones inmunitarias mínimas. Los glóbulos rojos son los menos inmunogénicos y son seguros de transfundir a los receptores de tipo compatible. Las RMP producidas a partir de donantes universales (tipo O, Rh negativo) se pueden almacenar e infundir con seguridad a pacientes de cualquier tipo de sangre. Este no es el caso de otras células sanguíneas tales como las plaquetas.

15 (3) Opción autóloga. Las RMP se pueden preparar de la propia sangre del paciente y ser infundidas de nuevo a los donantes originales cuando tienen hemorragia o están en alto riesgo de hemorragia. El uso de RMP autólogas eliminará las complicaciones de la transfusión de sangre alogénica. Esta opción es muy adecuada para los pacientes en los que se prevé problemas de hemorragia, tal como antes de una operación quirúrgica o de procedimientos invasivos de diagnóstico o terapéuticos o de quimioterapia que a menudo inducen insuficiencia de la médula ósea y trombocitopenia grave. Las enfermedades sistémicas también pueden dar lugar a trombocitopenia. Las personas que toman fármacos o agentes anticoagulantes o antiagregantes plaquetarios sufren con frecuencia complicaciones hemorrágicas. Se pueden preparar sus propias RMP autólogas para ser utilizadas con seguridad en caso de hemorragia. Además, los grupos religiosos que se niegan a la transfusión normal podrían beneficiarse de esta opción.

20 (4) RMP universales. En situaciones de emergencia no hay tiempo para determinar el grupo sanguíneo y realizar pruebas cruzadas. Las RMP producidas a partir de glóbulos rojos tipo O y Rh negativo pueden ser infundidas rápidamente a cualquier receptor, independientemente del grupo sanguíneo.

25 Por razones de seguridad, los donantes de "RMP universales" deben ser seleccionados cuidadosamente para asegurarse de que son negativos para la hepatitis, VIH, CMV u otras infecciones transmisibles. Los donantes universales sanos pueden donar sangre tan a menudo como mensualmente. Por consiguiente, hay disponibles amplios recursos para las RMP universales.

30 Las RMP producidas por los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar frescas o conservadas. Las RMP frescas se pueden preparar en bancos o laboratorios de sangre locales y se pueden distribuir a los quirófanos, clínicas, hospitales y otros centros médicos. Las RMP pueden ser almacenadas casi en cualquier lugar incluyendo farmacias, ambulancias, quirófanos, clínicas y hospitales. El trabajo inicial sobre las RMP produjo el producto mediante varios tipos de ruptura de la membrana de los glóbulos rojos tales como sonicación y tratamiento con ionóforos. Sin embargo, estos métodos eran engorrosos, difíciles para realizar un escalado y podían producir RMP que no eran óptimas. Se ha desarrollado ahora un método para producir las RMP que utiliza la tecnología de cizallamiento de membrana a alta presión. Este método produce RMP libres de cualquier aditivo y es fácilmente escalable y fácil de implementar.

35 Utilizando la metodología mejorada de esta invención un proveedor de RMP (tal como una compañía farmacéutica) puede producir una gran cantidad de RMP universales o RMP de grupo sanguíneo específico, liofilizarlas y comercializarlas como agentes hemostáticos.

40 Los servicios de urgencia, centros de traumatología pueden tratar víctimas de accidentes (por ejemplo, de los accidentes de tráfico). En el ejército, las RMP se pueden utilizar para el control de las primeras víctimas de las heridas en el campo de batalla. Las RMP se pueden utilizar para tratar y controlar los traumatismos o lesiones inducidos por el deporte, y para las lesiones en los desastres naturales como terremotos o huracanes, etc.

45 El uso de las RMP reducirá la presión sobre los suministros limitados de los bancos de sangre. Además, puesto que se ha encontrado que las RMP producidas a partir de la sangre caducada son tan eficaces como las RMP procedentes de sangre muy fresca, su producción no es una carga adicional sobre los suministros. Se prevé que las RMP reemplazarán la necesidad de transfusión en muchas situaciones. Puesto que las RMP tienen una vida útil ilimitada, y se pueden producir económicamente, se espera que su uso tenga al menos un coste competitivo con los productos sanguíneos utilizados en la actualidad, dando como resultado un ahorro sustancial general en los costes de salud.

Descripción de las figuras

55 La Figura 1 es un gráfico que muestra la generación de trombina por las RMP, así como por micropartículas (MP) procedentes de otras células (obsérvese que el patrón de generación de trombina difiere entre las RMP, PMP (MP de plaquetas), EMP (MP endoteliales) en términos de tiempo de incubación y de amplitud de la generación de trombina);

La Figura 2 es un gráfico de barras que demuestra la ausencia relativa de expresión del factor tisular (TF) en las

RMP, en comparación con las micropartículas derivadas de otros tipos de células;

La Figura 3A es un gráfico de barras que demuestra el efecto hemostático de las RMP producidas utilizando una prensa francesa, dispositivo de extrusión a alta presión (obsérvese que las RMP acortaron el tiempo de hemorragia en la cola de rata y la pérdida de sangre en ratas con disfunción plaquetaria inducida por el fármaco antiagregante plaquetario Plavix);

La Figura 3B es un gráfico de barras que demuestra el efecto hemostático de las RMP producidas utilizando los dispositivos de extrusión a alta presión Avestin o Constant Systems (nótese que las RMP producidas por estos dos dispositivos acortaron el tiempo de hemorragia en la rata de una manera similar a las producidas por prensa francesa);

La Figura 4 muestra los perfiles de TEG (tromboelastógrafo) de los trastornos de hemorragia en presencia o ausencia de RMP; Figura 4A: Trombocitopenia procedente de anemia aplásica (recuento de plaquetas 1000/ μ L); Figura 4B: Trombocitopenia procedente de ITP (recuento de plaquetas 70.000/ μ L); Figura 4C: Disfunción plaquetaria causada por la aspirina; Figura 4D: Disfunción plaquetaria causada por Plavix; Figura 4E: Coagulopatía causada por cumadina; Figura 4F: Coagulopatía causada por Lovenox; Figura 4G: Coagulopatía causada por Pradaxa; Figura 4H: Hemofilia A congénita con un inhibidor leve;

La Figura 5 muestra un rastreo de TEG con RMP y PMP solas y con la combinación de RMP y PMP que demuestra el acortamiento del tiempo R, el aumento de A y la mejora de MA indicativos de un efecto sinérgico de la combinación;

La Figura 6 es un gráfico que muestra que las RMP aumentan la actividad procoagulante del plasma deficiente en factor VIII, lo que corrobora los resultados mostrados en la Tabla 2;

La Figura 7A es un gráfico que muestra que las RMP mejoran la agregación plaquetaria a una dosis baja (0,2 μ M) de ADP;

La Figura 7B es un gráfico que muestra que las RMP mejoran la agregación plaquetaria a una dosis baja (0,3 mM) de ácido araquidónico; y

La Figura 8 es un gráfico de barras que muestra que las RMP aumentan la adhesión plaquetaria.

Descripción detallada de la invención

La siguiente descripción se proporciona para hacer posible que cualquier persona experta en la técnica haga y utilice la invención y expone los mejores modos contemplados por los inventores para llevar a cabo su invención. Sin embargo, diversas modificaciones serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica, ya que los principios generales de la presente invención se han definido aquí específicamente para proporcionar métodos para la producción, almacenamiento y uso de las RMP.

Se describen en la presente memoria los beneficios hemostáticos únicos de las RMP producidas por cizallamiento a alta presión como tratamientos eficaces y seguros para una amplia variedad de situaciones de hemorragia. Por consiguiente, además del tratamiento de la hemorragia que resulta de la trombocitopenia, disfunción plaquetaria y procedimientos quirúrgicos y traumatismos, se proporcionan composiciones y métodos para tratar la coagulopatía inducida por fármacos anticoagulantes o por una enfermedad sistémica o por deficiencia del factor de coagulación. Estos y otros trastornos que producen hemorragia se tratan mediante la administración de una cantidad eficaz de las RMP de cizallamiento a alta presión a un paciente en necesidad de tratamiento.

Las dosis eficaces de RMP pueden ser determinadas sin experimentación indebida por los expertos en la técnica y generalmente se espera que estén entre 10^6 y 10^{12} partículas/kg de peso corporal, más habitualmente entre 10^8 y 10^{16} partículas/kg. Las RMP se pueden administrar en cualquier composición farmacéutica adecuada según las técnicas farmacéuticas, incluyendo solución salina normal u otros tampones fisiológicamente aceptables conocidos por los expertos en la técnica, y opcionalmente con compuestos terapéuticos adicionales, excipientes y vehículos que se pueden considerar ventajosos. El pH del tampón de suspensión generalmente debe ser igual o inferior a 7,4.

