(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 933 617**

(51) Int. CI.:

C07D 215/50 (2006.01)
C07D 239/48 (2006.01)
C07D 241/42 (2006.01)
C07D 403/12 (2006.01)
A01N 1/02 (2006.01)
C07D 241/40 (2006.01)
C07D 209/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2015 PCT/US2015/066252**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2016 WO16204809**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2015 E 15895847 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2022 EP 3310761**

(54) Título: **Métodos de almacenamiento de plaquetas y composiciones para los mismos**

(30) Prioridad:

18.06.2015 US 201514743213

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.02.2023

(73) Titular/es:

PLATEFUSE, INC. (100.0%)
8589 Weller Road
Cincinnati, OH 45249, US

(72) Inventor/es:

ZHENG, YI y
CANCELAS, JOSE

(74) Agente/Representante:

SUGRAÑES, S.L.P.

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

Métodos de almacenamiento de plaquetas y composiciones para los mismos

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la solicitud de patente de EE.UU. con N.º de Serie 14/743.213, presentada el 18 de junio de 2015, del mismo título, en su totalidad para todos los fines.

ANTECEDENTES

Los pacientes con recuentos bajos de plaquetas a menudo requieren una transfusión de plaquetas. Esto es particularmente crucial en el tratamiento de pacientes con cáncer o trauma masivo. El uso de transfusiones de plaquetas ha aumentado drásticamente desde la década de 1980, pero un método de almacenamiento de plaquetas seguro a largo plazo sigue sin estar disponible. La demostración de almacenamiento refrigerado exitoso de plaquetas durante períodos prolongados de tiempo, por ejemplo, 7 días o más, cambiaría drásticamente la práctica actual de transfusión de plaquetas en el mundo occidental. Aproximadamente 3.000.000 de dosis de plaquetas se usan en los Estados Unidos cada año y representan ventas de ~ $ 1,5 mil millones anuales. La vida útil corta actual representa una desventaja importante para convertir los productos de plaquetas en productos eficaces. Dependiendo de la época del año, el mes o incluso la semana, hasta un 20 % de los productos pueden desperdiciarse debido a su caducidad. Mientras tanto, hay momentos de escasez de plaquetas debido al aumento impredecible del uso. La extensión de la vida útil de los productos de plaquetas fortalecería el inventario nacional de plaquetas para pacientes oncológicos y traumatológicos. El gobierno de EE.UU. espera un aumento estimado de 10 veces en la necesidad de productos de plasma y plaquetas en víctimas de guerra y pacientes con traumatismos masivos debido a la póliza de transfusión de producto 1 glóbulo rojo:1 plaqueta:1 plasma.

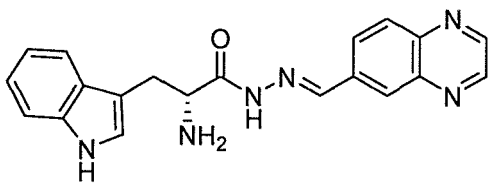
La práctica actual tiene plaquetas almacenadas de 20 a 24 °C después de la preparación, que tiene una vida útil limitada de hasta 5 días, principalmente debido a preocupaciones sobre la contaminación bacteriana. La contaminación bacteriana de los productos de plaquetas para transfusiones es un problema importante de seguridad en los bancos de sangre. La consecuencia de la transfusión de productos contaminados es el aumento de la morbimortalidad entre una población susceptible de pacientes con cáncer (1). Se han desarrollado diferentes tecnologías con el objetivo de minimizar el riesgo de contaminación bacteriana, incluyendo las bolsas de desviación para la recolección, la detección bacteriana con sistemas de cultivo automático y los sistemas de reducción de patógenos (2-6). Aunque ha habido una reducción significativa en el número de casos de sepsis asociada a la transfusión de plaquetas, el riesgo de sepsis asociada a transfusiones varía de 1 en 15.000 a 86.000 transfusiones de plaquetas (7, 8). El almacenamiento de plaquetas en temperaturas frías, como se hace con los glóbulos rojos, reduciría la proliferación de la mayoría de las bacterias y permitiría un período de almacenamiento más largo (9), minimizando la escasez actual (10) que el corto tiempo de almacenamiento (5 días) para las plaquetas aprobado por la FDA (11). El almacenamiento en frío convencional de plaquetas, sin embargo, se ha visto obstaculizado por el descubrimiento de que la recuperación de 24 horas de las plaquetas refrigeradas se redujo significativamente (14).

El desarrollo de un método para prevenir el daño de las plaquetas por refrigeración es muy necesario, y Jong buscaba un avance en los bancos de sangre. Un desarrollo tal revolucionaría el método actual de almacenamiento de plaquetas. La presente divulgación resuelve una o más de estas deficiencias en la técnica.

El documento US 4.994.367 desvela una composición para el almacenamiento de plaquetas sanguíneas que comprende un estimulador de adenilato ciclasa, un inhibidor de fosfodiesterasa, una trombina y una plasmina.

