

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 551**

51 Int. Cl.:

**G01N 31/00** (2006.01)

**C07K 1/00** (2006.01)

**A01N 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2006 PCT/US2006/037741**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2007 WO07038629**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2006 E 06815615 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 1929289**

54 Título: **Composición seca de plaquetas**

30 Prioridad:

**26.09.2005 US 720851 P**

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

**18.05.2018**

73 Titular/es:

**LIFECCELL CORPORATION (100.0%)  
1 MILLENNIUM WAY  
BRANCHBURG, NJ 08876, US**

72 Inventor/es:

**WAGNER, CHRISTOPHER, T.;  
CONNOR, JEROME y  
HARPER, JOHN, R.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 668 551 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

Composición seca de plaquetas

5 La investigación descrita en esta solicitud fue financiada por el número de contrato W81XWH-05-1-0077 del Departamento de Defensa. Así, el gobierno posee ciertos derechos en la invención.

Campo técnico

10 La presente invención se refiere a composiciones secas de plaquetas que contienen inhibidores de la activación plaquetaria.

Antecedentes

15 Las plaquetas son útiles en el tratamiento de varias afecciones patológicas tales como, por ejemplo, heridas, deficiencias plaquetarias (p. ej., trombocitopenia), varias anomalías genéticas o adquiridas y pérdida grave de sangre. Sin embargo, a pesar de su alta demanda, la disponibilidad de las plaquetas ha estado limitada, al menos en parte, por su corta vida útil y la incapacidad de los métodos actuales de preservar la función plaquetaria normal después de almacenamiento durante periodos de tiempo relativamente largos. Existe, por lo tanto, una necesidad de desarrollar composiciones de plaquetas que tengan una vida útil incrementada.

20 WO 01/58266 A1 describe composiciones secas y rehidratadas de plaquetas que comprenden plaquetas, estando las plaquetas cargadas efectivamente con trehalosa para preservar las propiedades biológicas durante la liofilización y rehidratación y además adenosina o iloprost para uso en una matriz biocompatible, tal como un apósito para heridas.

Sumario

30 La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que las plaquetas secadas y rehidratadas en presencia de un aditivo crioprotector (CPA) que contiene tres inhibidores de la activación plaquetaria y crioprotectores retienen todo, o un nivel sustancial, de la función normal. Estos descubrimientos proporcionan la base para una composición seca de plaquetas (p. ej., una composición liofilizada de plaquetas) y métodos para preparar una composición liofilizada de plaquetas.

35 Más específicamente, la invención proporciona una composición seca de plaquetas. La composición incluye: una pluralidad de plaquetas secas; e inhibidores de la activación plaquetaria. Los inhibidores de la activación plaquetaria son al menos un efector del sistema del segundo mensajero monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), al menos un inhibidor del canal de sodio y al menos un efector del sistema del segundo mensajero guanosina 5' monofosfato cíclico (GMPc). Los inhibidores de la activación plaquetaria pueden incluir, por ejemplo, adenosina, amilorida y/o nitroprusido de sodio. Después de la hidratación de la composición, la concentración en la composición: de adenosina puede ser aproximadamente 10  $\mu$ M a aproximadamente 1 mM; la de amilorida puede ser aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM; y la de nitroprusido de sodio puede ser aproximadamente 2,5  $\mu$ M a aproximadamente 250  $\mu$ M. Los efectores del sistema del segundo mensajero AMPc pueden ser, por ejemplo, iloprost, prostaciclina, prostaglandina E<sub>2</sub>, forskolina, toxina del cólera, isoproterenol, 8-bromo monofosfato de adenosina cíclico, dibutil monofosfato de adenosina cíclico, teofilina, isobutilmetil xantina, tirotropina y/o auranofina. Los inhibidores del canal de sodio pueden ser, por ejemplo, análogos de amilorida, bepridil, flecainida, saxitoxina, benzamil y/o prajmalio. Los efectores del sistema del segundo mensajero GMPc pueden ser, por ejemplo, L-arginina, óxido nítrico, SIN-1, SIN-1A, factor natriurético atrial, vasopresina, oxitocina y/o trinitrato de glicerilo. La composición incluye además uno o más agentes crioprotectores, p. ej., dimetilsulfóxido (DMSO), maltodextrina, dextrano, hidroxietil almidón, glucosa, polivinil pirrolidona y/o manitol. La composición también puede incluir además plasma sanguíneo seco. Además, la composición puede contener además uno o más componentes de la matriz extracelular (ECM). Los componentes de la ECM pueden ser componentes de partículas de matriz de tejido acelular particulada, p. ej., partículas de matriz dérmica acelular particulada. El uno o más componentes de la ECM pueden ser, por ejemplo, colágeno, elastina, fibronectina, fibrilina, laminina, decorina, fibromodulina, ácido hialurónico y/o un proteoglicano tal como sulfato de heparina, sulfato de condroitina, sulfato de queratán o un proteoglicano de sulfato de dermatán.

40 Además, la hidratación de la composición seca de plaquetas puede dar como resultado una composición rehidratada de plaquetas con sustancialmente el mismo nivel de al menos una función plaquetaria de la que posee una muestra de plaquetas frescas de la que se derivó la composición seca de plaquetas. La al menos una función plaquetaria puede ser la capacidad de agregarse o la capacidad de liberar uno o más factores de crecimiento, una o más citoquinas o una o más quimioquinas. Los factores de crecimiento o quimioquinas pueden ser, por ejemplo, factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), miembros de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), miembros de la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y/o timosina  $\beta$ 4. Alternativamente, la al menos una función plaquetaria puede ser la capacidad de

inducir la proliferación celular (p. ej., de fibroblastos). Las plaquetas de la composición pueden ser plaquetas humanas.

5 Cualquiera de las composiciones de plaquetas descritas en la presente memoria es para uso en el tratamiento de una herida (p. ej., una herida que se beneficiará, o es probable que se beneficie, de la administración de plaquetas (es decir, cualquiera de las composiciones de plaquetas descritas en la presente memoria)) en o sobre un sujeto. La herida puede ser, por ejemplo, una herida interna o una herida cutánea y puede incluir, pero no está limitada a, cualquiera de los tipos de heridas descritos más adelante.

10 Otro aspecto de la invención es un método para preparar una composición liofilizada de plaquetas. El método incluye: proporcionar una muestra que contiene plaquetas; preparar una mezcla que contiene las plaquetas e inhibidores de la activación plaquetaria; y secar la mezcla. Los inhibidores de la activación plaquetaria comprenden al menos un efector del sistema del segundo mensajero monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), al menos un inhibidor del canal de sodio y al menos un efector del sistema del segundo mensajero 5' monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) y pueden ser cualquiera de los recitados anteriormente. En la mezcla, la concentración de adenosina puede ser aproximadamente 10  $\mu$ M a aproximadamente 1 mM, la concentración de amilorida puede ser aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM y la concentración de nitroprusido de sodio puede ser aproximadamente 2,5  $\mu$ M a aproximadamente 250  $\mu$ M. La mezcla incluye además uno o más agentes crioprotectores tales como cualquiera de los recitados anteriormente. La mezcla también puede incluir además plasma sanguíneo. El secado de la mezcla puede hacerse, por ejemplo, liofilizando la mezcla.

El tratamiento incluye la aplicación tópica de la composición seca de plaquetas descrita anteriormente per se en la herida.

25 La herida puede ser una herida cutánea (p. ej., una úlcera por presión, una úlcera por estasis venosa, una úlcera diabética, una úlcera arterial, una herida por lesión, una herida por quemadura, una herida de tejido blando compleja, un injerto o colgajo cutáneo fallido, una herida inducida por radiación o una herida gangrenosa) o una herida interna (p. ej., una herida debajo o por debajo de la piel). Las heridas internas pueden incluir, pero no están limitadas a, una contusión, una fractura, una fístula, una úlcera o una herida por lesión de un órgano interno.

30 El término "seca", tal y como se usa en referencia a las composiciones de plaquetas, plaquetas y otros componentes de las composiciones (p. ej., plasma sanguíneo), significa que las composiciones de plaquetas, plaquetas u otros componentes de las composiciones carecen sustancialmente de agua. "Carecen sustancialmente de agua", tal y como se usa en la presente memoria, significa que contienen menos del 5 por ciento (p. ej., menos del: 4 por ciento; 3 por ciento; 1 por ciento; 0,5 por ciento; 0,2 por ciento; 0,1 por ciento; 0,01 por ciento; o 0,001 por ciento) en peso de agua (incluyendo agua unida y no unida).

40 Tal y como se usa en la presente memoria, una "herida control" es una herida a la que no se ha aplicado una composición de plaquetas de la invención. Dicha herida control puede estar en un sujeto que también tiene una herida a la que se ha aplicado una composición de plaquetas de la invención. Alternativamente, la herida control puede estar en otro sujeto. La herida control es preferiblemente del mismo tipo y tiene el mismo tamaño y está en el mismo tejido u órgano que la herida a la que se aplica una composición de plaquetas de la invención.

45 A no ser que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Más adelante se describen los métodos y materiales preferidos, aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención. Los materiales, métodos y ejemplos descritos en la presente memoria son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

50 Otras características y ventajas de la invención, p. ej., composiciones secas de plaquetas, serán evidentes a partir de la siguiente descripción, a partir de los dibujos y a partir de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

55 La FIG. 1 es un gráfico de barras que muestra la recuperación de la capacidad de agregación de plaquetas que se han liofilizado y rehidratado en presencia o ausencia de una disolución de aditivo crioconservante (CPA) que contiene inhibidores de la activación plaquetaria y agentes crioprotectores. La respuesta de agregación plaquetaria se activó por una combinación de difosfato de adenosina (10 mM) y colágeno (2  $\mu$ g/ml). Los datos se presentan como las respuestas de agregación de las muestras de plaquetas liofilizadas y rehidratadas como porcentajes de la respuesta de agregación de plaquetas frescas de la misma muestra usada para preparar las plaquetas liofilizadas. El experimento se realizó tres veces usando plasma rico en plaquetas (PRP) de un donante separado para cada experimento. Los datos mostrados son las medias obtenidas de los tres experimentos y se indican las desviaciones estándar. Estas medias son las medias de los promedios de tres réplicas en cada grupo experimental.