Las RMP se pueden administrar por cualquier medio conveniente y eficaz conocido por los expertos en la técnica, en particular por vía intravenosa, o por aplicación directa (por ejemplo, por vía tópica, o por inyección local) a un sitio donde se necesita o se desea la hemostasia. Tales medios serán conocidos y/o se podrían determinar fácilmente sin experimentación excesiva.

Detalles adicionales acerca de las composiciones farmacéuticas y la administración de las RMP se pueden encontrar en la solicitud principal (solicitud de patente de Estados Unidos N° 11/792.399) de la solicitud actual.

En la presente memoria se proporciona un método mejorado de producción de las RMP; este método mejorado emplea cizallamiento inducido por extrusión a alta presión para hacer económicamente factible la producción de RMP a gran escala sin el uso de aditivos e incluye un método de almacenamiento de las RMP a largo plazo. Para la producción de RMP por el principio de alto cizallamiento, se utilizó una prensa francesa, pero también se analizaron

las RMP producidas por otros instrumentos que emplean el mismo principio, tales como los dispositivos Avestin y Constant Systems *in vitro*. Estos dispositivos de cizallamiento inducido por extrusión a alta presión generan todos RMP con propiedades procoagulantes similares *in vivo* como se muestra en la Figura 3B. La Tabla 1 compara los marcadores de citometría de flujo medidos en las RMP producidas por la prensa francesa con las RMP producidas por un dispositivo Constant System o por un dispositivo Avestin. Estos resultados demuestran que las RMP generadas por diferentes dispositivos que utilizan una extrusión similar a alta presión son similares.

Tabla 1

Dispositivo de producción	Marcadores de RMP (cuentas/ μ L)		
	Anexina V	Glicoforina A	Ulex europaeus
Prensa francesa	8,426	27,145	42,016
Constant Systems	7,547	22,271	33,286
Avestin	4,274	10,005	18,512

Ejemplo 1. Producción de RMP (escala de laboratorio)

Para un único lote, se diluyen 30 mL de células envasadas procedentes de un banco de sangre con 60 mL de solución salina isotónica que contiene EDTA 1,5 mM a pH 7,4. Las células se lavan 3 veces con la misma solución salina con EDTA por centrifugación durante 15 min cada vez a $750 \times g$ a temperatura ambiente. La resuspensión final se lleva a un volumen de 60 mL, que después se introduce en la cubeta de presión de acero inoxidable de la prensa francesa (Thermo-Electron Inc.) y después se expulsa a una presión interna de 100 bares con un caudal de 1,5 mL/min (que se consigue mediante el ajuste de la válvula de aguja). El efluente resultante se centrifugó a baja velocidad ($750 \times g$) para eliminar el pequeño número de células sin romper, y después se centrifugó el sobrenadante a $18.000 \times g$ durante 45 min para sedimentar las RMP. Los expertos en la técnica apreciarán que se puede emplear la filtración y otras técnicas de separación para eliminar las células sin romper. A continuación, se lavaron las RMP a la misma velocidad en solución salina isotónica (sin EDTA) y se refrigeraron durante la noche antes de la liofilización. Este procedimiento tiene > 99 % de eficiencia en el sentido de que los glóbulos rojos de partida se convierten casi en su totalidad en RMP uniformes con un intervalo de tamaño adecuado.

Ejemplo 2. Potencial para el escalado

Este principio (cizallamiento inducido por extrusión a alta presión) se puede adaptar fácilmente a la producción a escala comercial. Se llegó a él sólo después de una extensa experimentación con otros muchos métodos tales como ionóforos, disrupción sónica, ruptura osmótica, y otros. La función básica de una prensa francesa es aplicar cizallamiento a las células suspendidas en fluido. La suspensión celular se coloca en una cubeta de presión donde se aplica la presión por medio de un ariete hidráulico tras lo cual la suspensión presurizada es forzada (extruida) a través del orificio de una válvula de aguja a una región de presión atmosférica. La gran caída de presión a medida que las células pasan a través del orificio aplica una gran fuerza de cizallamiento a las biomembranas. El procedimiento se controla fijando una presión objetivo sobre el ariete hidráulico y controlando la válvula de aguja para alcanzar un caudal dado. Un inconveniente de la prensa francesa es que el volumen procesado está limitado por el tamaño de la cubeta de presión (típicamente 100 mL) y la necesidad de manipular la válvula de aguja con precisión. Un amplio estudio de las membranas tratadas con prensa francesa ha demostrado que el sistema produce generalmente de adentro hacia fuera vesículas de membrana. Un número de sistemas relacionados de cizallamiento a alta presión evitan algunas de las desventajas de la prensa francesa. Los homogeneizadores de fluidos por bombeo presurizan un volumen mayor de fluido y lo fuerzan a través de una válvula con resorte hasta una región de presión atmosférica. El efecto es el mismo que el de la prensa francesa, excepto que el muelle de la válvula se puede programar de modo más reproducible. Otros homogeneizadores de fluidos por bombeo distribuyen con cualquier tipo de válvula y simplemente extruyen la suspensión de células (a una presión seleccionada) a través de un canal estrecho o un orificio fijo hasta una región de presión atmosférica. Tanto el ajuste de la presión como el diámetro del orificio o el diámetro/longitud del canal se pueden seleccionar para alcanzar los resultados deseados. El bombeo en tales sistemas se puede lograr mediante sistemas de pistón de movimiento alternativo de modo que el dispositivo es esencialmente una prensa francesa de autollenado. Alternativamente, la corriente efluente procedente del sistema de extrusión a alta presión se puede dirigir para que incida sobre una superficie (por ejemplo, una placa de metal) para mejorar la ruptura de los glóbulos rojos. Los expertos en la técnica pueden ajustar fácilmente la presión objetivo y las aberturas de la válvula/canal de tales dispositivos para lograr la producción de RMP de alta calidad.

Ejemplo 3: Liofilización para almacenamiento

Un lote de RMP (del Ejemplo 1) preparado el día anterior se mezcló con cantidades óptimas de albúmina, glucosa, sorbitol y/o trehalosa, después se pipeteó en alícuotas de 1,0 mL a viales de liofilización de 2 mL y después se colocaron en la bandeja de un sistema Triad Freeze Drv (Labconco, Inc.). La operación del instrumento se divide en segmentos programables. Los presentes experimentos establecieron los siguientes parámetros óptimos del programa. Las muestras se someten en primer lugar a una fase de "pre-congelación" de 4 horas, con breve vacío,

durante la cual la temperatura cae a $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$. Segmento 1. Después de cambiar a vacío total ($<0,07$ mbares), se aumenta la temperatura (a $0,27\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) hasta $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mantiene durante 2 h. Segmento 2. La temperatura se aumenta lentamente (a $0,04\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) hasta $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se mantiene durante 2 h. Segmento 3. La temperatura se aumenta hasta $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $0,04\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y se mantiene durante 12 h. Etapa final. Los viales se sellan a vacío; se precolocan taponeros de goma sobre los viales y se presionan sobre ellos para sellarlos mediante una placa de presión. Después de retirar los viales, se rizan las cápsulas de aluminio de sellado; los viales se almacenan a temperatura ambiente. La actividad recuperada es igual o superior a la congelación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante al menos 90 días, sin que se haya observado disminución. Por supuesto, el material se puede almacenar a baja temperatura para asegurar una actividad a largo plazo, pero las pruebas realizadas indican que incluso un período prolongado de almacenamiento a temperatura ambiente no destruye la actividad.

Los inventores encontraron que las RMP liofilizadas de esta manera muestran una excelente eficacia *in vitro* y en modelos animales, en comparación con las RMP frescas (antes de la congelación o liofilización). Los expertos en la técnica apreciarán que alguna variación en los parámetros del procedimiento podrá producir igualmente un producto superior y que se pueden producir mejoras adicionales en las propiedades del producto RMP mediante ajustes rutinarios de los parámetros del procedimiento. Como se ha mencionado antes, las RMP liofilizadas no muestran ninguna disminución de la actividad durante al menos 90 días a temperatura ambiente.