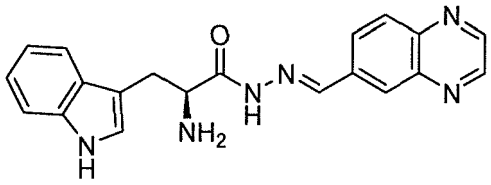
BREVE SUMARIO

Se desvelan composiciones y métodos para uno o más de ralentizar, prevenir o revertir el daño plaquetario, de acuerdo con las reivindicaciones, particularmente como puede producirse durante el almacenamiento de sangre o durante la refrigeración de plaquetas. La composición incluye un inhibidor de RHOA seleccionado de:



,

o sal del mismo,



,

o sal del mismo o combinaciones de los mismos. Las composiciones incluyen además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A-1B representan un modelo esquemático de eventos intracelulares iniciados por el "receptor de frío" que implican Rho GTPasas. 1A. El frío provoca los cambios de actomiosina, movilización de Ca2+, pérdida de anclaje de espectrina y agrupamiento de Gplb. 1B. El "receptor de frío" puede estimular la activación de Cdc42, Rac y/o Rho, que a su vez controlan el ensamblaje de la balsa lipídica y la reorganización de la actomiesina, dando como resultado el agrupamiento de Gplb.

La FIGURA 2 representa las estructuras químicas y las dianas del inhibidor de Rho GTPasas.

Las FIGURAS 3A-D representan un modelo de acoplamiento de Casina unida al surco superficial de Cdc42 y datos que demuestran la actividad de Casina. 3A. Se requiere un modelo de acoplamiento de Casina unida a un surco superficial de Cdc42 para la activación. 3B. La casina (10 μM) inhibe la activación de Cdc42 inducida por colágeno en un ensayo desplegable de GST-PAK. 3C. La estructura de filopodios de actina plaquetaria mediada por fibrinógeno se bloquea con Casina (10 μM). Tinción con faloidina conjugada con rodamina de plaquetas adheridas a la superficie de colágeno recubierta. 3D. La agregación inducida por colágeno se bloquea con Casina 10 μM (panel superior) y es reversible (Casina hasta 30 μM) tras un lavado de las plaquetas tratadas con inhibidor (panel inferior).

Las FIGURAS 4A-4E representan un modelo de acoplamiento del inhibidor de Rac NSC23766 y datos que muestran la actividad de NSC23766. 4A. Estructura de rayos X de NSC23766 unida a un surco superficial de Rac1 requerido para la activación de GEF. 4B. La actividad de Rac1 se inhibe por NSC23766 (50 μM) en un ensayo desplegable de GST-PAK. 4C. La estructura de lamelipodios de actina plaquetaria mediada por fibrinógeno se bloquea con NSC23766 (50 μM). Tinción con faloidina conjugada con rodamina de plaquetas adheridas a la superficie de colágeno recubierta. 4D. La agregación inducida por colágeno se bloquea por NSC23766 de forma dependiente de la dosis. 4E. La inhibición de la agregación de plaquetas inducida por colágeno por NSC23766 (50 μM) es reversible tras un lavado de las plaquetas tratadas con inhibidor.

Las FIGURAS 5A-5D representan un modelo de acoplamiento del inhibidor de Rho G04 y datos que muestran la actividad de G04. 5A. Se requiere un modelo de acoplamiento de G04 unida a un surco superficial de RhoA para la activación de GEF. Panel superior: baja resolución; Panel inferior: dominio de unión de alta resolución. 5B. Go4 (50 μM) inhibe la actividad de RhoA inducida por colágeno en un ensayo desplegable de GST-Rhotekin. 5C. La estructura de lamelipodios de actina plaquetaria mediada por U46629 (10 mM)/Fibrinógeno (3 μM) se bloquea con G04 (30 μM). Tinción con faloidina conjugada con rodamina de plaquetas adheridas a la superficie de colágeno recubierta. 5D. La agregación inducida por colágeno se inhibe por G04 (panel superior). Similar al colágeno, la agregación inducida por trombina (datos no mostrados) se bloquea con G04 de forma dependiente de la dosis (panel superior) y es reversible tras un lavado de las plaquetas tratadas con inhibidor (panel inferior).

Las FIGURAS 6A-6D representan los efectos del tratamiento con inhibidores de Rho GTPasa en la transfusión de plaquetas. 6 A. Diseños experimentales. 6B-6D. Recuperación de 24 horas y supervivencia de plaquetas en diferentes condiciones. 6B. Recuperación de 24 horas. 6C-6D. Recuperación de plaquetas en diferentes momentos. Las plaquetas del donante se almacenaron a temperatura ambiente (cuadrados) o se pretrataron con inhibidores mixtos de Rho GTPasa (NSC23766 50 μM, CASINA 10 μM y/o G04 75 μM) o sin fármaco (control). Los datos se representan como la media SD. *p<0,01 (Prueba Anova con corrección de Bonferroni, entre refrigerado sin inhibidor y refrigerado con combinación de triple inhibidor).