65

La FIG. 2A es una representación en diagrama del sistema de cultivo celular "Transwell®" usado para medir la proliferación de fibroblastos en respuesta a factores solubles liberados por las plaquetas. Las células fibroblastos se sembraron en las superficies inferiores de los pocillos de las placas de cultivo tisular de 24 pocillos y los materiales plaquetarios de ensayo se añadieron a cámaras Transwell® que tenían suelos que consistían en membranas semipermeables que permiten la difusión de factores solubles (pero no de plaquetas completas o material plaquetario insoluble) desde las cámaras Transwell® al pocillo de cultivo donde se ponen en contacto con los fibroblastos.

La FIG. 2B es un gráfico de barras y de líneas que muestra la inducción de la proliferación en fibroblastos a las 24, 48 y 72 horas de exposición a medio de crecimiento solo, medio con suero reducido solo o medio con suero reducido y factores solubles liberados de plaquetas sonicadas o plaquetas que se habían activado con 1 unidad/ml de trombina en el sistema de cultivo Transwell® descrito en la FIG. 2A. Las barras del gráfico representan el porcentaje de incremento en la cantidad de producto coloreado producido por la conversión metabólica del sustrato MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio, sal interna] (como una indicación del número de células relativo) sobre la línea base (eje de las y izquierdo) y las líneas del gráfico representan los recuentos celulares reales (eje de las x derecho). La línea punteada horizontal indica el número de células en el momento de la exposición inicial de los fibroblastos al material plaquetario (es decir, tiempo 0). El experimento se realizó tres veces usando PRP de un donante separado para cada experimento. Los datos son las medias obtenidas de los tres experimentos y se indican las desviaciones estándar. Estas medias son las medias de los promedios de tres réplicas en cada grupo experimental.

La FIG. 2C es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de inducción de la proliferación de fibroblastos después de 72 horas de exposición a factores solubles liberados de plaquetas sonicadas y activadas. Los datos se obtuvieron de las observaciones en el punto de tiempo de 72 horas del experimento mostrado en la FIG. 2B. El experimento se realizó tres veces usando PRP de un donante separado para cada experimento. Los datos son las medias obtenidas de los tres experimentos y se indican las desviaciones estándar. Estas medias son las medias de los promedios de tres réplicas en cada grupo experimental.

La FIG. 3 es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de inducción de la proliferación de fibroblastos (calculado a partir de los datos obtenidos usando el sistema de cultivo celular Transwell® mostrado en la FIG. 2A) en respuesta a plaquetas frescas y plaquetas liofilizadas y rehidratadas en presencia de CPA (F/D/R CPA). El experimento se realizó tres veces usando PRP de un donante separado para cada experimento. Los datos son las medias obtenidas de los tres experimentos y se indican las desviaciones estándar. Estas medias son las medias de los promedios de tres réplicas en cada grupo experimental.

La FIG. 4 es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de inducción de la proliferación de fibroblastos (calculado a partir de los datos obtenidos usando el sistema de cultivo celular Transwell® mostrado en la FIG. 2A) después de tratamiento con plaquetas frescas, plaquetas liofilizadas y rehidratadas (F/D/R) en presencia de CPA (con CPA) o ausencia de CPA (sin CPA) o plasma obtenido por centrifugación del plasma rico en plaquetas (PRP) que fue la fuente de las plaquetas usadas para preparar las preparaciones liofilizadas de plaquetas o por centrifugación de las dos muestras liofilizadas rehidratadas. La línea punteada muestra el porcentaje de inducción promedio de la proliferación de fibroblastos por las tres muestras de plasma. El experimento se realizó tres veces usando PRP de un donante separado para cada experimento. Los datos son las medias obtenidas de los tres experimentos y se indican las desviaciones estándar. Estas medias son las medias de los promedios de tres réplicas en cada grupo experimental.

La FIG. 5 es un gráfico de barras que muestra la capacidad de varias cantidades de plaquetas (liofilizadas y rehidratadas en presencia de CPA) para inducir la proliferación de fibroblastos según se evalúa usando el sistema de cultivo celular Transwell® mostrado en la FIG. 2A. La leyenda indica las cantidades relativas de plaquetas añadidas a las cámaras Transwell® del sistema de cultivo. El experimento se realizó tres veces usando PRP de un donante separado para cada experimento. Los datos son las medias obtenidas de los tres experimentos y se indican las desviaciones estándar. Estas medias son medias de tres réplicas en cada experimento.

La FIG. 6A es una serie de fotografías de heridas de ratones diabéticos después de la laceración que no se habían tratado (NT) o se habían tratado con plaquetas congeladas frescas (FFP), plaquetas que se habían liofilizado y rehidratado en ausencia de CPA (FDP) o plaquetas que se habían liofilizado y rehidratado en presencia de CPA (FDP-CPA). Barra de la escala, 500 mm.

Las FIGS. 6B y 6C son gráficos de barras que muestran el porcentaje (%) de epitelización (FIG. 6B) y porcentaje (%) de contracción (FIG. 6C) de las heridas mostradas en la FIG. 6A. Barra de la escala, 5 mm.

La FIG. 7A es una serie de fotomicrografías que muestran las diferentes cantidades de deposición de tejido de granulación en secciones histológicas de los lechos de las heridas mostradas en la FIG. 6A. Las flechas indican los márgenes epiteliales y las cajas indican dónde se hicieron las mediciones del área y espesor tisulares (véanse las FIGS. 7B y 7C). Barra de la escala, 100 µm.

Las FIGS. 7B y 7C son gráficos de barras que muestran el área (FIG. 7B) y el espesor (FIG. 7C) del tejido de granulación en las áreas de las heridas mostradas por las cajas en la FIG. 7A. \* indica  $p < 0,01$ .

#### Descripción detallada

5 Las plaquetas constituyen un terapéutico importante para una variedad diversidad de enfermedades o anomalías plaquetarias que implican deficiencia plaquetaria y/o función plaquetaria defectuosa (p. ej., trombocitopenias) así como para el tratamiento de diversas heridas. Sin embargo, la pérdida rápida de la viabilidad y función de las plaquetas durante el almacenamiento ha complicado en gran medida la gestión de un inventario efectivo de plaquetas en los bancos de sangre. En muchos entornos, la vida útil limitada de las plaquetas ha reducido drásticamente su uso.

15 Las directrices actuales permiten que las plaquetas se almacenen durante un máximo de solo 5 días a 20 °C-24 °C, creando un problema de control de inventario para los bancos hospitalarios y de sangre [Lazarus et al. (1982) Transfusion 22:39-43; Murphy (1985) Seminars in Hematology 22:165-177]. Esta restricción de tiempo se estableció, al menos en parte, debido a preocupaciones acerca del potencial de contaminación microbiana durante el almacenamiento de las plaquetas a temperatura ambiente. Por otra parte, el uso de diversos métodos de crioconservación para prolongar la vida útil de las plaquetas no se ha demostrado muy efectivo. Dichos métodos dan como resultado, por ejemplo, una pérdida de la morfología discoide normal de las plaquetas, una pérdida del número celular de plaquetas y una reducción de la actividad funcional plaquetaria [Balduni et al. (1993) Haematologia. 78:101-104; Bock et al. (1995) Transfusion. 35:921-924]. Por lo tanto, es deseable obtener plaquetas que retengan la función después del almacenamiento durante periodos de tiempo prolongados.

25 Los inventores encontraron que las plaquetas liofilizadas y rehidratadas en presencia de una disolución de aditivo crioconservante (CPA) que contenía inhibidores de la activación plaquetaria, retienen sus propiedades funcionales. Las plaquetas liofilizadas y rehidratadas con CPA presentaron una agregación inducida por agonista incrementada comparada con plaquetas liofilizadas y rehidratadas sin CPA y retuvieron su capacidad para secretar factores de crecimiento. En el caso de TGF- $\beta$  (como un factor de crecimiento representativo), sustancialmente toda la proteína detectada por un anticuerpo específico de TGF- $\beta$  producida por plaquetas liofilizadas y rehidratadas con CPA tenía actividad. Además, las plaquetas liofilizadas y rehidratadas con CPA secretaron factores que inducían la proliferación en fibroblastos, un determinante importante para el cierre y remodelado normales de heridas. En un modelo de herida en ratón diabético, la administración a la herida de plaquetas que se habían liofilizado en presencia de CPA dio como resultado una cicatrización incrementada de la herida según se evalúa por el grado de granulación, cierre de la herida, vascularidad y proliferación celular.

35 Estos descubrimientos proporcionan un apoyo para las composiciones y métodos de la invención, que se describen a continuación.

#### Composiciones secas de plaquetas

40 La invención proporciona una composición seca de plaquetas. La composición se prepara secando (p. ej., liofilizando) plaquetas aisladas o preparaciones o muestras (p. ej., plasma rico en plaquetas) que contienen plaquetas en presencia de inhibidores de la activación plaquetaria que comprenden al menos un efector del sistema del segundo mensajero monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), al menos un inhibidor del canal de sodio y al menos un efecto del sistema del segundo mensajero 5' monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). Tal y como se usa en la presente memoria, "activación plaquetaria" se refiere a un proceso biológico (p. ej., mediado por trombina) o físico (p. ej., exposición a temperatura baja, p. ej., 4 °C) que da lugar a un cambio en la forma (discoide a esferoide a amorfa) de la plaqueta y/o liberación de gránulos de la plaqueta y o agregación plaquetaria. Un "inhibidor de la activación plaquetaria" es un agente que puede prevenir totalmente o disminuir parcialmente la activación plaquetaria.

55 Las preparaciones o muestras que contienen plaquetas útiles para preparar las composiciones de la invención preferiblemente carecen de células distintas de las plaquetas. Sin embargo, pueden contener números bajos de dichas células, p. ej., células sanguíneas tales como eritrocitos, linfocitos, granulocitos, monocitos y/o macrófagos. Contendrán, preferiblemente, menos del 10 % (p. ej., menos del: 5 %; 2 %; 1 %; 0,1 %; 0,01 %; 0,001 %; o 0,0001 %) de cualquiera de los tipos de células distintos de plaquetas presentes en la sangre a partir de la que se preparó una preparación o muestra de plaquetas relevante.