Ejemplo 4: Ensayo de generación de trombina (TGA) (Figura 1)

Este ensayo se basa en el método y el software de Hemker *et al.* [6], denominado ensayo de generación de "trombina automatizada calibrada" (CAT) [7], adaptado por los inventores para medir la actividad de las micropartículas [8]. El método mide un cambio en la señal cuando se escinde un sustrato fluorescente para la trombina. Procedimiento: En el experimento mostrado, se generaron RMP por la exposición de glóbulos rojos frescos lavados procedente de un donante normal al ionóforo de calcio A23187 ($10\text{ }\mu\text{M}$) durante 1 h. En un estudio posterior (que no se muestra), se generaron las RMP por medio del método de extrusión con cizallamiento a alta presión descrito anteriormente y se confirmó que las RMP producidas usando ambos métodos presentan una actividad hemostática similar. Las PMP (micropartículas de plaquetas) se generaron por exposición de plasma humano rico en plaquetas a ADP ($10\text{ }\mu\text{M}$) durante 30 min. Las EMP (micropartículas endoteliales) se obtuvieron a partir del sobrenadante de células endoteliales microvasculares renales humanas cultivadas activadas por el factor de necrosis tumoral (TNF- α) (10 nM) durante 24 horas. En todos los casos se eliminaron las células sin romper por centrifugación (700 x g durante 15 min), y se sedimentaron las micropartículas resultantes (15.000 x g durante 30 min) y los sedimentos se lavaron dos veces, después se resuspendieron a concentraciones iguales de micropartículas ($1\text{ x }10^8$ cuentas/mL, concentración final) en base a los recuentos por citometría de flujo. Después se mezclaron $10\text{ }\mu\text{L}$ de micropartículas con $90\text{ }\mu\text{L}$ de plasma libre de partículas (PFP) tratado con inhibidor de tripsina de maíz ($25\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) tras lo cual se inició el ensayo de CAT por adición de calcio. Los datos relevantes son principalmente el tiempo de retraso, visto en el eje de las x, y el pico de trombina generado, visto en el eje de las y en unidades/nM. EL laboratorio de los inventores fue el primero en documentar la generación de trombina por las RMP [5]. La evolución temporal de la generación de trombina por las RMP es distintiva, como se muestra. Obsérvese el largo tiempo de retraso de las RMP en comparación con las PMP y EMP, que se atribuye a la ausencia de factor tisular (TF). Esta es una gran ventaja de las RMP como agente hemostático. Las RMP, sin embargo, generan igualmente una fuerte amplitud una vez que se inicia la coagulación. Como se ve en la Figura 1, el modo de generación de trombina difiere entre las EMP, PMP y RMP. Por consiguiente, el uso combinado de EMP y PMP, junto con RMP podría ser beneficioso en ciertas situaciones clínicas. Los tipos de micropartículas (MP) con distintas propiedades hemostáticas se pueden combinar para ejercer una eficacia hemostática óptima en la reducción de la hemorragia. Este es un argumento importante para apoyar la terapia de combinación de micropartículas.

Ejemplo 5: Ausencia de expresión del factor tisular (TF) en las RMP (Figura 2)

El método utilizado fue la detección por citometría de flujo del antígeno TF utilizando anti-TF marcado con PE/Cy5 (American Diagnostica). Se prepararon PMP, EMP y RMP como se ha descrito en la sección anterior. Se prepararon LMP (micropartículas de leucocitos) mediante la incubación de neutrófilos ($5\text{ x }10^6/\text{mL}$) con lipopolisacáridos (LPS, concentración final $10\text{ ng}/\text{mL}$). Se aislaron los neutrófilos por procedimientos estándar (centrifugación por densidad de Ficol-Hypaque). Todas las micropartículas se ajustaron a igual concentración ($1\text{ x }10^8/\text{mL}$). Se midió el TF en citometría de flujo por doble tinción (anti-TF y lectina Ulex con FITC) antes de la aspiración al citómetro de flujo. La detección de sucesos fue provocada por la señal fluorescente verde. Los resultados se dan como porcentaje de sucesos de micropartículas-positivas que también fueron positivas para TF. Es evidente que la expresión de TF en las micropartículas podría promover la trombosis sistémica. Sin embargo, el TF puede beneficiar la hemostasia local en el sitio de la lesión. Por consiguiente, la combinación adecuada de RMP y de micropartículas que expresan el factor tisular tendrá la ventaja terapéutica de cierta condición de hemorragia como se ha descrito anteriormente.

La figura demuestra que el TF no se detecta en las RMP, pero se detecta fácilmente en micropartículas derivadas de otras células: las derivadas de las plaquetas (PMP), de los endotelios (EMP) y de los leucocitos (LMP). Este resultado es concordante con las publicaciones que identifican el TF en todas las micropartículas excepto en las RMP. El TF es el principal iniciador fisiológico de la coagulación y de la trombosis. Así que la ausencia de TF en las RMP indica un alto grado de seguridad, es decir, la incapacidad de generar trombina, excepto en un sitio local de la

lesión donde el TF está presente. En otras palabras, las RMP no son eficaces en la iniciación de la generación de trombina, pero contribuyen fuertemente a su generación después de la exposición de TF, tal como en un sitio de hemorragia, proporcionando así una hemostasia eficaz localmente pero no sistémicamente.

5 Debido a que las RMP, PMP, EMP, LMP tienen diferentes propiedades hemostáticas como se demuestra en las figuras 1 y 2, el uso de las RMP combinadas con otras MP tales como PMP puede presentar un efecto sinérgico. La Figura 5 demuestra que la combinación de RMP con PMP presenta un efecto sinérgico en la hemostasia cuando se examina por TEG. El uso de la combinación acortó el tiempo de coagulación (R) y aumentó la velocidad de formación de coágulos (A) y aumentó la resistencia de los coágulos (MA) en comparación con las RMP o las PMP solas.

10 Ejemplo 6: Uso de las RMP para tratar la disfunción plaquetaria (Figura 3)

En la solicitud principal de la presente solicitud, los solicitantes presentaron datos que muestran que la infusión de RMP acortó el tiempo de hemorragia de la cola en ratas con trombocitopenia.

15 La cuestión abordada por este estudio era si las RMP eran capaces de reducir también la hemorragia procedente de la disfunción plaquetaria. Se indujo la disfunción plaquetaria en ratas mediante inyección intravenosa de Plavix (10 mg/kg). La Figura 3 muestra que la disfunción plaquetaria inducida por Plavix aumentó el tiempo de hemorragia y la pérdida de sangre en al menos 5 veces en comparación con los controles, y algunos animales no pararon en absoluto de sangrar y murieron. Sin embargo, los ocho animales tratados con RMP (dosis de $2,0 \times 10^9$ /kg) mostraron una normalización casi completa de tiempo de hemorragia y de pérdida de sangre.

20 Los experimentos se realizaron en ratas Sprague-Dawley. Se inició el procedimiento pesando los animales (intervalo de 250-350 g) y anestesiándolos mediante la adición de 1-2 mL de isoflurano a un recipiente sellado en el que se colocó la rata. Una vez sedada, se puso la rata en una plataforma especial que permite que un técnico la pueda intubar. El animal recibió constantemente oxígeno e isoflurano de un respirador para mantener la anestesia. El animal se fijó entonces a un tablero quirúrgico y se utilizó un termómetro rectal para supervisar la temperatura corporal. Se colocó una almohadilla de calentamiento debajo del tablero para mantener la temperatura corporal.
25 Cuando estuvo estable, se afeitó el cuello del animal y se hizo una pequeña incisión para encontrar la vena yugular y la arteria carótida. Cualquier hemorragia leve durante este procedimiento se detuvo con una herramienta de cauterización. Tanto la vena yugular como la arteria carótida se limpiaron y se aislaron del tejido conjuntivo circundante. Antes de insertar las cánulas, se controló el flujo sanguíneo atando una sección de la vena y la arteria. Una vez que las cánulas estuvieron en su lugar, se aseguraron con suturas y se cerró la incisión. La vena yugular se utilizó más tarde para inyectar las sustancias de ensayo (RMP, medicamentos) y la arteria carótida se utilizó para suministrar fluidos vitales (lactato de Ringer) y para monitorizar la frecuencia cardíaca y la presión sanguínea. Esto permite que la rata sobreviva durante las 3-4 horas requeridas. La hemorragia se inició cortando un segmento de 2 mm de un dedo del pie y se recogió toda la sangre en el tubo para la "pérdida total de sangre" y se midió el tiempo hasta que paró la hemorragia.