La FIGURA 7 representa los efectos de las combinaciones de inhibidores de Rho GTPasa sobre la supervivencia de las plaquetas tras la transfusión. Se muestra la recuperación de plaquetas en diferentes momentos. Las plaquetas del donante se almacenaron a temperatura ambiente (cuadrados) o se pretrataron con inhibidores mixtos de Rho GTPasa (NSC23766 50 uM, CASINA 10 uM y/o G04 75 uM) o sin fármaco (Ctrl). Los datos se representan como la media ±SD. *p<0,01 (Prueba Anova con corrección de Bonferroni, entre refrigerado sin inhibidor y refrigerado con combinación de triple inhibidor).

La FIGURA 8 representa el recuento total de micropartículas y micropartículas G plb+ de plaquetas almacenadas

en diferentes condiciones. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes con resultados similares de plaquetas almacenadas durante 6 días en NSC23766 50 µM, CASINA 10 µM y/o G04 75 µM o sin fármaco (control de vehículo). El panel izquierdo muestra micropartículas/mcl de plaquetas almacenadas refrigeradas durante 6 días; el panel derecho muestra recuentos de micropartículas Gplb+ de plaquetas almacenadas refrigeradas durante 6 días.

La FIGURA 9 representa la mejora de la formación de balsas lipídicas mediante combinaciones de inhibidores de Rho GTPasa. Las plaquetas se almacenaron a TA o 4 °C durante 3 o 7 días en diferentes combinaciones de inhibidores (NSC23766 50 µM, CASINA 10 µM y/o G04 75 µM) o sin fármaco (vehículo de control) a TA o 4 °C. Los lisados de plaquetas se analizaron en presencia (balsas lipídicas) o ausencia (lisado de células completas) de extracción mediada por Triton-X-100. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes con resultados similares. Los paneles inferiores representan la cuantificación normalizada de la formación de balsas lipídicas.

La FIGURA 10A-10C representa la recuperación (%) de plaquetas humanas transfundidas a ratones inmunodeficientes NSG trombocitopénicos pretratados (FIGURA 10A y 10B); La FIGURA C muestra la recuperación diferencial entre la prueba y el control en un estudio aleatorizado, cruzado de plaquetas refrigeradas tratadas en transfusión autóloga de plaquetas de macaco de la India almacenadas durante 7 días.

La FIGURA 11A-11B representa la eliminación de RhoA ($RhoA^{\Delta/\Delta}$) después de la administración de poli I:C en comparación con los niveles de expresión de RhoA pre-poli I:C en plaquetas. La FIGURA 11B representa la expresión de Flotillina-1 y actina en balsas lipídicas (panel superior) y en lisados de plaquetas completas (panel inferior).

Las FIGURAS 12A-12D representan el efecto de los inhibidores de la familia Rho sobre plaquetas murinas de tipo silvestre y deficientes en RhoA (12A); el efecto de los inhibidores de la familia Rho sobre plaquetas humanas (12B); y el efecto de los inhibidores de la familia Rho sobre las actividades de galactosil-(12C) y sialil-(12D) transferasa en las membranas plaquetarias.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona experta en la materia a la cual pertenecen las realizaciones.

DEFINICIONES

Cabe destacar que como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/una" y "el/la" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una plaqueta" incluye una pluralidad de dichas plaquetas y la referencia al "vehículo" incluye la referencia a uno o más vehículos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la materia y así sucesivamente.

Las expresiones "aproximadamente" o "de manera aproximada" significan dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular como se determina por un experto en la materia, que dependerá en parte de cómo se mida o se determine el valor, por ejemplo, las limitaciones del sistema de medida. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de 1 o más de 1 desviaciones típicas, según la practica en la técnica. Cuando se describen valores particulares en la solicitud y en las reivindicaciones, a menos que se indique lo contrario el término "aproximadamente" debe asumirse dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular.

Una "amida" es un resto químico con la fórmula -(R)n-C(O)NHR' o -(R)n-NHC(O)R', donde R y R' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo (unido a través de un anillo de carbono) y heteroalicíclico (unido a través de un anillo de carbono) y donde n es 0 o 1.

El término "aromático" se refiere a un grupo aromático que tiene al menos un anillo que tiene un sistema de electrones pi conjugado e incluye tanto grupos arilo carbocíclico (por ejemplo, fenilo) como arilo heterocíclico (por ejemplo, piridina). El término incluye grupos monocíclicos o policíclicos de anillo condensado (es decir, anillos que comparten pares de átomos de carbono adyacentes). El término "carbocíclico" se refiere a un compuesto que contiene una o más estructuras de anillos covalentemente cerrados y que los átomos que forman la estructura principal del anillo son todos átomos de carbono. El término distingue de este modo anillos carbocíclicos de heterocíclicos en los que la estructura principal del anillo contiene al menos un átomo que es distinto de carbono. El término "heteroaromático" se refiere a un grupo aromático que contiene al menos un anillo heterocíclico.

Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo alifático. El resto alquilo puede ser un grupo "alquilo saturado", lo que significa que no contiene restos de alqueno o alquino. El resto alquilo también puede ser un resto "alquilo insaturado", lo que significa que contiene al menos un resto alqueno o alquino. Un

resto "alqueno" se refiere a un grupo que consiste en al menos dos átomos de carbono y al menos un doble enlace carbono-carbono y un resto "alquino" se refiere a un grupo que consiste en al menos dos átomos de carbono y al menos un triple enlace carbono-carbono. El resto alquilo, ya sea saturado o insaturado, puede ser ramificado, de cadena recta o cíclico.

El grupo alquilo puede tener 1 a 20 átomos de carbono (siempre que aparezca en el presente documento, un intervalo numérico tal como "1 a 20" se refiere a cada número entero en el intervalo dado; por ejemplo, "de 1 a 20 átomos de carbono" significa que el grupo alquilo puede consistir en 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc., hasta e incluyendo 20 átomos de carbono, aunque la presente definición también cubre la aparición del término "alquilo" cuando no se designa ningún intervalo numérico). El grupo alquilo también puede ser un alquilo de tamaño medio que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. El grupo alquilo también podría ser un alquilo inferior que tenga de 1 a 5 átomos de carbono. El grupo alquilo de los compuestos de la invención puede designarse como "alquilo C1-C4" o designaciones similares. Solamente a modo de ejemplo, "alquilo C1-C4" indica que hay de uno a cuatro átomos de carbono en la cadena de alquilo, es decir, la cadena de alquilo se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo y t-butilo.

El grupo alquilo puede estar sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido, el grupo o grupos sustituyentes es o son uno o más grupo o grupos seleccionados individual e independientemente de cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroalicíclico, hidroxi, alcoxi, ariloxi, mercapto, alquiltio, ariltio, ciano, halo, carbonilo, tiocarbonilo, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, S-sulfonamido, N-sulfonamido, C-carboxi, O-carboxi, isocianato, tiocianato, isotiocianato, nitro, sililo, trihalometanosulfonilo y amino, incluyendo grupos amino mono y disustituidos y los derivados protegidos de los mismos. Los grupos alquilo típicos incluyen, pero sin limitación alguna, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, butilo terciario, pentilo, hexilo, etenilo, propenilo, butenilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares. Siempre que un sustituyente se describa estando "opcionalmente sustituido" ese sustituyente puede estar sustituido con uno de los sustituyentes anteriores.

El término "éster" se refiere a un resto químico con fórmula -(R)n-COOR', donde R y R' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo (unido a través de un anillo de carbono) y heteroalicíclico (unido a través de un anillo de carbono) y donde n es 0 o 1.

El sustituyente "R" que aparece solo y sin una designación numérica se refiere a un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo (unido a través de un anillo de carbono) y heteroalicíclico (unido a través de un anillo de carbono).

Un grupo "O-carboxi" se refiere a un grupo RC(=O)O-, en donde R es como se define en el presente documento.

Un grupo "C-carboxi" se refiere a grupos -C(=O)OR donde R es como se define en el presente documento.

Un grupo "acetilo" se refiere a un grupo -C(=O)CH3.

Un grupo "trihalometanosulfonilo" se refiere a un grupo X3CS(=O)2- donde X es un halógeno.

Un grupo "ciano" se refiere a un grupo -CN.

Un grupo "isocianato" se refiere a un grupo -NCO.

Un grupo "tiocianato" se refiere a un grupo -CNS.

Un grupo "isotiocianato" se refiere a un grupo -NCS.

Un grupo "sulfinilo" se refiere a un grupo -S(=O)R, con R como se define en el presente documento.

Un grupo "S-sulfonamido" se refiere a un grupo -S(=O)2NR, con R como se define en el presente documento.

Un grupo "N-sulfonamido" se refiere a un grupo RS(=O)2NH- con R como se define en el presente documento.

Un grupo "trihalometanosulfonamido" se refiere a un grupo X3CS(=O)2NR con X y R como se definen en el presente documento.

Un grupo "O-carbamilo" se refiere a un grupo -OC(=O)-N(R)2, con R como se define en el presente documento.

Un grupo "N-carbamilo" se refiere a un grupo ROC(=O)NH-, con R como se define en el presente documento.

Un grupo "O-carbamilo" se refiere a un grupo -OC(=O)-N(R)2, con R como se define en el presente documento.

Un grupo "N-tiocarbamilo" se refiere a un grupo ROC(=S)NH-, con R como se define en el presente documento.