60 La composición seca de plaquetas de la invención contiene una pluralidad de plaquetas secas e inhibidores de la activación plaquetaria. Los inhibidores de la activación plaquetaria incluyen al menos un efector (activadores o potenciadores) del sistema del segundo mensajero monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), al menos un inhibidor de los canales de sodio y al menos un efector (activadores o potenciadores) del sistema del segundo mensajero monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). Otros inhibidores de la activación plaquetaria incluyen inhibidores del sistema del segundo mensajero ciclooxigenasa, inhibidores de la ruta de la lipoxigenasa, inhibidores de la ruta de la fosfolipasa, inhibidores de la cascada de calcio, inhibidores de proteasa y proteinasa y modificadores de la membrana.

Los efectores del sistema del segundo mensajero AMPc incluyen, por ejemplo, adenosina, iloprost, prostaciclina, prostaglandina E<sub>2</sub>, forskolina, toxina del cólera, isoproterenol, 8-bromo monofosfato de adenosina cíclico, dibutil monofosfato de adenosina cíclico, teofilina, isobutilmetil xantina, tirotropina y auranofina. Los inhibidores del canal de sodio incluyen, por ejemplo, amilorida, análogos de amilorida, bepridil, flecainida, saxitoxina, benzamil y prajmalio.

5 Los efectores del sistema del segundo mensajero GMPc incluyen, por ejemplo, nitroprusido de sodio, L-arginina, óxido nitroso, SIN-1 (3-morfolinosisidonimina), SIN-1A (N-nitroso-N-morfolinoamino-acetonitrilo), factor natriurético atrial, vasopresina, oxitocina y trinitrato de glicerilo. Los inhibidores de la ruta de la ciclooxigenasa pueden ser aspirina, dipiridamol, flurbiprofeno, ticlopidina, ketoprofeno, ibuprofeno, indometacina, sulfpirazona, guanabenz, ácido ursólico y benzohidroquinona. Los inhibidores de la ruta de la lipoxigenasa incluyen aspirina, ticlopidina, ácido

10 ursólico, unbeliferona, ácido 5,8,11,14 eicosatetraenoico y esculetina. Los inhibidores de la ruta de la fosfolipasa incluyen quinacrina y mepacrina. Los inhibidores de la cascada de calcio incluyen efectores de la proteína quinasa C, bloqueantes del canal de calcio, modificadores de la concentración de calcio, efectores de calmodulina, ionóforos de calcio y estimuladores de la ATPasa. Los inhibidores de proteasa y proteinasa incluyen heparina y apoprotinina. Los modificadores de la membrana incluyen amantadina, heparina, ticlopidina, pentoxifilina y ajoeno. Los inhibidores de la activación plaquetaria se describen con más detalle en la Patente de EE.UU. N° 5.919.614.

La composición seca de plaquetas de la invención puede incluir adenosina como un efector del sistema del segundo mensajero AMPc, amilorida como un inhibidor del canal de sodio y nitroprusido de sodio como un efector del sistema del segundo mensajero GMPc. La concentración de estos inhibidores de la activación plaquetaria en la disolución en la que se secan las plaquetas, o después de la rehidratación (si se rehidratan), puede ser como sigue: la concentración de adenosina puede ser aproximadamente 10 µM a aproximadamente 1 mM (p. ej., aproximadamente 100 µM a aproximadamente 1 mM o aproximadamente 10 µM a aproximadamente 0,1 mM); la concentración de amilorida puede ser aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM (p. ej., aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM o aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1 mM) y la concentración de nitroprusido

20 de sodio puede ser aproximadamente 2,5 µM a aproximadamente 250 µM (p. ej., aproximadamente 25 µM a aproximadamente 250 µM o aproximadamente 2,5 µM a aproximadamente 25 µM). Por ejemplo, en una realización preferida, la concentración de adenosina es 0,1 mM, la concentración de amilorida es 0,25 mM y la concentración de nitroprusido de sodio es 50 µM.

30 El término "aproximadamente" usado respecto a las concentraciones de inhibidores de la activación plaquetaria y crioprotectores (véase más adelante) indica que la concentración del agente al que se hace referencia puede variar hasta un 20 % (p. ej., hasta: 15 %; 10 %; 5 %; 2,5 %; o 1 %) de la concentración indicada.

Además de los inhibidores de la activación plaquetaria, se añaden uno o más agentes crioprotectores (también referidos en la presente memoria como crioprotectores) a las plaquetas antes del secado. Dichos agentes crioprotectores pueden ser, por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO), maltodextrina, dextrano, hidroxietil almidón, glucosa, polivinil pirrolidona, manitol y combinaciones de estos. La concentración de DMSO puede ser de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 10 % (p. ej., aproximadamente 1,0 % a aproximadamente 10 %; o aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1 %). En una realización preferida, la concentración de DMSO puede ser 0,5 %. Así, como se han añadido uno o más agentes crioprotectores a una preparación de plaquetas antes del

35 secado, la composición seca de plaquetas resultante contendrá el uno o más agentes crioprotectores apropiados.

Cuando un inhibidor de la activación plaquetaria o un agente crioprotector que se añade a las plaquetas antes del secado es en su forma pura un líquido (p. ej., DMSO), la composición seca de plaquetas (y su forma rehidratada)

45 probablemente contiene menos del inhibidor de la activación plaquetaria o del agente crioprotector que antes del secado.

Además de los inhibidores de la activación plaquetaria y los agentes crioprotectores, las composiciones secas de plaquetas de la invención pueden contener una o más proteínas. Por ejemplo, las composiciones pueden contener plasma sanguíneo seco, p. ej., plasma sanguíneo seco derivado del donante de las plaquetas. Este será inherentemente el caso cuando las composiciones se preparan usando plasma rico en plaquetas (PRP) como la preparación de plaquetas usada para preparar la composición. Además, las proteínas en la composición pueden estar presentes como suero sanguíneo seco. Alternativamente, la proteína puede añadirse a la mezcla de plaquetas antes del secado en la forma de una o más (p. ej., todas) proteínas aisladas derivadas del plasma sanguíneo o

50 derivadas del suero sanguíneo (p. ej., albúmina o gamma globulinas). El plasma sanguíneo, suero sanguíneo o proteína(s) derivada(s) de cualquiera de los dos pueden ser del mismo donante que las plaquetas (es decir, autólogo), uno o más donantes de la misma especie o uno o más donantes de una o más especies distintas. Las especies a partir de las que se obtienen estas fuentes de proteínas pueden ser cualquiera de las listadas más adelante como fuentes de plaquetas para las composiciones (véase más adelante). Además, las proteínas de la sangre o suero pueden ser proteínas recombinantes.

55

60

Las composiciones secas de plaquetas también pueden contener un o más componentes de la matriz extracelular (ECM), p. ej., cualesquiera tipos de colágeno (tales como, por ejemplo, colágenos I, II, III o IV o cualquiera de los colágenos V - XVII), elastina, fibronectina, laminina, decorina, fibrilina, fibromodulina, ácido hialurónico y/o un proteoglicano tal como sulfato de heparina, sulfato de condroitina, sulfato de queratán o un proteoglicano de sulfato de dermatán. Estos componentes pueden añadirse a la mezcla que contiene las plaquetas antes del secado o

65

pueden añadirse después del secado. Dichos componentes de la ECM pueden potenciar la reparación de heridas proporcionando una estructura de soporte y sitios de unión local para factores liberados por las plaquetas administradas. Además, cuando se añaden a mezclas de plaquetas antes del secado por liofilización, los componentes de la ECM (como los aditivos proteicos descritos anteriormente) pueden sustituir una cantidad significativa de agua en la mezcla de plaquetas, reduciendo de esta manera la cantidad de hielo formado en la congelación de la mezcla de plaquetas y, por lo tanto, reduciendo el daño mediado por el hielo en las plaquetas. Los componentes de la ECM pueden obtenerse de cualquiera de los donantes descritos anteriormente para plasma sanguíneo, suero sanguíneo o proteínas derivadas de cualquiera de los dos. Además, la ECM que son proteínas pueden ser proteínas recombinantes. Los componentes de la ECM pueden añadirse, por ejemplo, en la forma de matriz tisular acelular particulada preparada a partir de cualquiera de una variedad de tejidos que contienen colágeno, p. ej., la dermis. Las matrices tisulares acelulares particuladas se describen con detalle en la Patente de EE.UU. N.º 6.933.326, Solicitud de EE.UU. N.º de Serie 10/273.780 y Solicitud de EE.UU. N.º de Serie 10/959.780.

Una proporción sustancial de las plaquetas de la composición seca de plaquetas recupera al menos una función plaquetaria (p. ej., al menos: dos; tres; o cuatro funciones plaquetarias) después de la rehidratación (*in vitro* o *in vivo*). Después del secado y la rehidratación, una composición de plaquetas de la invención tiene al menos el 10 % (p. ej., al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 %) del nivel de al menos una función plaquetaria de lo que tendría una preparación fresca correspondiente (no secada y rehidratada, del mismo donante, y que contiene el mismo número de plaquetas que la composición de plaquetas de la invención) de plaquetas. Además, al menos el 10 % (p. ej., al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 %) de las plaquetas de una composición seca de plaquetas de la invención tiene, después de la rehidratación, al menos una función plaquetaria. Las funciones plaquetarias relevantes incluyen, por ejemplo, producción de factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas después de la activación; la capacidad de estimular la proliferación celular (p. ej., fibroblastos, célula endotelial o célula epitelial (p. ej., queratinocito)) después de la activación; y la capacidad de agregarse después de la activación. Los ensayos para la función plaquetaria son conocidos en la técnica e incluyen los descritos en los Ejemplos más adelante. Los factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas producidos por las plaquetas incluyen, sin limitación, factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), miembros de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (p. ej., PDGF-A, B, C, D y A/B), factor de crecimiento epidérmico (EGF), miembros de la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D) y timosina- $\beta$ 4. Los indicios adicionales de la función plaquetaria intacta que pueden ensayarse incluyen, sin limitación, puntuación de la morfología (proporción de plaquetas que son discoideas, esferoides y/o amorfas), grado de cambio en la forma (ESC), respuesta a choque hipotónico (HSR), grado de cambio en la forma (ESC), agregación plaquetaria (según se mide por agregometría plaquetaria), eficiencia para inducir la coagulación sanguínea (según se mide por tromboelastografía (TEG)) y niveles plaquetarios de trifosfato de adenosina (ATP). La expresión de P-selectina en la superficie de una plaqueta indica que se ha desgranulado. La desgranulación puede ocurrir, por ejemplo, sin agregación.