35 Se obtuvieron los datos de la línea base para $n = 23$ animales no tratados (controles; a la izquierda). La disfunción plaquetaria se indujo mediante infusión de clopidogrel (Plavix) a una dosis de 10 mg/kg a través del catéter 10 min antes de la hemorragia. La barra del centro muestra un aumento del tiempo de hemorragia y de pérdida de sangre debido al clopidogrel. La barra de error es de \pm SEM. El panel izquierdo es una comparación del tiempo de hemorragia entre los controles, los animales tratados con Plavix, y los animales tratados con ambos Plavix y las RMP. El panel derecho es una comparación de la pérdida de sangre total entre los mismos grupos. Las RMP administradas a una dosis de $2,0 \times 10^9$ /kg en un volumen de 400 μ L cinco minutos antes de la hemorragia dieron la corrección del tiempo de hemorragia y de pérdida de sangre a un intervalo casi normal, como se muestra (barras de la derecha). Obsérvese la casi normalización del tiempo de hemorragia y de pérdida de sangre por infusión de las RMP.

45 En este modelo animal, se utilizó una instrumentación mejor para medir la frecuencia cardíaca, la presión sanguínea, la respiración y la temperatura. Los signos vitales fueron estrechamente monitorizados antes y después de la infusión de las RMP. El tiempo de hemorragia y la pérdida total de sangre se midieron después de cortar el dedo del pie, como se ha descrito. Se observaron todos los animales tratados durante hasta cuatro horas después del tratamiento (bajo anestesia). Ninguno de los animales tratados con RMP mostró indicación de trombosis o signos de cambio adverso en la temperatura, la frecuencia cardíaca, la respiración, o signos neurológicos. Esto incluyó dos casos ensayados al doble de la dosis efectiva total; no se observó ninguna reducción adicional en el tiempo de hemorragia (por debajo de lo normal). Esto indica ausencia de efectos protrombóticos, y sugiere la seguridad completa en todos los casos estudiados hasta el momento. Puesto que las RMP no llevan el factor tisular (TF), no hay ninguna razón teórica para esperar efectos adversos. La ausencia aparente de efectos adversos incluso a dosis altas se considera que es una ventaja importante de las RMP en comparación con otros productos destinados a este fin.
55

Los inventores han estudiado también la eficacia de las RMP generadas por diferentes instrumentos de alta presión (por ejemplo, Avestin, Constant System) utilizando el modelo de rata descrito anteriormente. Estas RMP fueron tan eficaces en la reducción del tiempo de hemorragia de la cola como lo fueron las RMP producidas por la prensa

francesa, instrumento de alta presión (como se muestra en la Figura 3A). La Tabla 1 compara los marcadores de citometría de flujo medidos sobre las RMP producidas por la prensa francesa con las RMP producidas por un dispositivo Constant Systems o por un dispositivo Avestin. Estos resultados demuestran que las RMP producidas utilizando diversos dispositivos de extrusión a alta presión son similares.

5 Ejemplo 7: Estudio clínico de las RMP en diversos trastornos de hemorragia por medio de TEG.

El tiempo de hemorragia (BT) se utilizaba antiguamente para predecir el riesgo de hemorragia en las operaciones quirúrgicas, pero ahora se sustituye por medidas con tromboelastógrafo (TEG) debido a la superior reproducibilidad y los datos adicionales importantes proporcionados por los instrumentos TEG [9-11]. El TEG es el mejor ensayo *in vitro* para predecir el riesgo de hemorragia *in vivo* y su valor en la evaluación de la hemostasia es bien aceptado. La medida por TEG se utiliza cada vez más para evaluar la hemorragia con procedimientos invasivos o quirúrgicos tales como la biopsia renal [8], la cirugía cardiovascular [9, 10] y los traumatismos [11]. Es una práctica ampliamente aceptada ahora por los cirujanos solicitar previamente sangre para transfusión basándose en la anomalía de TEG en un esfuerzo para evitar una hemorragia excesiva.

15 Protocolo de TEG: Las muestras de sangre se extrajeron en tubos al vacío (vacutainers) con citrato, de pacientes con diversos trastornos hemorrágicos. Se pipetearon muestras de sangre (330 μ L) a la copa del "TEG Haemoscope" (Haemonetics Co.), y después 10 μ L de solución salina (control, sin RMP). Las RMP producidas por medio de extrusión a alta presión se añadieron a cada pocillo a la dosis de $6,8 \times 10^7$ partículas para llevar la concentración final de RMP a 2×10^8 /mL. La reacción se inició mediante la adición de 10 μ L de $CaCl_2$. Se obtuvieron rastreos de TEG sin y con RMP, y se evaluó la alteración de los parámetros de TEG por la adición de RMP. La cantidad de RMP añadida se calculó a partir de la dosis terapéutica determinada en experimentos con animales.

25 Las figuras 4 A-G son ejemplos de estudios clínicos para evaluar la propiedad hemostática de las RMP. Se debe observar que los rastreos de TEG sin RMP se muestran en líneas sólidas sin negrita y los rastreos después de la adición de RMP se muestran en líneas de trazos en negrita. En cada figura, los cambios en R, A y MA se comparan en las casillas junto a las figuras. Estos hallazgos indican el valor potencial de las RMP para tratar diversos trastornos hemorrágicos. Los solicitantes encontraron que el TEG dio resultados que se correspondían estrechamente con los estudios *in vivo* (animales), en particular, los resultados con Plavix, generando la confianza de que el TEG es un buen sustituto para los estudios *in vivo*. Esto confirma las publicaciones sobre que el TEG se correlaciona estrechamente con el tiempo de hemorragia *in vivo* (humano). El TEG es también más reproducible, más rápido, y suministra importantes parámetros adicionales de medida [9-11].

30 Parámetros medidos. El TEG mide el retraso de iniciación de la coagulación (**R**), la tasa de formación de coágulos (**a**, tasa de aumento angular), y la amplitud máxima (**MA**). Se detecta un alto riesgo de hemorragia con un valor de medida de un **R** alto, con una **a** baja, o **MA** baja.

35 En la anemia aplásica (Figura 4A), la médula ósea no puede producir suficientes glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas; este paciente tenía menos del 1 % de plaquetas normales (1000/ μ L frente al valor normal de 250.000/ μ L). La figura no muestra casi ninguna coagulación en ausencia de RMP, pero con una dosis terapéutica de RMP se ve un rastro casi normal como se indica por la iniciación rápida (R = 9,7 min, desde 53,5), un aumento de la tasa de coágulos (a = 52,8 desde 1,3) y un aumento de MA (2,2 a 45,5) como se detalla en las casillas laterales de las figuras.

40 En la ITP (púrpura trombocitopénica idiopática) (Figura 4B), las plaquetas son destruidas por una reacción autoinmune; este paciente tenía sólo el 28 % del número normal de plaquetas. En ausencia de RMP, la coagulación se retrasa casi tres veces más de lo normal (R = 23,9) y la tasa de formación de coágulos es débil como se ve en la baja pendiente (a = 19,5). Se restaura un perfil normal mediante la dosis terapéutica de RMP (R = 8,3, a = 61,8).

45 En este paciente (Figura 4C), la disfunción plaquetaria fue debida a la aspirina, que inhibe la función de las plaquetas y puede dar como resultado una hemorragia grave, especialmente en combinación con otros trastornos o medicamentos. Obsérvese la eliminación del tiempo prolongado de retraso de la coagulación (R) por las RMP.

En este caso (Figura 4D) la disfunción plaquetaria fue debida a la terapia con Plavix (clopidogrel), que inhibe la función de las plaquetas como lo hace la aspirina, pero por un mecanismo diferente (bloqueo de los receptores de ADP). A pesar de un mecanismo diferente de la disfunción plaquetaria, las RMP corrigieron el tiempo prolongado de retraso de la coagulación.

50 La cumadina (también conocida como warfarina) es el más ampliamente utilizado de los "diluyentes sanguíneos" prescritos para la prevención y tratamiento de la trombosis. Actúa evitando la producción efectiva de los diversos factores de coagulación que requieren vitamina K. La sobredosis de cumadina, que sucede comúnmente, puede conducir a una hemorragia grave. En este paciente (Figura 4E), obsérvese que las RMP corrigieron totalmente el tiempo prolongado de retraso de la coagulación (R) y la tasa de coagulación baja (a). Los recuentos de plaquetas fueron normales en este paciente.