Un grupo "C-amido" se refiere a un grupo -C(=O)-N(R)2 con R como se define en el presente documento.

Un grupo "N-amido" se refiere a un grupo RC(=O)NH-, con R como se define en el presente documento.

El término "perhaloalquilo" se refiere a un grupo alquilo donde todos los átomos de hidrógeno están reemplazados por átomos de halógeno.

El término "acilalquilo" se refiere a un grupo RC(=O)R'-, con R como se define en el presente documento y siendo R' un grupo alquileno dirradical. Los ejemplos de acilalquilo, sin limitación, pueden incluir CH3C(=O)CH2-, CH3C(=O)CH2CH2-, CH3CH2C(=O)CH2CH2-, CH3C(=O)CH2CH2CH2- y similares.

A menos que se indique lo contrario, cuando se considera que un sustituyente está "opcionalmente sustituido", se entiende que el sustituyente es un grupo que puede estar sustituido con uno o más grupos seleccionados individual e independientemente de cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroalicíclico, hidroxi, alcoxi, ariloxi, mercapto, alquiltio, ariltio, ciano, halo, carbonilo, tiocarbonilo, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, S-sulfonamido, N-sulfonamido, C-carboxi, O-carboxi, isocianato, tiocianato, isotiocianato, nitro, sililo, trihalometanosulfonilo y amino, incluyendo grupos amino mono y disustituidos y los derivados protegidos de los mismos.

Las expresiones "grupo protector" y "grupos protectores" como se usan en el presente documento se refieren a cualquier átomo o grupo de átomos que se añaden a una molécula para evitar que los grupos existentes en la molécula experimenten reacciones químicas no deseadas. El resto grupo protector puede elegirse de tal manera, que este sea estable a las condiciones de reacción aplicadas y se retire fácilmente en una fase conveniente usando metodología conocida en la técnica. Una lista no limitante de grupos protectores incluye bencilo; bencilo sustituido; alquilcarbonilos (por ejemplo, t-butoxicarbonilo (BOC)); arilalquilcarbonilos (por ejemplo, benciloxicarbonilo, benzoílo); éter metílico sustituido (por ejemplo, éter metoximetílico); éter etílico sustituido; un éter bencílico sustituido; éter tetrahidropiranílico; éteres de sililo (por ejemplo, trimetilsililo, trietilsililo, triisopropilsililo, t-butildimetilsililo o t-butildifenilsililo); ésteres (por ejemplo, éster de benzoato); carbonatos (por ejemplo, metoximetilcarbonato); sulfonatos (por ejemplo, tosilato o mesilato); cetal acíclico (por ejemplo, dimetil acetal); cetales cíclicos (por ejemplo, 1,3-dioxano o 1,3-dioxolanos); acetal acíclico; acetal cíclico; hemiacetal acíclico; hemiacetal cíclico; y ditiocetales cíclicos (por ejemplo, 1,3-ditiano o 1,3-ditiolano).

Como se usa en el presente documento, el término "cicloalquilo" pretende abarcar anillos de tres, cuatro, cinco, seis, siete y ocho o más miembros que comprenden únicamente átomos de carbono. Un cicloalquilo puede contener opcionalmente uno o más enlaces insaturados situados tal manera, sin embargo, que no surja un sistema aromático de electrones pi. Algunos ejemplos de "cicloalquilo" son los carbociclos ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclopenteno, ciclopentadieno, ciclohexano, ciclohexeno, 1,3-ciclohexadieno, 1,4-ciclohexadieno, cicloheptano o cicloheptenо.

Como se usa en el presente documento, "heterociclilo" significa un sistema de anillo cíclico que comprende al menos un heteroátomo en la estructura principal del sistema de anillo. Los heteroátomos se seleccionan independientemente de oxígeno, azufre y nitrógeno. Los heterociclilos pueden incluir múltiples anillos condensados. Los heterociclilos pueden tener cualquier grado de saturación con la condición de que al menos un anillo en el sistema de anillo no sea aromático. Los heterociclilos pueden estar sustituidos o no sustituidos y están unidos a otros grupos a través de cualquier valencia disponible, preferentemente cualquier carbono o nitrógeno disponible. Los heterociclos monocíclicos preferidos son de 5 o 6 miembros. En los heterociclos monocíclicos de seis miembros, el heteroátomo o heteroátomos se seleccionan de uno hasta tres de oxígeno, azufre y nitrógeno y en donde cuando el heterociclo es de cinco miembros, preferentemente tiene uno o dos heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno.