La evaluación de la función plaquetaria en las composiciones secas rehidratadas de plaquetas puede ser cuantitativa, semicuantitativa o cualitativa. Así, puede medirse, por ejemplo, como un valor discreto o expresarse respecto a una línea base o mediciones similares en muestras control (p. ej., plaquetas frescas). La función plaquetaria puede evaluarse y expresarse usando cualquiera de una diversidad de sistemas semicuantitativos/cualitativos conocidos en la técnica. Así, la viabilidad y/o función plaquetaria puede expresarse, por ejemplo, como (a) uno o más de "excelente", "buena", "satisfactoria" y/o "pobre"; (b) uno o más de "muy alta", "alta", "promedio", "baja" y/o "muy baja"; o (c) uno o más de "++++", "+++", "++", "+", "+/-" y/o "-".

Las plaquetas pueden obtenerse de uno o más individuos de cualquiera de una diversidad de especies de mamíferos (p. ej., seres humanos, primates no humanos (p. ej., monos, babuinos o chimpancés), vacas, ovejas, caballos, cabras, cerdos, perros, gatos, conejos, cobayas, hámsteres, jerbos, ratas o ratones) pero preferiblemente de la misma especie de un sujeto al que se van a administrar. La composición seca de plaquetas puede usarse *in vitro* o *in vivo*. Los usos *in vitro* de la composición seca de plaquetas incluyen su uso como dianas para ensayos de cribado o ensayo de compuestos de interés *in vitro*, p. ej., para aquellos con actividad estimuladora de la hemostasis, aquellos con actividad inhibidora de la hemostasis o aquellos que estimulan la cicatrización de heridas.

La composición seca de plaquetas puede rehidratarse (p. ej., con una disolución fisiológica tal como disolución salina normal o medio de cultivo) y sembrarse en placas de cultivo tisular.

Las composiciones secas de plaquetas también pueden usarse para la producción *in vitro* y aislamiento posterior de factores solubles que son expresados por las plaquetas (véase anteriormente). Dichos factores son útiles como herramientas de diagnóstico en sí mismos o pueden usarse como antígenos para generar anticuerpos para uso en diagnóstico. Además, las plaquetas secas rehidratadas de la invención pueden usarse en ensayos de eficacia de fármacos o toxicidad *in vitro*. La composición seca de plaquetas también puede usarse como "controles positivos" en procedimientos para desarrollar otras composiciones de almacenamiento de plaquetas.

Las plaquetas obtenidas mediante la rehidratación de una composición seca de plaquetas de la invención también pueden usarse para soportar el crecimiento y/o la diferenciación de células distintas de plaquetas en cultivo. Dichas

plaquetas después de la activación pueden estimular, por ejemplo, la supervivencia y/o crecimiento de células fibroblastos u otras células (p. ej., fibroblasto, célula endotelial o célula epitelial (p. ej., queratinocito)) en cultivo celular. La composición seca de plaquetas también puede usarse para estudios científicos básicos *in vitro* e *in vivo* de la función plaquetaria.

5 Los usos *in vivo* de las composiciones secas de plaquetas, o de plaquetas derivadas de estas, incluyen, por ejemplo, estudios en modelos animales (p. ej., en cualquiera de los mamíferos listados anteriormente) o en sujetos humanos. Dichos estudios pueden realizarse, por ejemplo, con el fin de evaluar la eficacia terapéutica y/o profiláctica de las plaquetas *per se* o de compuestos químicos y moléculas biológicas que modulan (regulan al alza o a la baja) la función plaquetaria. Otros usos de las composiciones de plaquetas de la invención incluyen métodos de tratamiento (véase más adelante).

15 Los métodos para aislar plaquetas son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, las plaquetas pueden prepararse por centrifugación de sangre completa bien por el método del plasma rico en plaquetas (PRP) o el método de la capa leucoplaquetaria. Además, las plaquetas pueden recogerse por varias técnicas de aféresis que están disponibles en la técnica.

#### Método para preparar una composición liofilizada de plaquetas

20 También está englobado por la invención un método para preparar una composición liofilizada de plaquetas. El método incluye: (a) proporcionar una preparación o muestra de plaquetas; (b) preparar una mezcla incluyendo las plaquetas e inhibidores de la activación plaquetaria que comprenden al menos un efector del sistema del segundo mensajero monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), al menos un inhibidor del canal de sodio y al menos un efector del sistema del segundo mensajero 5' monofosfato de guanosina cíclico (GMPc); y (c) secar la mezcla. La mezcla también contiene uno o más crioprotectores. También puede contener opcionalmente una o más proteínas (p. ej., plasma sanguíneo) y/o componentes de la ECM descritos anteriormente.

30 La preparación o muestra de plaquetas, los inhibidores de la activación plaquetaria, los crioprotectores, y las proteínas opcionales, y los componentes de la ECM pueden ser cualquiera de los listados anteriormente. El secado de la mezcla puede ser por cualquier método conocido en la técnica, p. ej., secado al aire, secado en atmósfera de, o bajo una corriente de, un gas inerte (p. ej., nitrógeno o argón) o liofilización. Los métodos de liofilización son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, "A Guide to Freeze-drying for the Laboratory"-an industry service publication por Labconco, 2004; Franks (1994) Proc. Inst. Refrigeration. 91: 32-39 y las Patentes de EE.UU. N.º: 4.619.257; 4.676.070; 4.799.361; 4.865.871; 4.964.280; 5.024.838; 5.044.165; 5.154.007; 6.194.136; 5.336.616; 35 5.364.756; y 5.780.295).

40 La liofilización de las plaquetas usando uno o más inhibidores de la activación plaquetaria, y opcionalmente uno o más crioprotectores, da como resultado un daño funcional mínimo, si existe, en las plaquetas. El equipo de liofilización adecuado está disponible de fuentes comerciales, p. ej., Labconco (Kansas City, MO) y VirTis (Gardiner, NY). La liofilización de una muestra que contiene un líquido (p. ej., agua) implica la congelación de la muestra y la eliminación posterior de los líquidos (p. ej., agua) de la muestra congelada por un proceso denominado sublimación. La congelación puede hacerse, por ejemplo, en el aparato liofilizador o en un congelador a -80 °C. La muestra se enfría hasta que el líquido en la muestra ha solidificado (según se evalúa visualmente). La congelación puede hacerse a una velocidad de enfriamiento de entre, por ejemplo, 1 °C y 5 °C por minuto y preferiblemente no es una "congelación instantánea". Los métodos de congelación se describen extensamente en las referencias anteriores citadas respecto a la liofilización. La sublimación ocurre cuando un líquido congelado pasa directamente al estado gaseoso sin pasar a través de la fase líquida. La liofilización puede conseguirse por cualquiera de una diversidad de métodos, incluyendo, por ejemplo, los métodos de distribuidor, lote o granel.

#### Método de tratamiento

50 La invención permite un método de tratamiento. El método puede incluir identificar a un sujeto que se beneficiará, o es probable que se beneficie, de la administración de plaquetas y administrar al sujeto cualquiera de las composiciones de plaquetas descritas anteriormente.

55 Las composiciones secas de plaquetas pueden administrarse *per se* al sujeto. En este caso, la rehidratación de las plaquetas se produce en el sujeto. Alternativamente, las composiciones de plaquetas pueden rehidratarse y después administrarse al sujeto. En el último caso, la composición puede someterse opcionalmente, antes de ser administrada, a un proceso de lavado para eliminar todos o una cantidad sustancial de los inhibidores de la activación plaquetaria y el uno o más crioprotectores. Dichos métodos de lavado son conocidos en la técnica y generalmente implican una o más (p. ej., dos, tres o cuatro) etapas de centrifugación. Es particularmente deseable realizar dichas etapas de lavado cuando los inhibidores de la activación plaquetaria y/o los crioprotectores usados son tóxicos. En este caso, el lavado se realiza hasta que no permanece nada, o un nivel aceptablemente bajo, de los componentes tóxicos en la composición.

65

La rehidratación (y lavado opcional) puede hacerse con cualquier disolución fisiológica (p. ej., agua, disolución salina normal, medio de cultivo tisular o las disoluciones fisiológicas descritas en los Ejemplos 1 y 7 más adelante) de manera que las plaquetas retienen una o más de sus funciones (véase anteriormente). Las composiciones de plaquetas secadas pueden rehidratarse opcionalmente en el vehículo farmacéuticamente aceptable en el que las plaquetas se van a administrar a un sujeto apropiado (véase más adelante). La rehidratación puede ser por inmersión rápida de las plaquetas en el vehículo relevante o gradual (p. ej., adición gota a gota del vehículo) a las plaquetas secas.

El sujeto que se beneficiará, o es probable que se beneficie, de la administración de las plaquetas puede tener una herida. La herida puede ser una que se beneficiará, o es probable que se beneficie, de ser tratada con las plaquetas. La herida puede ser una herida cutánea que puede ser, o puede ser el resultado de, una úlcera por presión, una úlcera por estasis venosa, una úlcera diabética, una úlcera arterial, una herida por lesión, una herida por quemadura, una herida de tejido blando compleja, un injerto o colgajo cutáneo fallido, daño tisular inducido por radiación y una herida gangrenosa. La herida también puede ser una herida interna de cualquier órgano o tejido interno, p. ej., tejido gastrointestinal, tejido pulmonar (p. ej., de pulmón o bronquial), tejido cardíaco, tejido conectivo (p. ej., tendón, ligamento y cartílago), tejido óseo, tejido neural (sistema nervioso central y periférico) y tejido vascular (vena y arteria). Las heridas internas de interés incluyen, sin limitación, contusiones, fracturas, fístulas, úlceras o daños en órganos internos (p. ej., daño en el intestino, bazo, hígado, pulmones o corazón). La herida puede estar causada por un trauma, incluyendo, p. ej., una fractura compuesta, una herida por arma de fuego o una abrasión por un accidente.