Muchos de los nuevos anticoagulantes pronto llegarán al mercado. Los viejos, así como los nuevos anticoagulantes pertenecen a uno de cuatro grupos: 1) antagonistas de la vitamina K tales como la cumadina; 2) heparina y heparina

de bajo peso molecular; 3) inhibidores de la trombina (anti-factor IIa) tal como dabigatrán; y 4) inhibidores del complejo de protrombinasa (anti-factor Xa), tales como fondaparinux y rivaroxabán. Los nuevos anticoagulantes se emplean cada vez más. La heparina de bajo peso molecular (LMWH) y especialmente la enoxaparina (Lovenox) y la dalteparina (Fragmin) son muy utilizadas ahora. Estos nuevos anticoagulantes no tienen antidotos, por lo tanto, las complicaciones hemorrágicas procedentes de los nuevos anticoagulantes son muy problemáticas. La Figura 4F muestra que las RMP corrigen la coagulación inducida anormalmente por Lovenox. Se ha observado una corrección similar a la de las RMP en otras heparinas de bajo peso molecular tales como dalteparina (Fragmin) y fondaparinux (Arixtra), así como dabigatrán (Pradaxa), un nuevo inhibidor de trombina oral (Figura 4G) que es más conveniente y práctico de usar que los anticoagulantes existentes. Las RMP corrigen las anomalías de la coagulación inducidas por anticoagulantes de cualquiera de los cuatro grupos. Por lo tanto, las RMP deberían ser eficaces contra la hemorragia resultante de cualquier nuevo fármaco que pertenezca a uno de estos grupos.

La hemofilia A es un trastorno hereditario caracterizado por hemorragia espontánea debida a niveles bajos de factor VIII funcional (FVIII). Son comunes las hemorragias dolorosas y debilitantes en las articulaciones y membranas mucosas, y la hemorragia cerebral puede ser fatal. El tratamiento es la infusión de concentrados de FVIII pero este tratamiento es a menudo ineficaz debido a la formación de inhibidores del FVIII administrado. Este paciente (Figura 4H) tenía hemofilia A congénita y desarrolló un inhibidor leve. La figura muestra que las RMP corrigieron el retraso prolongado de la coagulación (R) y la tasa normalizada (a) de la coagulación.

Ejemplos 8. Modo de acción de las RMP en la hemostasia

Para investigar cómo ejercen las RMP diversas acciones en la hemostasia, se mezclaron las RMP con plasma deficiente en factor y se estudió la alteración de la actividad procoagulante con TEG. La adición de las RMP al plasma deficiente en factor acortó el tiempo de coagulación (R), aumentó la tasa de coagulación (a) y aumentó la resistencia del coágulo (MA). Sin embargo, el grado de aumento de la actividad procoagulante por las RMP fue diferente entre las deficiencias del factor de coagulación. Los efectos de las RMP en la deficiencia de Factor II, V, VII, VIII, IX, X, XI XII, XIII se muestran en la Tabla 2 [12]. El aumento de la actividad procoagulante por las RMP fue más pronunciado en los plasmas deficientes en Factor VIII (véase la Figura 6) y Factor IX donde las RMP podrían corregir deficiencias tan bajas como 5-10 % de los niveles normales de los factores de coagulación. En todos los casos, la adición de las RMP dio lugar a una corrección significativa del tiempo de coagulación.

Otros trastornos hemorrágicos que han sido corregidos. Se observó que las RMP corregían la anomalía en los siguientes casos según el TEG: (i) pacientes con inhibidores leves de Factor IX, XI; (ii) pacientes tratados con heparina, heparina de bajo peso molecular (Lovenox, Fragmin) y Arixtra; (iii) pacientes con DIC; (iv) enfermedad hepática crónica; (v) trombocitopenia procedente de insuficiencia de la médula ósea, tal como anemia aplásica, síndrome mielodisplásico, leucemias. (no se muestran datos).

Las figuras 7A y 7B muestran el efecto de las RMP sobre la agregación y la adhesión plaquetaria. A bajas concentraciones de ADP (Figura 7A) y de ácido araquidónico (Figura 7B), las RMP mejoraron la agregación plaquetaria medida por agregometría por Chrono-Log. También se ha estudiado el efecto de las RMP sobre la adhesión de las plaquetas mediante un dispositivo de pocillos cónicos (Diamed IMPACT-R), donde las RMP mejoraron la adhesión de las plaquetas mediante el aumento de los tamaños de los agregados. La Figura 8 muestra el aumento de la adhesión plaquetaria. Obsérvese el aumento estadísticamente significativo (* P = 0,02) del tamaño de los agregados de plaquetas por las RMP a velocidad de cizallamiento (S^{-1}) = 1800, que se parece al flujo de la sangre venosa *in vivo* [12].

Tabla 2. Las RMP mejoran la actividad procoagulante en los plasmas deficientes en factor

		R (min)	A (grados)	MA (mm)
F II	RMP-	8,7	63,6	33
	RMP+	8,4	68,1	37
	Δ	-0,3	4,5	4
F V	RMP-	11,2	62,1	29,2
	RMP+	11,1	64,8	28,7
	Δ	-0,1	2,7	-0,5
F VII	RMP-	11,6	57,7	29,6
	RMP+	11,3	62	25,5
	Δ	-0,3	4,3	-4,1
F VIII	RMP-	30,8	23,1	26,3
	RMP+	16,6	52,6	29,7
	Δ	-14,2	29,5	3,4
	RMP-	77,2	1,1	7,2

		R (min)	A (grados)	MA (mm)
F IX	RMP+	28,2	12,6	27,8
	Δ	-49	11,5	20,6
F X	RMP-	11,2	62,1	29,1
	RMP+	11,1	64,8	28,7
	Δ	-0,1	2,7	-0,4
F XI	RMP-	14,8	55,6	27,6
	RMP+	12,2	50,2	47,7
	Δ	-2,6	-5,4	20,1
F XII	RMP-	13,1	32,9	25,4
	RMP+	11,1	55,3	35,2
	Δ	-2	22,4	9,8
F XIII	RMP-	8,5	56,2	20,8
	RMP+	8,2	57,7	24,1
	Δ	-0,3	1,5	3,3

5 Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden configurar diversas adaptaciones y modificaciones de la realización preferida que se acaba de describir sin apartarse del alcance de la invención. La realización ilustrada se ha expuesto solamente a efectos de ejemplo y no se debe tomar como limitante de la invención. Por lo tanto, ha de entenderse que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la invención puede ser practicada de modo distinto a como se ha descrito específicamente en la presente memoria.

Referencias

1. Hannon T, Gjerde KP: The contemporary economics of transfusions. In Perioperative Transfusion Medicine; Speiss RD, Spence RK, Shander A (eds.), Lippincott Williams and Wilkins, p. 13 (2006).

10 2. Mannucci PM: Desmopressin (DDAVP) in the treatment of bleeding disorders: the first 20 years. Blood 1997; 90(7): 2515-21.

3. Hedner U: NovoSeven as a universal hemostatic agent. Blood Coagul Fibrinolysis 2000; 11(Suppl 1): S107-11.

4. Hawskworth JS, et al: Evaluation of lyophilized platelets as an infusible hemostatic agent in experimental non non-compressible hemorrhage in swine. J Thromb Haemost 2009; 7(10): 1663-71.

15 5. Jy W, Bidot L, Jimenez JJ, Horstman LL, Bang J, Lin A, Zambrano Jr W, Ahn E, Ahn Y-S: Thrombin generation profiles are qualitatively and quantitatively distinct in microparticles derived from red cells (RMP), platelets (PMP), and endothelia (EMP). Blood 2006; 108(11): 499a (Ab1759).

6. Hemker, H. C.: Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. Pathophysiol Haemost Thromb 33 (1), 4-15 (2003).

20 7. Luddington, R. and Baglin, T.: Clinical measurement of thrombin generation by calibrated automated thrombography requires contact factor inhibition. J Thromb Haemost 2 (11), 1954-1959 (2004).

8. Bidot, L., Jy, W., Bidot Jr, C., Jimenez, J. J., Fontana, V., Horstman, L. L and Ahn, Y. S.: Microparticle-mediated thrombin generation assay: increased activity in patients with recurrent thrombosis. J Thromb Haemost 6, 913-919 (2007).

25 9. Davis CL, Chancier WL: Thromboelastography for the prediction of bleeding after transplant renal biopsy. J Am Soc Neph 1995; 6(4): 1250-5.

10. Ronald A, Dunning J: Can the use of thromboelastography predict and decrease bleeding and blood and blood product requirements in adult patients undergoing cardiac surgery? Interact CardioVas Thorac Surg 2005; 4:456-63.

30 11. Plotkin AJ, Wade CE, Jinkins DH, et al: A reduction in clot formation rate and strength assessed by thromboelastography is indicative of transfusion requirements in patients with penetrating injuries. J Trauma 2008; 64(2 Suppl.): S 64-8.