Un heterociclilo puede contener además una o más funcionalidades carbonilo o tiocarbonilo, de tal manera que haga que la definición incluya sistemas oxo y sistemas tio tales como lactamas, lactonas, imidas cíclicas, tioimidas cíclicas, carbamatos cíclicos y similares. Algunos ejemplos de "heterociclilos" incluyen, pero no se limitan a, tetrahidrotiopirano, 4H-pirano, tetrahidropirano, piperidina, 1,3-dioxina, 1,3-dioxano, 1,4-dioxina, 1,4-dioxano, piperazina, 1,3-oxatiano, 1,4-oxatiína, 1,4-oxatiano, tetrahidro-1,4-tiazina, 2H-1,2-oxazina, maleimida, succinimida, ácido barbitúrico, ácido tiobarbitúrico, dioxopiperazina, hidantoína, dihidrouracilo, morfolina, trioxano, hexahidro-1,3,5-triazina, tetrahidrotiofeno, tetrahidrofurano, pirrolina, pirrolidina, pirrolidona, pirrolidiona, pirazolina, pirazolidina, imidazolina, imidazolidina, 1,3-dioxol, 1,3-dioxolano, 1,3-ditiol, 1,3-ditiolano, isoxazolina, isoxazolidina, oxazolina, oxazolidina, oxazolidinona, tiazolina, tiazolidina y 1,3-oxatiolano. El punto de unión de un radical heterociclo puede estar en la posición de un heteroátomo de nitrógeno o a través de un átomo de carbono del heterociclo.

El término "arilo" significa un anillo o sistema de anillo aromático carbocíclico. Asimismo, el término "arilo" incluye sistemas de anillos condensados en los que al menos dos anillos de arilo, o al menos un arilo y al menos un cicloalquilo C3-8 comparten al menos un enlace químico. Algunos ejemplos de anillos "arilo" incluyen fenilo opcionalmente sustituido, naftalenilo, fenantrenilo, antracenilo, tetralinilo, fluorenilo, indenilo e indanilo. El término "arilo" se refiere a compuestos aromáticos, incluyendo, por ejemplo, grupos bencenoides, conectados a través de uno de los átomos de

carbono que forman el anillo y, opcionalmente, que llevan uno o más sustituyentes seleccionados de heterociclilo, heteroarilo, halo, hidroxi, amino, ciano, nitro, alquilamido, acilo, alcoxi C1-6, alquilo C1-6, hidroxialquilo C1-6, aminoalquilo C1-6, alquilamino C1-6, alquilsulfenilo, alquilsulfinilo, alquilsulfonilo, sulfamoílo o trifluorometilo. El grupo arilo puede estar sustituido en las posiciones para y/o meta. En otras realizaciones, el grupo arilo puede estar sustituido en la posición orto. Los ejemplos representativos de grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, 3-halofenilo, 4-halofenilo, 3-hidroxifenilo, 4-hidroxifenilo, 3-aminofenilo, 4-aminofenilo, 3-metilfenilo, 4-metilfenilo, 3-metoxifenilo, 4-metoxifenilo, 4-trifluorometoxifenilo, 3-cianofenilo, 4-cianofenilo, dimetilfenilo, naftilo, hidroxinaftilo, hidroximetilfenilo, trifluorometilfenilo, alcoxifenilo, 4-morfolin-4-il-fenilo, 4-pirrolidin-1-ilfenilo, 4-pirazolilfenilo, 4-triazolilfenilo y 4-(2-oxopirrolidin-1-il)fenilo.

Como se usa en el presente documento, el término "heteroarilo" significa un radical aromático que tiene uno o más heteroátomo o heteroátomos (por ejemplo, oxígeno, azufre o nitrógeno) en el esqueleto del anillo y pueden incluir un único anillo (por ejemplo, piridina) o múltiples anillos condensados (por ejemplo, quinolina). Los grupos heteroarilo pueden llevar uno o más sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente de halo, hidroxi, amino, ciano, nitro, cicloalquilo, haloalquilo, arilo, heterociclilo, mercapto, alquilamido, acilo, alcoxi C1-6, alquilo C1-6, hidroxialquilo C1-6, aminoalquilo C1-6, alquilamino C1-6, alquilsulfenilo, alquilsulfinilo, alquilsulfonilo, sulfamoílo y trifluorometilo. Los ejemplos representativos de grupos heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, derivados opcionalmente sustituidos de furano, benzofurano, tiofeno, benzotiofeno, pirrol, piridina, indol, oxazol, benzoxazol, isoxazol, benzisoxazol, tiazol, benzotiazol, isotiazol, imidazol, bencimidazol, pirazol, indazol, tetrazol, quionolina, isoquinolina, piridazina, pirimidina, purina y pirazina, furazano, 1,2,3-oxadiazol, 1,2,3-tiadiazol, 1,2,4-tiadiazol, triazol, benzotriazol, pteridina, fenoxazol, oxadiazol, benzopirazol, quinolizina, cinolina, ftalazina, quinazolina y quinoxalina. En algunas realizaciones, los sustituyentes pueden ser halo, hidroxi, ciano, O-alquilo C1-6, alquilo C1-6, hidroxialquilo C1-6 y aminoalquilo C1-6.