La composición seca de plaquetas (o rehidratada) puede administrarse a una herida inmediatamente después de que se produzca o en cualquier estadio de su proceso de cicatrización natural. Preferiblemente, la composición de plaquetas se administrará en la herida inmediatamente, o poco después, de detectarse, o formarse, la herida en el sujeto. La herida que se va a tratar con la composición de plaquetas puede tener una apariencia, tamaño, profundidad (es decir, estadio) y color variados y puede incluir, por ejemplo, la presencia de hematomas, seromas, exudado de la herida, tejido necrótico y escara.

La composición seca de plaquetas (o rehidratada) puede aplicarse tópicamente, es decir, directamente en la herida. Puede aplicarse en la herida por cualquier medio adecuado, tal como por espolvoreo o pulverización de las plaquetas en la herida, empaquetamiento de las plaquetas en la herida o por medios de un auxiliar quirúrgico como se discute más adelante. Las preparaciones en aerosol pulverizables pueden incluir la composición de plaquetas en combinación con un material vehicular inerte sólido o líquido y pueden envasarse en una botella comprimible o mezcladas con un propelente volátil presurizado, normalmente gaseoso, p. ej., un freón.

Las plaquetas secas pueden aplicarse en la herida mediante un auxiliar quirúrgico, tal como, por ejemplo, un apósito o vendaje de heridas, una sutura, un tejido o un dispositivo protésico. Dichos auxiliares pueden incluir, por ejemplo, un material de sustrato sólido fisiológicamente aceptable y plaquetas sobre o en (p. ej., aplicadas como un recubrimiento sobre o impregnadas en) el material de sustrato. Típicamente, dichos auxiliares quirúrgicos se proporcionan en una forma estéril envasada en un contenedor estéril. El material de sustrato del auxiliar quirúrgico puede estar recubierto con las plaquetas, p. ej., mediante el espolvoreo de las plaquetas secas en el material o impregnando el sustrato del auxiliar quirúrgico con, o aplicando en su superficie, una suspensión líquida de plaquetas frescas que contienen los inhibidores de la activación plaquetaria (y uno o más crioprotectores) y secando (p. ej., liofilizando) la mezcla de auxiliar quirúrgico/plaquetas de manera que las plaquetas se adhieren al sustrato del auxiliar quirúrgico. Alternativamente, las plaquetas secas pueden adherirse al sustrato del auxiliar quirúrgico con un material adhesivo adecuado o simplemente espolvorearse en el auxiliar quirúrgico antes de la aplicación del auxiliar quirúrgico al sujeto.

El auxiliar quirúrgico puede tener cualquier forma y tamaño y puede estar hecho de cualquier material sólido adecuado, hidrofóbico o hidrofílico, que sea fisiológicamente aceptable. Las suturas, por ejemplo, pueden ser monofilamento o trenzadas, pueden ser biodegradables y pueden estar hechas de materiales tales como, por ejemplo, seda de nilón, poliéster o algodón. Los dispositivos protésicos, por ejemplo, incluyen estructuras tejidas o tubulares extruidas, que tienen uso en la reparación de arterias, venas, conductos; tejidos útiles quirúrgicamente en la reparación de hernias y en el soporte de hígado, riñón u otros órganos internos dañados; pines, tornillos y placas de refuerzo; válvulas cardíacas, tendones artificiales o material de cartílago. Los vendajes pueden estar hechos de cualquier material de sustrato adecuado, tal como algodón u otro tejido adecuado para la aplicación a o sobre una herida, pueden incluir opcionalmente un material de refuerzo y pueden incluir opcionalmente una o más regiones adhesivas en la superficie de cara de estos para asegurar el apósito sobre la herida.

Las composiciones de plaquetas de la invención se administran a sujetos en formulaciones farmacéuticamente aceptables que incluyen un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable, p. ej., disolución salina normal, excipiente o estabilizante, puede añadirse a las células antes de que se administren a un sujeto. La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que, a la concentración usada, no son perjudiciales para las células, son fisiológicamente tolerables y, típicamente, no producen una reacción alérgica o similar inapropiada, tal como malestar gástrico, mareo y semejantes, cuando se administran a un ser humano.

Las formulaciones adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, disoluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, pomadas, polvos, linimentos, salvias y aerosoles, que, si se desea, se esterilizan o mezclan con agentes auxiliares, p. ej., conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, agentes antisépticos, agentes antimicrobianos (p. ej., peróxido de hidrógeno, Betadine o ácido acético) o tampones o sales para influir en la presión osmótica. En la técnica se conoce una amplia diversidad de vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables [Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Edición, Osol, A. Ed. 1980]. Los vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables incluyen: tampones, tales como tampones fosfato, citrato y otros de ácidos orgánicos no tóxicos; antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de 10 restos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, Plurónicos o PEG.

La dosificación de la composición de plaquetas requerida depende de la naturaleza de la formulación, de la naturaleza de la herida o del tipo y gravedad de la herida que se va a tratar, del tamaño, peso, área superficial, edad y sexo del sujeto, de otros agentes terapéuticos que se están administrando y del criterio del médico responsable. Se pueden esperar amplias variaciones en la dosificación necesaria a la vista de las diferentes eficiencias de las distintas rutas de administración. Las composiciones de plaquetas pueden aplicarse en heridas de manera que aproximadamente 1 ml de la composición rehidratada se aplica para cada aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> de herida. Las variaciones en estos niveles de dosificación pueden ajustarse usando rutinas empíricas estándar para la optimización como se entiende en la técnica.

Las composiciones de plaquetas pueden administrarse a un sujeto una vez o múltiples veces. Así, las composiciones pueden administrarse una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 700, 1.000 o más veces. Cuando se realiza una pluralidad de administraciones, las administraciones pueden separarse por cualquier periodo de tiempo apropiado, p. ej., 30 segundos, un minuto, dos minutos, tres minutos, cuatro minutos, cinco minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, dos horas, tres horas, cuatro horas, cinco horas, ocho horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, dos días, tres días, cuatro días, una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, ocho meses, diez meses, un año, 18 meses, dos años, tres años, cuatro años, o cinco años.

Las plaquetas pueden obtenerse del individuo al que se va a administrar la composición de plaquetas (el receptor), es decir, las plaquetas pueden ser autólogas. Alternativamente, pueden ser de uno o más individuos de la misma especie que el receptor, p. ej., la composición de plaquetas puede estar compuesta por un combinado de muestras de plaquetas preparadas a partir de una pluralidad (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más) de sujetos, p. ej., voluntarios humanos. Un receptor también puede ser de una especie distinta del donante. Además, las plaquetas pueden aislarse de la sangre de un adulto, niño o de sangre fetal de uno o más individuos. Los receptores y donantes de las plaquetas pueden ser de cualquier otra especie listada anteriormente.

Tal y como se usa en la presente memoria, "terapéutico" o "terapia" significa una supresión completa de los síntomas de una afección patológica (p. ej., una herida) o una disminución en la gravedad de los síntomas de la afección patológica. "Prevención" significa que los síntomas de la afección patológica están esencialmente ausentes. Tal y como se usa en la presente memoria, "profilaxis" significa la prevención completa de los síntomas de una afección patológica, un retraso en el inicio de los síntomas de una afección patológica o una disminución de la gravedad de los síntomas de la afección patológica desarrollada posteriormente.

Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren, pero no limiten, la invención.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1 - Preparación de Composiciones de Plaquetas Usadas en los Ejemplos 1-6

#### *Recogida de plasma rico en plaquetas (PRP) humano*

Se adquirieron muestras de PRP en la forma de unidades de donante aleatorio (RDU) de plaquetas humanas en un banco de sangre acreditado por la American Association of Blood Banks (AABB), se almacenaron con agitación a temperatura ambiente y se usaron en los 5 días posteriores a la donación. Todo el cribado de donantes y ensayo de liberación se realizaron por el banco de sangre según los requerimientos de AABB [MEB Technical Manual 14ª ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks (2002)].

*Liofilización de PRP*

Una parte alícuota de PRP se mezcló con una disolución de aditivo crioconservante (CPA) que consistía en los inhibidores metabólicos amilorida, adenosina y nitroprusido de sodio y los crioprotectores polivinil pirrolidona (PVP), manitol y dimetilsulfóxido (DMSO). Todos estos compuestos se diluyeron en tampón isotónico (tampón B descrito en el Ejemplo 7). Se mezcló una parte alícuota separada de PRP control con tampón isotónico solo. La concentración final de las plaquetas en las muestras de PRP tratadas y control fue  $9 \times 10^5$  células/ $\mu$ l y las concentraciones finales de los inhibidores metabólicos y crioprotectores fueron como sigue: amilorida (0,25 mM), adenosina (0,1 mM), nitroprusido de sodio (50  $\mu$ M), polivinil pirrolidona (4 % p/v), manitol (50 mM) y dimetilsulfóxido (0,5 % v/v).

Ambas muestras de plaquetas se congelaron a unas velocidades de enfriamiento de entre 1 °C y 5 °C por minuto y después de liofilizaron en condiciones estándar. Después de la liofilización, las muestras de PRP se almacenaron durante menos de 5 días a -80 °C y después se rehidrataron por la rápida adición del volumen completo con tampón B hasta el volumen anterior a la liofilización.

Ejemplo 2 - Las Plaquetas Liofilizadas y Rehidratadas en Presencia de CPA Presentan una Agregación Plaquetaria Incrementada

Para determinar si las plaquetas liofilizadas y rehidratadas con CPA son capaces de mediar funciones importantes para la hemostasis, se estudió el potencial de agregación de las muestras liofilizadas y rehidratadas con y sin CPA en presencia de difosfato de adenosina (10  $\mu$ M) y colágeno equino tipo I (2  $\mu$ g/ml; Chrono-Log Corp, Havertown, PA). Para estos estudios, a diferencia de otros experimentos descritos más adelante, las tratadas con CPA y liofilizadas control se lavaron una vez con el tampón B. La concentración de plaquetas en ambas muestras se ajustó entonces a  $3 \times 10^5$  plaquetas/ $\mu$ l con el tampón B y ambas muestras se incubaron a 37 °C durante una hora después de lo cual se añadieron la adenosina y el colágeno a las concentraciones indicadas. La agregación se midió con un agregómetro óptico mientras se mantenía la temperatura de la muestra a 37 °C. Los datos se presentan como la respuesta de agregación de las plaquetas liofilizadas y rehidratadas expresado como un porcentaje de la respuesta de agregación de las plaquetas frescas (de la misma muestra de PRP usada para preparar las muestras liofilizadas).