12. Ahn YS, Jy W, Johansen M, Horstman LL: Red cell derived microparticles (RMP) as hemostatic agent to treat bleeding disorders: The mode of action of RMP. JTH (Suppl. 2): 269(2011) (Presented at the International Society of Thrombosis & Hemostasis, Jul. 26, 2011, Kyoto, Japan).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir micropartículas derivadas de glóbulos rojos (RMP) que comprende las etapas de:
poner en suspensión los glóbulos rojos sanguíneos en un diluyente acuoso para formar una suspensión celular;
presurizar la suspensión celular;
- 5 extruir la suspensión celular presurizada en una región de presión inferior para generar fuerzas de cizallamiento sobre los glóbulos rojos sanguíneos en suspensión, de modo que las células en suspensión se convierten en una suspensión de RMP crudas; y
eliminar todos los glóbulos rojos enteros de la suspensión de las RMP crudas para fabricar una suspensión final de RMP.
- 10 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en donde se utiliza una prensa francesa para extruir la suspensión celular.
3. El procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además una etapa de liofilización de la suspensión final de las RMP.
4. El procedimiento según la reivindicación 1, en donde los glóbulos rojos sanguíneos son de un donante autólogo.
- 15 5. Micropartículas derivadas de glóbulos rojos (RMP) producidas por el procedimiento de la reivindicación 1, para uso en el tratamiento y prevención de una hemorragia excesiva en un mamífero causada por traumatismos, operaciones quirúrgicas, procedimientos invasivos o debida a trastornos hemorrágicos incluyendo trastornos plaquetarios o de la coagulación, en particular en donde el trastorno plaquetario es una trombocitopenia o una disfunción plaquetaria.