El término "plaqueta" se usa aquí para referirse a una plaqueta sanguínea. Una plaqueta puede describirse como un disco protoplásmico minúsculo que se encuentra en la sangre de los vertebrados. Las plaquetas juegan un papel en la coagulación de la sangre. La plaqueta puede derivar de cualquier fuente incluyendo un suministro de sangre humana o la propia sangre del paciente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" significa la cantidad de uno o más componentes activos que es suficiente para mostrar un efecto deseado. Esto incluye efectos tanto terapéuticos como profilácticos. Cuando se aplica a un principio activo individual, administrado solo, la expresión se refiere a un ingrediente en solitario. Cuando se aplica a una combinación, la expresión se refiere a cantidades combinadas de los principios activos que dan como resultado el efecto terapéutico, ya se administren en combinación, en serie o de manera simultánea.

Se cree que el almacenamiento refrigerado reduce la vida útil de las plaquetas debido a la disminución de la temperatura que hace que los receptores de glucoproteína-Ib (GPIb) se agrupen en microdominios específicos de la membrana plaquetaria. El Solicitante ha descubierto que el reconocimiento de restos glucosilados/sialilados específicos en glucoproteínas agrupadas por integrinas β2 de macrófagos y receptores Ashwell-Morell de hepatocitos da como resultado la fagocitosis de plaquetas por parte del hospedador y la retirada de la circulación. Por lo tanto, el Solicitante ha identificado la prevención del agrupamiento de glucoproteínas como una diana útil para la intervención química.

Las glucoproteínas plaquetarias están íntimamente asociadas al citoesqueleto intracelular. La agrupación de glucoproteínas plaquetarias depende de la formación de balsas lipídicas en la membrana plaquetaria, que a su vez depende de la dinámica de los procesos altamente regulados de ensamblaje/desensamblaje de actomiosina. Las GTPasas de la familia Rho, incluyendo RhoA, Rac1 y Cdc42, son una clase de enzimas de unión a GTP que son reguladores centrales de la polimerización/despolimerización de la actina F y se ha demostrado que controlan la formación y composición de balsas lipídicas. Por lo tanto, el Solicitante postula que los cambios en las actividades de la Rho GTPasa pueden influir en el ensamblaje de la balsa lipídica de la membrana de las plaquetas y en la composición de las glucoproteínas. El direccionamiento reversible de las GTPasas de la familia Rho por parte de los inhibidores de moléculas pequeñas puede prevenir las lesiones por almacenamiento en refrigeración dependientes del citoesqueleto en las plaquetas y dar como resultado una mayor supervivencia de las plaquetas.

Los mecanismos de cómo las temperaturas frías afectan la supervivencia de las plaquetas no se entienden completamente, aunque se ha recopilado información significativa en la última década. Se cree que los efectos de la temperatura fría en las plaquetas son complejos e implican un cambio de forma, reorganización del citoesqueleto, activación, agrupación de proteínas de la superficie celular y cambios en las estructuras de carbohidratos de las glucoproteínas de superficie (15-18). Los cambios inducidos por la refrigeración, incluidos los filopodios o los lamelipodios, se acompañan de un aumento en la fracción de actina celular total en estado polimérico (F-actina) (12, 18, 19) y la desaparición de una espiral de microtúbulos periféricos (20). La prevención aislada de la polimerización de microtúbulos usando colchicina no ha resultado en la prevención del cambio de forma tras la activación (21, 22). La prevención de la dinámica de actina aislada usando citocalasina B da como resultado la reversión de la forma discoide (18) pero no mejora la supervivencia de las plaquetas en los babuinos (23), lo que sugiere que el bloqueo irreversible de la polimerización de actina no previene el daño por refrigeración.

La presencia de receptores plaquetarios de frío se ha postulado como una explicación de los efectos homeostáticos y

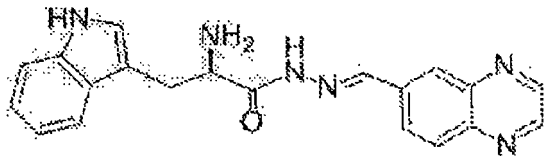
clínicos cuando las plaquetas se someten a temperaturas inferiores a 16 °C. Se cree que la temperatura fría induce la desglucosilación del ectodominio de la glucoproteína Ib que expone los restos de N-acetil-D-glucosamina (17), que secuestra los gangliósidos GM1 en balsas lipídicas. La glucoproteína Iba asociada a la balsa forma grupos al unirse las proteínas adaptadoras 14-3-3z a su cola citoplasmática, un proceso acompañado de daño mitocondrial y exposición a PS (similar a la apoptosis)(24). Se cree que los mecanismos de eliminación de plaquetas están asociados a la agrupación de GPIb asociada a la balsa lipídica y la prevención de la agrupación impide la eliminación de plaquetas (15, 25). Íntimamente asociado al citoesqueleto intracelular, el agrupamiento de GPIb depende de la formación de microdominios (las llamadas "balsas de lípidos") en la membrana plaquetaria que, a su vez, depende de la dinámica de los procesos altamente regulados de ensamblaje/desensamblaje de acto-miosina en múltiples niveles. Resumiendo, la refrigeración da como resultado múltiples defectos plaquetarios complejos que pueden estar estrechamente asociados A alteraciones del citoesqueleto en múltiples niveles (FIGURA 1A).