Las plaquetas liofilizadas y rehidratadas en presencia de CPA mostraron un incremento en la capacidad de agregación respecto a las plaquetas liofilizadas control (FIG. 1).

Ejemplo 3 - Ensayo de Liberación de Factores de Crecimiento de Plaquetas

En una validación inicial de un ensayo para medir la liberación de factores de crecimiento de plaquetas activadas con trombina, se ensayaron suspensiones de plaquetas frescas (que no se habían congelado ni liofilizado y rehidratado). Las muestras de PRP de plaquetas frescas se diluyeron hasta una concentración de  $3 \times 10^5$  células/ $\mu$ l con el tampón B y se activaron con trombina (1 unidad/ml) durante 5 minutos a temperatura ambiente. El coágulo de plaquetas resultante se centrifugó y el sobrenadante se separó del coágulo sedimentado. Se midieron las concentraciones en el sobrenadante de cuatro factores de crecimiento por ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA) usando un kit disponible comercialmente (R & D Systems, Minneapolis, MN) según las directrices del fabricante. Los factores de crecimiento fueron factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF A/B), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

Los datos se presentan como las cantidades de factor de crecimiento liberadas en el sobrenadante activado con trombina expresadas como porcentajes de la cantidad de factor de crecimiento liberado por sonicación de una muestra correspondiente de las mismas plaquetas (Tabla 1). El experimento se realizó tres veces usando PRP de un donante separado para cada experimento. Los datos son las medias obtenidas de los tres experimentos y se indican las desviaciones estándar. Estas medias son las medias de los promedios de tres réplicas en cada grupo experimental.

Como se muestra en la Tabla 1, para los cuatro factores de crecimiento, aproximadamente el 50 % del factor de crecimiento liberable por sonicación se liberó de las plaquetas frescas por la activación con trombina.

Tabla 1. Liberación de Factores de Crecimiento de Plaquetas Humanas Frescas

<u>Factor de Crecimiento</u>	<u>Liberación</u>
TGF- $\beta$	60,4% $\pm$ 18,8%
PDGF	55,7% $\pm$ 16,0%
EGF	50,8% $\pm$ 19,0%
VEGF	47,0% $\pm$ 7,8%

Ejemplo 4 - Liberación de Factores de Crecimiento de Plaquetas Liofilizadas y Rehidratadas que Contienen CPA

Se determinó el efecto de la liofilización y rehidratación de las plaquetas en presencia y ausencia de CPA sobre la liberación del factor de crecimiento de plaquetas. Los datos obtenidos para TGF-β como un factor de crecimiento representativo se muestran en la Tabla 2. Se realizaron ensayos ELISA (como en el Ejemplo 3) en las siguientes muestras:

(a) un sobrenadante obtenido por centrifugación de la muestra de PRP usada para la liofilización ("Fresco" "Plasma").

(b) la misma muestra de PRP después de sonicación ("Fresco" "Sonicado"); esta medición proporcionó el TGF-β total liberable de las plaquetas en la muestra de PRP más el TGF-β en el plasma de la muestra de PRP.

(c) sobrenadantes obtenidos por centrifugación de muestras de PRP liofilizado y rehidratado (en presencia y ausencia de CPA) ("F/D/R" "Plasma").

(d) muestras de PRP liofilizadas y rehidratadas (en presencia y ausencia de CPA) después de sonicación ("F/D/R" "Sonicado").

(e) sobrenadantes obtenidos por centrifugación de PRP tratado con trombina (como en el Ejemplo 3), liofilizado y rehidratado (en presencia y ausencia de CPA); las cantidades detectadas en estos sobrenadantes menos las cantidades detectadas en (c) se expresaron como una fracción (porcentaje) de las cantidades detectadas en (d) menos las cantidades detectadas en (c) ("Liberación").

Los componentes de CPA no se eliminaron por lavado de las muestras antes del ensayo. El experimento se realizó tres veces usando PRP de un donante separado para cada experimento. Los datos son las medias obtenidas de los tres experimentos y se indican las desviaciones estándar. Estas medias son las medias de los promedios de tres réplicas en cada grupo experimental.

Tabla 2. Liberación de TGF-β por Plaquetas Liofilizadas y Rehidratadas (con o sin CPA)

<u>Condición</u>	<u>TGF-β (ng/ml) PRP</u>	
Plasma Fresco	18,1 ± 0,7	
Sonicado	65,3 ± 11,2	
	<u>PRP sin CPA</u>	<u>PRP con CPA</u>
Plasma	33,6 ± 5,5	28,2 ± 2,3
F/D/R		
Sonicado	57,5 ± 12,0	57,1 ± 9,1
Liberación	16,9%	40,4%

F/D/R; liofilizado y rehidratado

La liofilización y/o rehidratación de plaquetas tanto tratadas con CPA como no tratadas dio como resultado un nivel significativo de escape espontáneo de TGF-β comparado con suspensiones de plaquetas frescas (Tabla 2). Sin embargo, este escape espontáneo fue de alguna manera menor en las plaquetas liofilizadas en presencia de CPA respecto a ausencia de CPA. Lo más importante, las plaquetas que se habían liofilizado y rehidratado en presencia de CPA tienen una capacidad sustancialmente mayor para liberar TGF-β que las plaquetas liofilizadas y rehidratadas sin CPA. Se observaron resultados similares para los otros tres factores de crecimiento listados anteriormente.

Ejemplo 5 - El TGF- $\beta$  Producido por las Plaquetas Liofilizadas y Rehidratadas en Presencia de CPA es Activo

Se compararon los niveles de TGF- $\beta$  activo, según se miden por un ensayo celular (véase más adelante) y los niveles de proteína TGF- $\beta$  total, según se miden por ELISA, en los sobrenadantes de PRP sonicados frescos y PRP sonicados liofilizados y rehidratados (F/D/R) con CPA (Tabla 3). Estos sobrenadantes fueron los mismos que algunos de los mostrados en la Tabla 2. El ensayo de cultivo celular usado para medir la actividad de TGF- $\beta$  fue el descrito en Abe et al. [(1994) Anal. Biochem. 216 (2):276-284]. El experimento se realizó tres veces usando PRP de un donante separado para cada experimento. Los datos son las medias obtenidas de los tres experimentos y se indican las desviaciones estándar. Estas medias son las medias de los promedios de tres réplicas en cada experimento.

Esencialmente todo el TGF- $\beta$  liberado de plaquetas sonicadas frescas y plaquetas sonicadas liofilizadas y rehidratadas con CPA fue activo (Tabla 3). Se obtuvieron los mismos resultados con plaquetas sonicadas liofilizadas y rehidratadas sin CPA.

Tabla 3. Mediciones de la Actividad de TGF- $\beta$  en Plaquetas Humanas

Condición	Proteína TGF- $\beta$ total (ng/ml)	Actividad de TGF- $\beta$ (ng/ml)	Porcentaje de proteína TGF- $\beta$ que es activo
Sonicado Fresco	65,3 $\pm$ 11,2	57,1 $\pm$ 2,9	87,4 %
Sonicado F/D/R (CPA)	57,1 $\pm$ 9,1	57,9 $\pm$ 3,0	100 %

Ejemplo 6 - Ensayo de Proliferación CelularDiseño y Validación del Ensayo

Para ensayar la actividad inductora de la proliferación celular en los factores solubles liberados por plaquetas activadas con trombina, se usó un sistema de cultivo celular "Transwell®" *in vitro*. La FIG.2A es una representación en diagrama de este sistema de cultivo celular "Transwell®". Se sembraron en placas células fibroblastos 3T3 de ratón Swiss Albino a una densidad de 10.000 células por pocillo en las superficies inferiores de pocillos de cultivo de placas de cultivo tisular de 24 pocillos en Medio de Crecimiento (GM; Medio de Eagle Modificado por Dulbecco suplementado con glutamina 4 mM, 405 g/L de glucosa, 1,5 g/L de bicarbonato de sodio y 10 % de suero de ternera (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se cultivó durante 16 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% CO<sub>2</sub>. En los cultivos en los que se añadieron plaquetas activadas o sonicadas (y los cultivos control correspondientes) (véase más adelante), el GM se reemplazó con medio con suero reducido (SRM; el mismo que GM, pero suplementado con 0,5 % en lugar de 10 % de suero de ternera). Las plaquetas sonicadas o activadas con trombina (1 unidad/ml durante 5 minutos a 37 °C) (en 75  $\mu$ l de 1,2 x 10<sup>6</sup> plaquetas por  $\mu$ l) y SRM (225  $\mu$ l de 1,2 x 10<sup>6</sup> plaquetas por  $\mu$ l) se añadieron a cámaras Transwell® que tenían fondos que consistían en membranas semipermeables (que tenían poros de 8  $\mu$ m) y las cámaras se pusieron por encima de las células en pocillos de cultivo apropiados de manera que los fondos de las cámaras se sumergieron en medio de cultivo en los pocillos de cultivo (véase la FIG. 2A). Este sistema de cultivo permitió que el medio de cultivo y los factores solubles (pero no las plaquetas completas o el material plaquetario insoluble) difundieran a través de las membranas semipermeables y se pusieron en contacto con los fibroblastos en el fondo de los pocillos de cultivo. Los cultivos de "control positivo" contenían GM, pero no material plaquetario. Los cultivos se incubaron durante los periodos de tiempo indicados después de lo cual se determinó la proliferación por un ensayo de conversión metabólica de MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna]. Esto implicó: (a) la retirada de las cámaras Transwell® y el medio de cultivo de los pocillos de cultivo; (b) la adición a los pocillos de 0,5 ml de SRM fresco y 100  $\mu$ l de disolución CellTiter96® Aqueous One (Promega Corporation, Madison, WI); y (c) una incubación adicional (en las mismas condiciones que las descritas anteriormente) durante 3 horas. Los sobrenadantes (100  $\mu$ l) de cada cultivo se transfirieron a los pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos y se midió la DO<sub>540</sub> (como una medida de la proliferación celular relativa) de cada uno usando un lector de placas de microtitulación (BioRad, Hercules, CA).