20

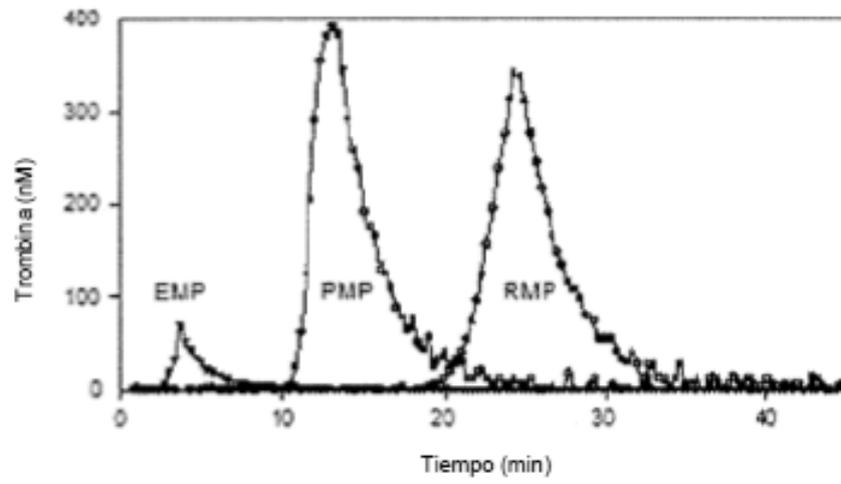


FIG. 1

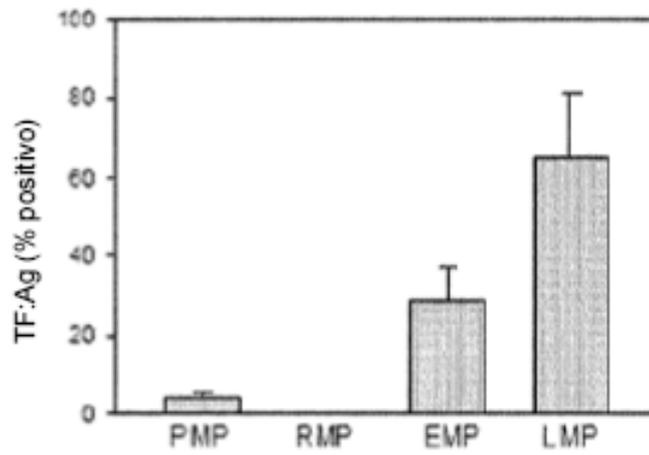


FIG. 2

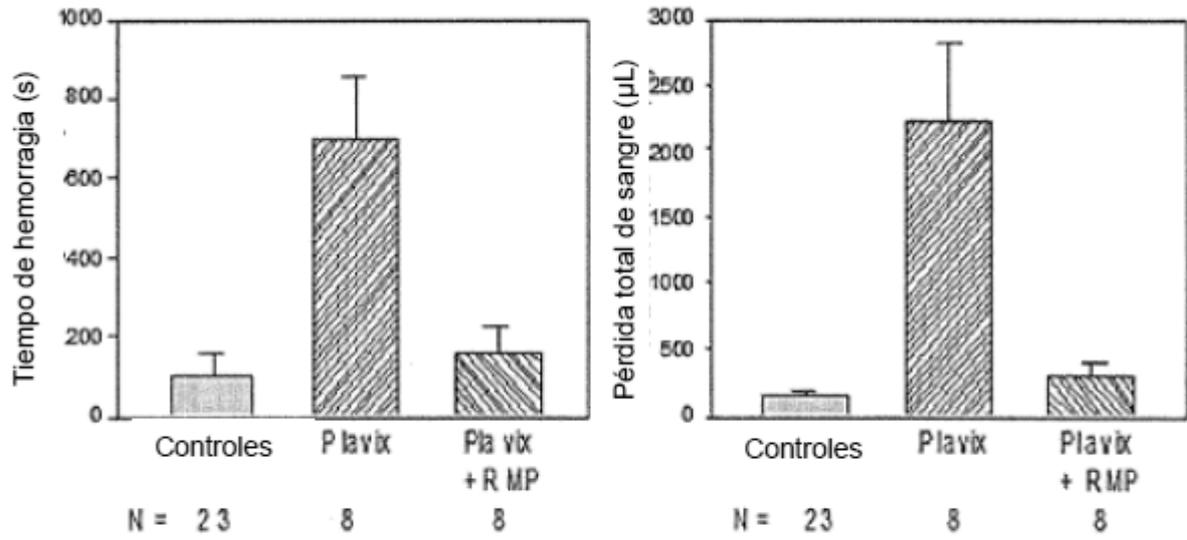


FIG. 3A

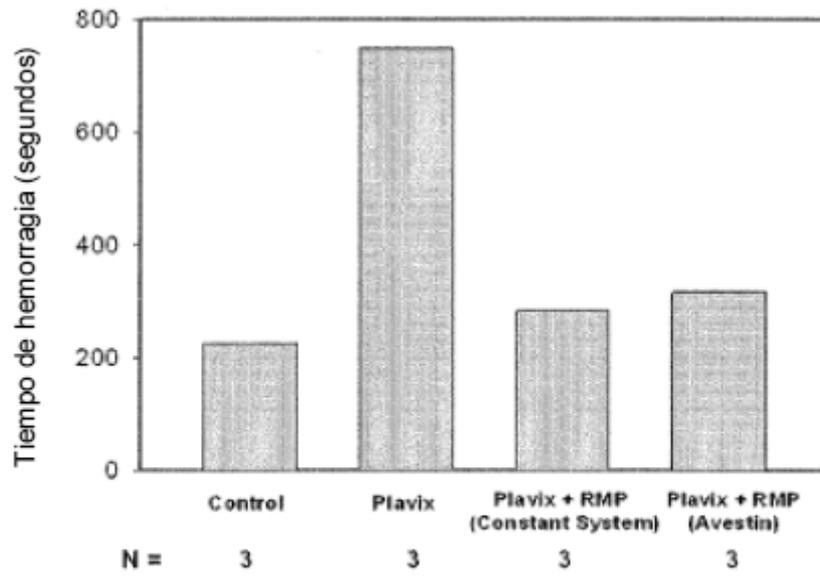


FIG. 3B

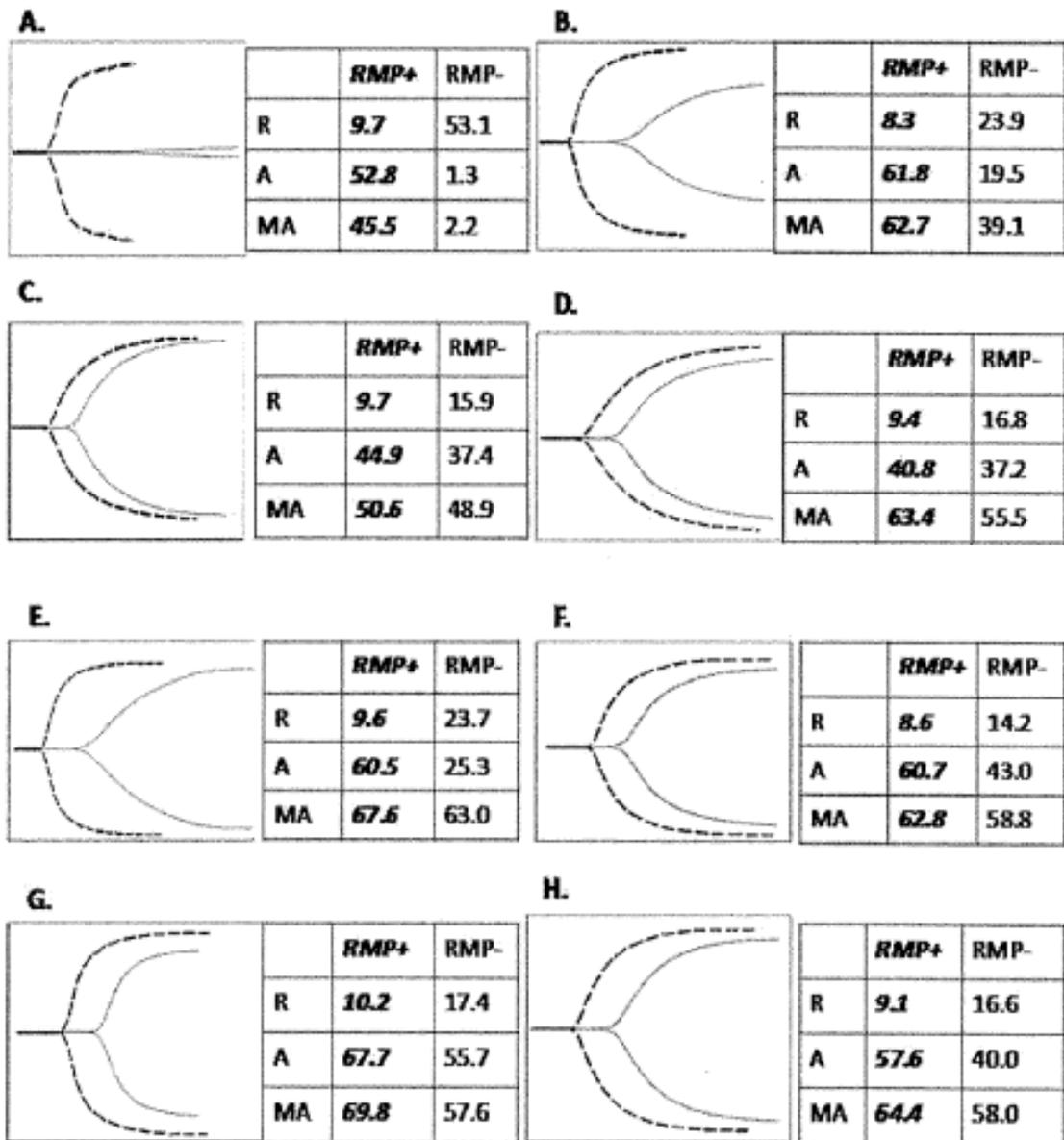
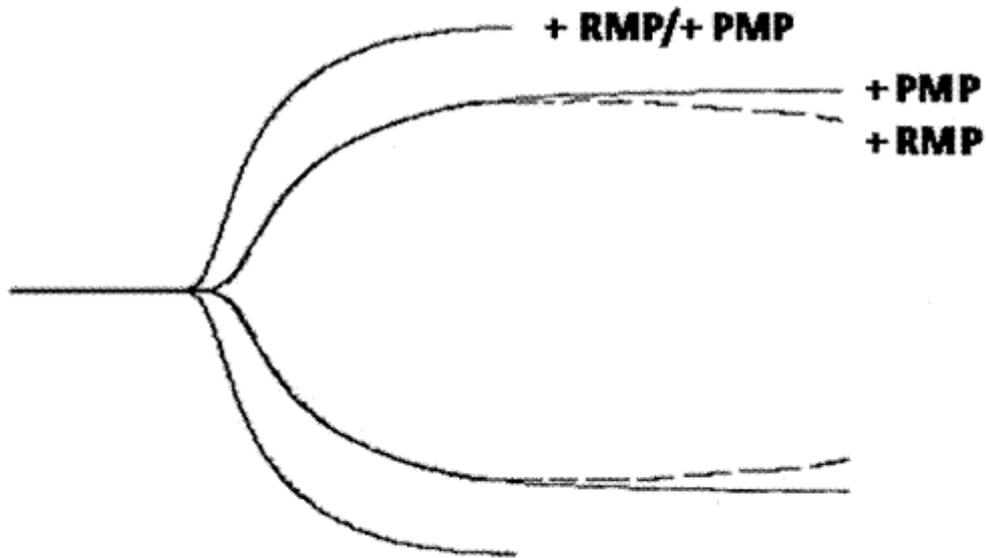


FIG. 4



	+ RMP	+ PMP	+ RMP/+ PMP
R	12.9	13.1	11.2
A	48.5	49.6	63.0
MA	41.5	42.5	57.6

FIG. 5

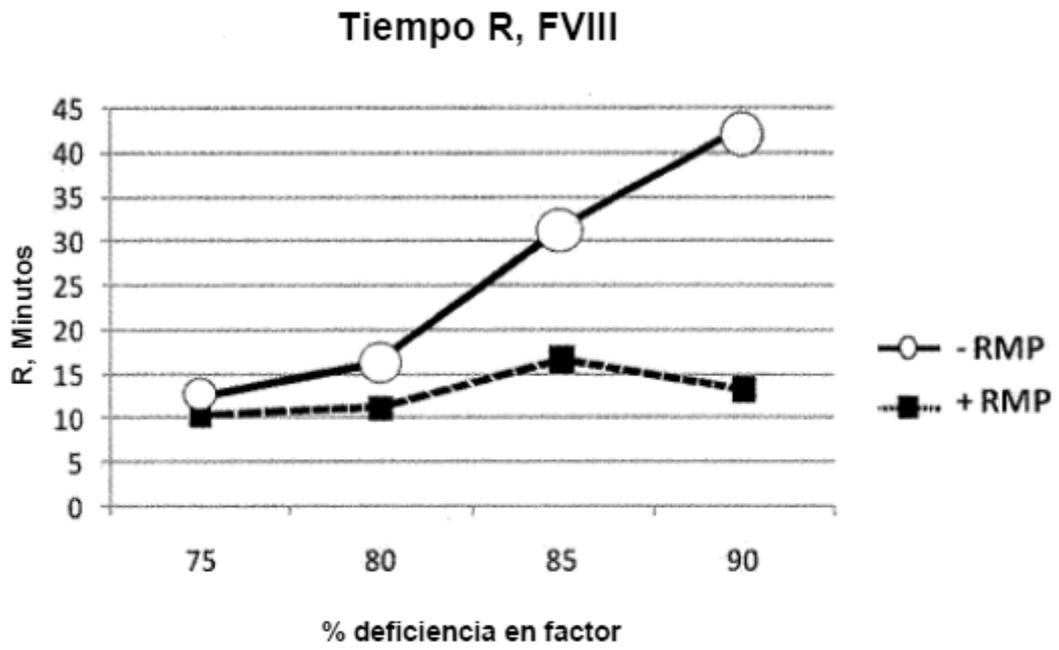


FIG. 6

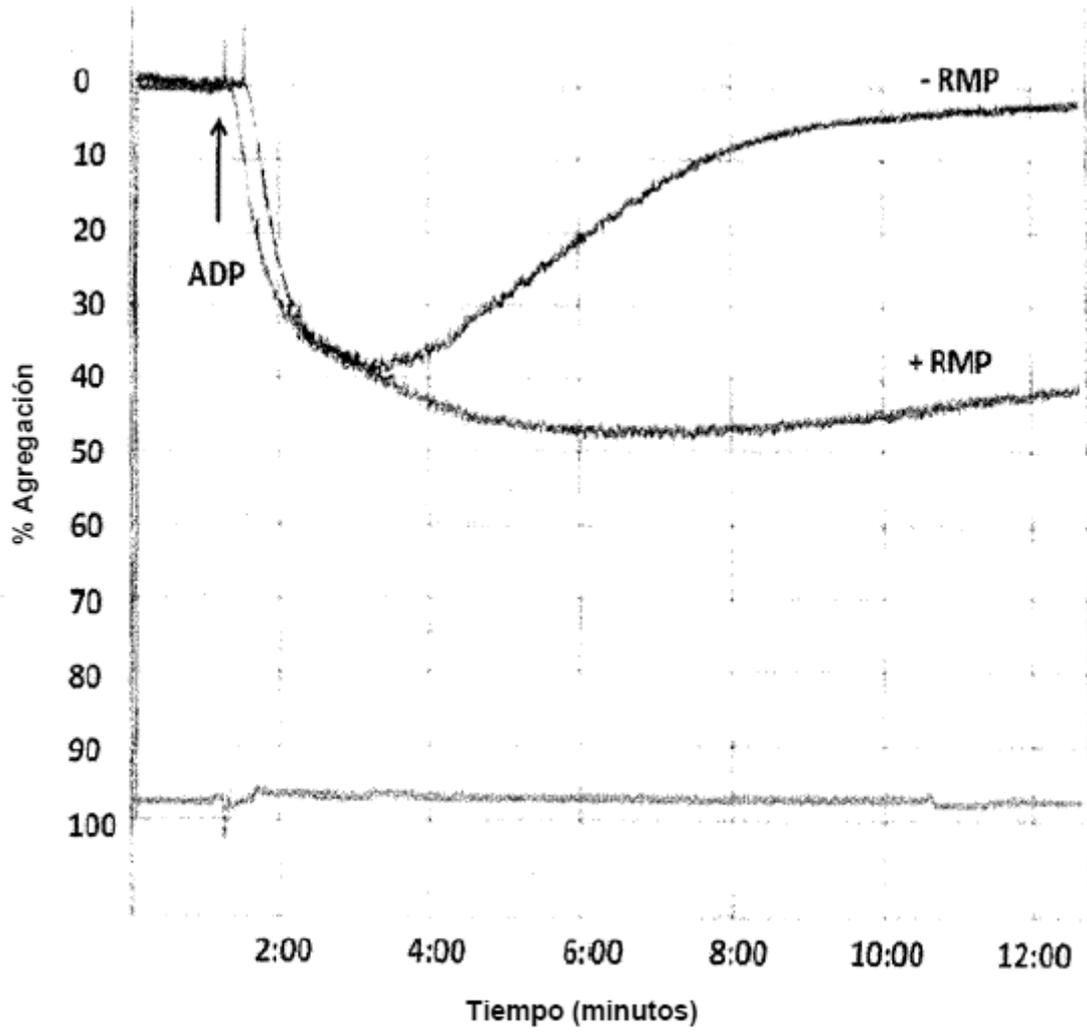


FIG. 7A

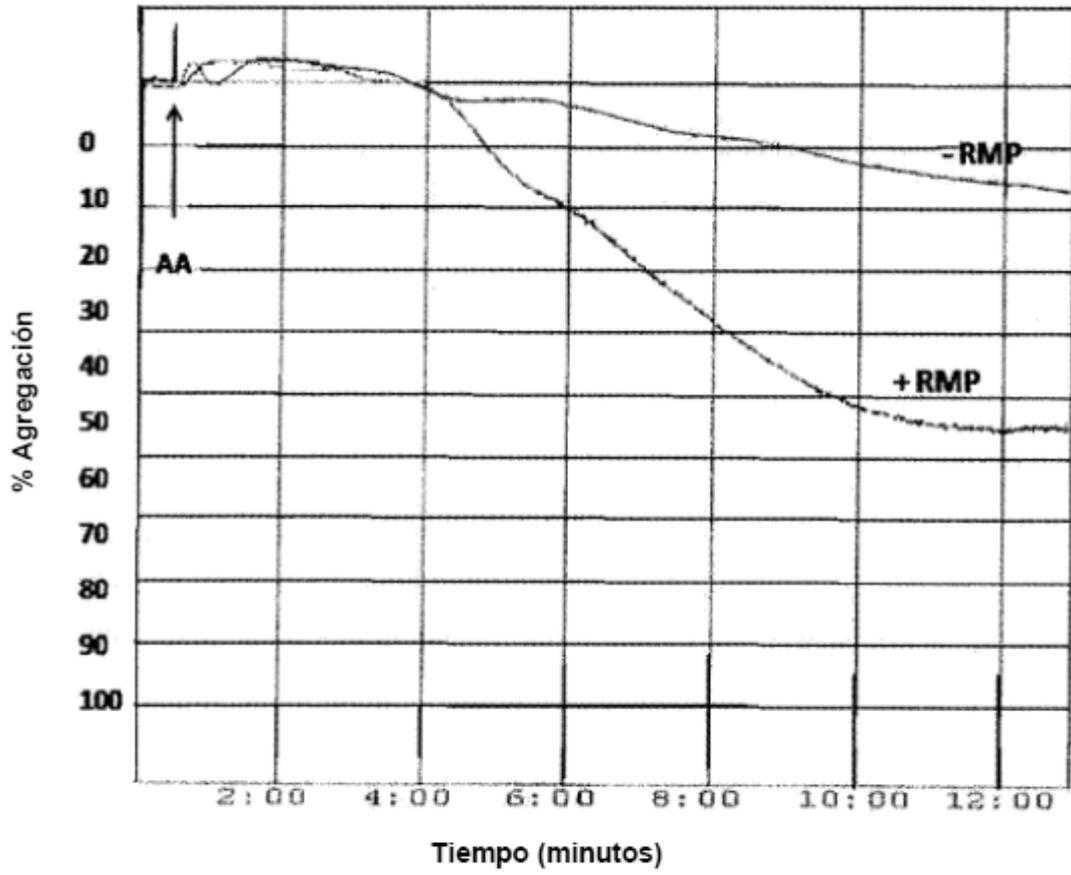


FIG. 7B

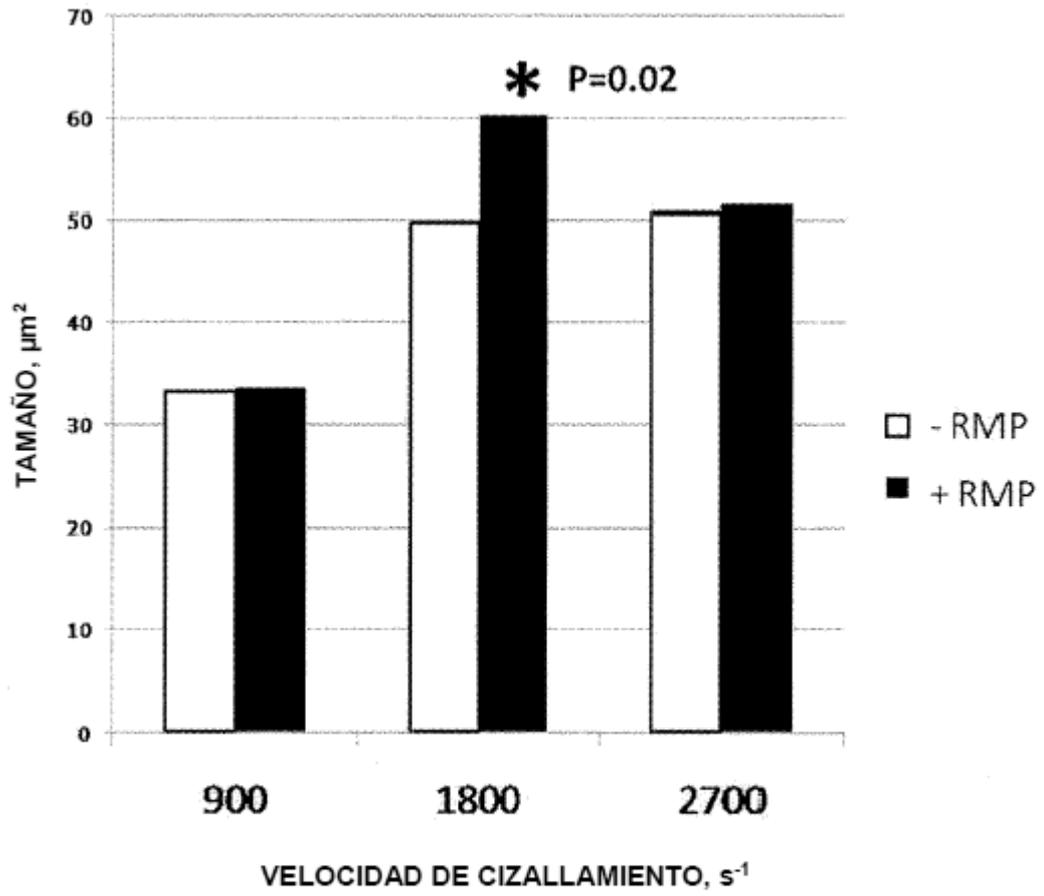


FIG. 8