Las mediciones de la proliferación celular se registraron en pocillos de cultivo separados cada 24 horas, durante un total de 72 horas después de la introducción de las cámaras Transwell® que contenían los materiales plaquetarios de ensayo en los pocillos del recipiente de cultivo, (FIG. 2B). En la FIG. 2B, las barras verticales del gráfico representan el porcentaje de incremento en los niveles de MTS sobre los niveles de la línea base (según se mide en el tiempo 0, es decir, el tiempo en el que las cámaras Transwell® que contienen materiales plaquetarios se añadieron a los cultivos) (eje de las y izquierdo) y las líneas del gráfico representan los recuentos celulares reales (eje de las x derecho). La línea punteada horizontal indica el número de células (eje de las y derecho) en el tiempo 0. Las plaquetas sonicadas y las plaquetas activadas con 1 unidad/ml de trombina incrementaron la proliferación de los fibroblastos de una forma dependiente del tiempo (comparado con los cultivos que solo contienen SRM).

Los niveles de proliferación celular obtenidos a las 72 horas con plaquetas sonicadas y activadas con trombina menos el nivel mínimo de proliferación celular (observado en cultivos que solo contienen SRM) se expresaron como

porcentajes del nivel máximo de proliferación celular (observado en cultivos que solo contienen GM) menos el nivel mínimo de proliferación celular (observado en cultivos que solo contienen SRM). Los valores obtenidos se refieren como "% de inducción" (FIG. 2C).

#### 5 *Los Factores Solubles Producidos por Plaquetas Liofilizadas y Rehidratadas en Presencia de CPA Retienen la Capacidad de Inducir Proliferación Celular*

El ensayo de proliferación celular *in vitro* descrito anteriormente se usó para determinar el efecto de la liofilización y la rehidratación en presencia de CPA sobre la capacidad de las plaquetas de inducir proliferación celular. Las plaquetas se mezclaron con disolución de CPA, se liofilizaron y se resuspendieron en tampón B como se describe en el Ejemplo 1. Se realizaron los mismos controles que los descritos para el experimento mostrado en la FIG. 2 y los datos se calcularon como se describe para la FIG. 2C. Las preparaciones de plaquetas que se habían liofilizado y rehidratado con CPA presentaron aproximadamente el mismo % de inducción de la proliferación que las plaquetas frescas después de la activación con trombina (FIG. 3).

Los sobrenadantes de plaquetas frescas centrifugadas PRP, plaquetas liofilizadas y rehidratadas en ausencia de CPA y plaquetas liofilizadas y rehidratadas en presencia de CPA (datos de "Plasma" en la FIG. 4) y los sobrenadantes de las mismas tres muestras después de la activación con trombina se ensayaron en un ensayo que es esencialmente el mismo que el del experimento representado en la FIG. 2 (datos de "Plaquetas" en la FIG. 4). Las plaquetas liofilizadas y rehidratadas con CPA, pero no las liofilizadas y rehidratadas sin CPA, retuvieron la capacidad de las plaquetas frescas de inducir proliferación celular (FIG. 4). La línea punteada en la FIG. 4 muestra la capacidad promedio de muestras de plasma de inducir proliferación de fibroblastos.

Además, una muestra de PRP liofilizada en presencia de CPA se dividió en varias partes alícuotas que se almacenaron a -80 °C durante varios periodos de tiempo hasta 24 semanas. Las muestras se rehidrataron en los puntos de tiempo relevantes y se ensayaron para determinar su capacidad de inducir proliferación de fibroblastos en el sistema de cultivo Transwell® descrito anteriormente. Todas las muestras demostraron la misma capacidad para inducir proliferación de fibroblastos que una muestra control que se ensayó sin almacenamiento.

#### 30 *La Capacidad de las Plaquetas Liofilizadas para Inducir Proliferación Celular es Dependiente de la Dosis*

Las plaquetas se liofilizaron y rehidrataron en presencia de CPA y se activaron con trombina como se ha descrito anteriormente. Se ensayaron varios volúmenes de la muestra (a la misma concentración de plaquetas) en el sistema de ensayo de proliferación de fibroblastos Transwell® descrito anteriormente por la adición de las muestras de plaquetas rehidratadas a las cámaras Transwell® (FIG. 5). Las mediciones se hicieron después de 72 horas de cultivo en presencia de las plaquetas activadas. La capacidad de las plaquetas activadas con trombina liofilizadas para inducir proliferación de células fibroblastos fue dependiente de la dosis de la cantidad de plaquetas rehidratadas añadidas al sistema de ensayo.

#### 40 Ejemplo 7 - Las Plaquetas Liofilizadas Tratadas con CPA Incrementan la Cicatrización de Heridas en un Modelo de Herida en Ratón Diabético

##### Materiales y métodos

#### 45 *Preparación de Terapéuticos Plaquetarios*

Se adquirieron unidades de donante único (SDU) de plaquetas humanas en un banco de sangre acreditado por la American Association of Blood Banks (AABB), se almacenaron con agitación a temperatura ambiente y se usaron en los 5 días posteriores a la donación. Todo el cribado de donantes y ensayo de liberación requeridos se realizaron por el banco de sangre según los requerimientos de AABB [MEB Technical Manual 14<sup>a</sup> ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks (2002)]. Cada SDU se dividió en tres partes alícuotas para preparar tres materiales terapéuticos basados en plaquetas únicos. La primera parte alícuota se ajustó a  $1,2 \times 10^6$  plaquetas/ $\mu$ l con una disolución que contenía CPA usando como un disolvente un tampón fisiológico [tampón B; NaCl 136 mM, NaHCO<sub>3</sub> 11,9 mM, glucosa 5,6 mM, HEPES 5 mM, KCl 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,42 mM; pH 7,4] y se liofilizó, creando de esta manera un plasma rico en plaquetas liofilizado conservado de forma estable con CPA (FDP-CPA). La segunda parte alícuota se ajustó a  $1,2 \times 10^6$  plaquetas/ $\mu$ l usando el Tampón B y se liofilizó para crear una muestra de un plasma rico en plaquetas liofilizado (FDP). La tercera parte alícuota se ajustó a  $1,2 \times 10^6$  plaquetas/ $\mu$ l usando el tampón B, se sonicó durante 10 segundos para romper la estructura celular y liberar los constituyentes intracelulares y se congeló a -80 °C creando una muestra de plaquetas frescas congeladas (FFP). La adición de la disolución de protector CPA rindió una composición de tratamiento final de amilorida 250  $\mu$ M, adenosina 100  $\mu$ M, nitroprusido de sodio 50  $\mu$ M, 1 % (v/v) de dimetil sulfóxido, 4 % (w/v) de polivinil pirrolidona (Plasdone™ C-15, International Specialty Products, Wayne, NJ) y manitol 50 mM. Todas las manipulaciones del material plaquetario se hicieron usando técnicas asépticas estándar y todas las disoluciones se esterilizaron por filtración usando filtros que tenían poros con un diámetro de 0,2  $\mu$ m (Millipore, Billerica, MA). Las concentraciones de plaquetas se verificaron usando un analizador hematológico CellDYN® 1700 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Los productos de plaquetas

secados se envasaron bajo nitrógeno seco en sobres de aluminio termosellados y se almacenaron a -80 °C hasta que se usaron.

#### *Modelo de Herida y Procedimiento de Tratamiento*

5 Se usaron ratones machos Lep/r - db/db homocigotos genéticamente diabéticos de 8-12 semanas de edad (cepa C57BL/KsJ-*Lep<sup>db</sup>*) bajo un protocolo animal aprobado en una instalación acreditada AAALAC. El día anterior a la cirugía, el pelo se recortó y se depiló (Nair®; Church & Dwight Co., Princeton, NJ). En el día de la cirugía (día post operatorio 0; POD 0), los animales se pesaron y se anestesiaron con 60 mg/kg de Nembutal® (pentobarbital de sodio). Se escindió un área dorsal de 1,0 cm<sup>2</sup> de la piel y el panículo carnoso y las heridas se fotografiaron. Simultáneamente, se prepararon los siguientes tratamientos basados en plaquetas: las muestras de FFP se descongelaron, mientras las muestras liofilizadas, FDP y FDP-CPA, se rehidrataron con dH<sub>2</sub>O estéril hasta su volumen original. Los tres diferentes tratamientos con plaquetas, con concentraciones equivalentes de plaquetas, basados en determinaciones anteriores al procesamiento, se dividieron en partes alícuotas de 250 µl. Cada parte alícuota se trató con 1 U/ml de trombina (Chronolog Corporation, Havertown, PA) justo antes de la aplicación y se dejó que se coagulara *in situ*, facilitando de esta manera la persistencia del material plaquetario en la herida. Se incluyeron quince heridas en cada grupo experimental de plaquetas (NT (no tratado), FFP, FDP y FDP-CPA). Todas las heridas se cubrieron con un apósito de poliuretano semioclusivo (Tegaderm™, 3M, St. Paul, MN). En el día post operatorio 9 (POD 9), los animales se sacrificaron por eutanasia y las heridas se fotografiaron, se escindieron y se fijaron en disolución al 10 % de formalina tamponada neutra.

#### *Análisis del Cierre de las Heridas*

25 Las fotografías digitales capturadas en POD 9 se compararon con las fotografías iniciales (POD 0) por dos observadores independientes, que permanecieron ciegos respecto al modo de tratamiento, usando métodos planimétricos (Scion Image, Scion Corporation, Frederick, MD). El cierre de las heridas se cuantificó midiendo la contracción, reepitelización y apertura de las heridas como un porcentaje del área original de la herida. La suma de las áreas de las heridas contraídas, reepitelizadas y abiertas es igual al 100% del tamaño original de las heridas [Sullivan et al. (2004) *Plast. Reconstr. Surg.* 113(3):953].

#### *Análisis Microscópico*

35 Las biopsias de las heridas se bisecaron, procesaron y tiñeron según los protocolos rutinarios de Hematoxilina y Eosina (H&E). Se hicieron fotografías digitales de las secciones microscópicas de las heridas con un aumento de 40x y se crearon materiales compuestos transversales panorámicos de cada herida usando Software Adobe Photoshop® CS (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA). Las imágenes digitales se analizaron con software Scion Image™ (Scion Corporation, Frederick, MD) por dos observadores independientes, que permanecieron ciegos respecto al modo de tratamiento, para cuantificar el área y espesor del tejido de granulación. La densidad capilar se evaluó usando 3 campos por portaobjetos observados con un aumento de 200x: uno en el medio de la lesión y uno en cada margen de la herida. Las imágenes se observaron con Software Adobe Photoshop® CS y los vasos sanguíneos en cada campo de alta potencia se marcaron y contaron.

#### *Análisis Estadístico*

45 Los valores se expresaron como medias +/- desviación estándar en el texto y las figuras. Se usaron un análisis de varianza de una vía y ensayos ad hoc de Dunnetts para determinar la significancia de las diferencias entre los modos de tratamiento.

### Resultados

#### *Cierre de las Heridas*

55 La cicatrización de las heridas ocurrió en todos los grupos por una combinación de contracción y reepitelización de las heridas. El trabajo previo mostró que una herida de 1,0 cm<sup>2</sup> en un ratón diabético alcanza el 50 % de punto de cierre en aproximadamente 8-12 días después de la cirugía y que, una vez cicatrizada, no hay diferencias ni en la histología ni en la apariencia visual de las heridas en ratones diabéticos y no diabéticos control (datos no mostrados). La FIG. 6 muestra que la reepitelización fue similar en todos los grupos de tratamiento, pero hubo una contracción de las heridas significativamente reducida en el grupo FDP-CPA comparado con los otros grupos.

#### *Tejido de Granulación*

65 Las imágenes digitales transversales panorámicas de cada herida se prepararon para analizar el área y espesor del tejido de granulación (FIG. 7). Tanto FDP-CPA como FDP indujeron un incremento significativo ( $p < 0,01$ ) de 2,3 veces en el área del tejido de granulación comparado con el grupo NT (FIG. 7). El tratamiento con FFP también estimuló la formación de tejido de granulación cuando se compara con las heridas no tratadas ( $p < 0,05$ ), pero fue visiblemente más edematoso que cualquiera de las condiciones liofilizadas. Se observaron resultados similares

5 respecto al espesor del tejido de granulación (FIG. 7). Los tratamientos con FDP-CPA y FDP indujeron incrementos significativos ( $p<0,01$ ) de 3,1 y 3,2 veces en el espesor del tejido de granulación medido en el centro de la herida, respectivamente, comparado con el grupo NT. El espesor del tejido en respuesta al tratamiento con FFP también se elevó significativamente sobre NT ( $p<0,01$ ) pero no consiguió resultados comparables a las condiciones del tratamiento con liofilizado.

*Neovascularidad*

10 Una vascularidad tisular incrementada en respuesta al tratamiento con material plaquetario fue evidente midiendo secciones de heridas teñidas con H&E estándar. El tratamiento con FDP-CPA dio como resultado incrementos significativos ( $p<0,01$ ) de 2,2 y 1,8 veces en el recuento de vasos medio por campo de alta potencia comparado con el grupo NT y el grupo FFP, respectivamente. El tratamiento con FDP indujo un incremento de 1,6 veces comparado con el grupo NT ( $p<0,01$ ).

15

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición seca de plaquetas para uso en el tratamiento de una herida, en la que el tratamiento de la herida comprende la aplicación tópica de la composición seca de plaquetas *per se* en la herida, comprendiendo la composición:
- 10 una pluralidad de plaquetas secas;  
 uno o más agentes crioprotectores; e  
 inhibidores de la activación plaquetaria que comprenden al menos un efector del sistema del segundo mensajero monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), al menos un inhibidor del canal de sodio y al menos un efector del sistema del segundo mensajero 5' monofosfato de guanosina cíclico (GMPc).
- 15 2. La composición de la reivindicación 1 para uso en el tratamiento según la reivindicación 1, en la que los inhibidores de la activación plaquetaria comprenden adenosina, amilorida y nitroprúsido de sodio.
- 20 3. La composición de la reivindicación 1 para uso en el tratamiento según la reivindicación 1, en la que el efector del sistema del segundo mensajero AMPc se selecciona del grupo que consiste en iloprost, prostaciclina, prostaglandina E<sub>2</sub>, forskolina, toxina del cólera, isoproterenol, 8-bromo monofosfato de adenosina cíclico, dibutil monofosfato de adenosina cíclico, teofilina, isobutilmetil xantina, tirotopina y auranofina.
- 25 4. La composición de la reivindicación 1 para uso en el tratamiento según la reivindicación 1, en la que el inhibidor del canal de sodio se selecciona del grupo que consiste en análogos de amilorida, bepridil, flecainida, saxitoxina, benzamil y prajmalio.
- 30 5. La composición de la reivindicación 1 para uso en el tratamiento según la reivindicación 1, en la que el efector del sistema del segundo mensajero GMPc se selecciona del grupo que consiste en L-arginina, óxido nitroso, SIN-1, SIN-1A, factor natriurético atrial, vasopresina, oxitocina y trinitrato de glicerilo.
- 35 6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para uso en el tratamiento según la reivindicación 1, en la que el agente crioprotector se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido, maltodextrina, dextrano, hidroxietil almidón, glucosa, polivinil pirrolidona, manitol y combinaciones de estos.
- 40 7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para uso en el tratamiento según la reivindicación 1, que comprende además plasma sanguíneo seco.
- 45 8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para uso en el tratamiento según la reivindicación 1, que comprende además uno o más componentes de la matriz extracelular (ECM).
- 50 9. La composición de la reivindicación 8 para uso en el tratamiento según la reivindicación 1, en la que el uno o más componentes de la ECM se seleccionan del grupo que consiste en colágeno, elastina, fibronectina, fibrilina, laminina, decorina, fibromodulina, ácido hialurónico y un proteoglicano.
- 55 10. La composición de la reivindicación 8 o 9 para uso en el tratamiento según la reivindicación 1, en la que los componentes de la ECM están en partículas de matriz tisular acelular particulada.
- 60 11. La composición de la reivindicación 10 para uso en el tratamiento según la reivindicación 1, en la que la matriz tisular acelular particulada es matriz dérmica acelular particulada.
- 65 12. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para uso en el tratamiento según la reivindicación 1, en la que las plaquetas son plaquetas humanas.
13. Un método para preparar una composición liofilizada de plaquetas para uso en el tratamiento de una herida, en el que el tratamiento de la herida comprende la aplicación tópica de la composición seca *per se* en la herida, comprendiendo el método:
- proporcionar una muestra que comprende plaquetas;  
 preparar una mezcla que comprende las plaquetas, uno o más agentes crioprotectores e inhibidores de la activación plaquetaria que comprenden al menos un efector del sistema del segundo mensajero AMPc, al menos un inhibidor del canal de sodio y al menos un efector del sistema del segundo mensajero GMPc; y  
 secar la mezcla.
14. El método de la reivindicación 13, en el que los inhibidores de la activación plaquetaria comprenden adenosina, amilorida y nitroprúsido de sodio.

15. El método de la reivindicación 14 en el que, en la mezcla, la concentración de adenosina es aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 1 mM, la concentración de amilorida es aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM y la concentración de nitroprusido de sodio es aproximadamente 2,5  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 250  $\mu\text{M}$ .
- 5 16. El método de la reivindicación 13, en el que el efector del sistema del segundo mensajero AMPc se selecciona del grupo que consiste en iloprost, prostaciclina, prostaglandina E<sub>2</sub>, forskolina, toxina del cólera, isoproterenol, 8-bromo monofosfato de adenosina cíclico, dibutil monofosfato de adenosina cíclico, teofilina, isobutilmetil xantina, tirotrópina y auranofina.
- 10 17. El método de la reivindicación 13, en el que el inhibidor del canal de sodio se selecciona del grupo que consiste en análogos de amilorida, bepridil, flecainida, saxitoxina, benzamil y prajmalio.
- 15 18. El método de la reivindicación 13, en el que el efector del sistema del segundo mensajero GMPc se selecciona del grupo que consiste en L-arginina, óxido nítrico, SIN-1, SIN-1A, factor natriurético atrial, vasopresina, oxitocina y trinitrato de glicerilo.
- 20 19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13-18, en el que el uno o más crioprotectores se seleccionan del grupo que consiste en dimetil sulfóxido, maltodextrina, dextrano, hidroxietil almidón, glucosa, polivinil pirrolidona, manitol y combinaciones de estos.
- 25 20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13-19, en el que la mezcla comprende además uno o más componentes de la matriz extracelular (ECM).
- 30 21. El método de la reivindicación 20, en el que el uno o más componentes de la ECM se seleccionan del grupo que consiste en colágeno, elastina, fibronectina, fibrilina, laminina, decorina, fibromodulina, ácido hialurónico y un proteoglicano.
- 35 22. El método de la reivindicación 20 o 21, en el que los componentes de la ECM están en partículas de matriz tisular acelular particulada.
- 40 23. El método de la reivindicación 22, en el que la matriz tisular acelular particulada es matriz dérmica acelular particulada.
- 45 24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13-23, en el que la mezcla comprende además plasma sanguíneo.
- 50 25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13-24, en el que el secado de la mezcla comprende liofilizar la mezcla.
26. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para uso en el tratamiento según la reivindicación 1, en el que la herida es una herida cutánea.
27. La composición de la reivindicación 26 para uso en el tratamiento según la reivindicación 1, en el que la herida cutánea se selecciona del grupo que consiste en una úlcera por presión, una úlcera por estasis venosa, una úlcera diabética, una úlcera arterial, una herida por lesión, una herida por quemadura, una herida en el tejido blando compleja, un injerto o colgajo de piel fallido, una herida inducida por radiación y una herida gangrenosa.
28. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para uso en el tratamiento según la reivindicación 1, en el que la herida es una herida interna.
29. La composición de la reivindicación 28 para uso en el tratamiento según la reivindicación 1, en el que la herida interna se selecciona del grupo que consiste en una contusión, una fractura, una fístula, una úlcera y una herida por lesión de un órgano interno.