Los reordenamientos del citoesqueleto de actina responsables de las balsas lipídicas y la agrupación de GPIb en las balsas lipídicas dependen de las actividades coordinadas de Cdc42, Rac1 y RhoA GTPasas, que controlan efectores posteriores específicos en la regulación de la polimerización y despolimerización de la F-actina, contracción de actomiosina, polimerización de tubulina y anclaje de espectrina. Las GTPasas de la familia Rho son una clase de enzimas de unión a GTP que actúan como interruptores de señalización en la transducción espacial/temporal y la amplificación de señales de los receptores de plaquetas a las vías de señalización intracelular que impulsan la función plaquetaria. Entre los efectores directos de Rho GTPasa, WASP, se ha demostrado que las forminas y PAK que controlan la polimerización/despolimerización de F-actina son cruciales en el control de la formación y composición de balsas lipídicas y la polimerización tubular de plaquetas (27) (FIGURA 1B). Por lo tanto, los cambios en las actividades de la Rho GTPasa pueden influir en el ensamblaje del microdominio de la membrana plaquetaria y la composición de la glucoproteína. Los estudios anteriores que utilizaron mutantes negativos dominantes de Cdc42 y Rad 1 no encontraron ningún efecto en la prevención del daño plaquetario inducido por el frío (28), pero la limitación de las herramientas utilizadas ha impedido que los investigadores manipulen la dinámica de actina/actomiosina de una manera específica reversible.

Sin pretender quedar limitados a teoría alguna, se cree que la inhibición reversible de múltiples Rho de la familia de GTPasas por inhibidores químicos puede mejorar significativamente la supervivencia de las plaquetas y la función de transfusión después del almacenamiento refrigerado mediante la interferencia con la dinámica de la actomiosina y los microdominios de membrana para evitar la agrupación de GPIb.

Composiciones y métodos útiles para la supervivencia y/o calidad de las plaquetas, la transfusión y problemas asociados se describen en el presente documento. En un aspecto, se describe una composición para el almacenamiento o el tratamiento de plaquetas.

El inhibidor de RHOA comprende (Fórmula III)(G04) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.



(Fórmula III) (G04)

El principio activo puede formar sales. La referencia a un compuesto del principio activo en el presente documento se entiende que incluye la referencia a sales del mismo, a menos que se indique lo contrario. La expresión "sal o sales", como se emplea en el presente documento, representa sales ácidas y/o básicas formadas con ácidos y bases inorgánicos y/u orgánicos. Además, cuando un principio activo contiene un resto básico, tales como, pero no limitado a una amina o una piridina o un anillo de imidazol y un resto ácido, tales como, pero no limitado a ácido carboxílico, pueden formarse zwitteriones ("sales internas") y se incluyen dentro de la expresión "sal o sales" como se usa en el presente documento. Se prefieren las sales farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, no tóxicas, fisiológicamente aceptables), aunque también son útiles otras sales, por ejemplo, en etapas de aislamiento o purificación, que pueden emplearse durante la preparación. Pueden formarse sales de los compuestos del principio activo, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto del principio activo con una cantidad de un ácido o base, tal como una cantidad equivalente, en un medio tal como uno en el que la sal precipita o en un medio acuoso seguido de liofilización.

Los principios activos que contienen un resto básico, tales como, pero no limitado a una amina o una piridina o un anillo de imidazol, pueden formar sales con una diversidad de ácidos orgánicos e inorgánicos. Las sales de adición de ácidos ilustrativas incluyen acetatos (tales como los formados con ácido acético o ácido trihaloacético, por ejemplo, ácido trifluoroacético), adipatos, alginatos, ascorbatos, aspartatos, benzoatos, bencenosulfonatos, bisulfatos, boratos, butiratos, citratos, alcanforatos, alcanforsulfonatos, ciclopentanopropionatos, digluconatos, dodecilsulfatos, etanosulfonatos, fumaratos, glucoheptanoatos, glicerofosfatos, hemisulfatos, heptanoatos, hexanoatos, clorhidratos (formados con ácido clorhídrico), bromhidratos (formados con bromuro de hidrógeno), yodhidratos, 2-hidroxietanosulfonatos, lactatos, maleatos (formados con ácido maleico), metanosulfonatos (formados con ácido

metanosulfónico), 2-naftalenosulfonatos, nicotinatos, nitratos, oxalatos, pectinatos, persulfatos, 3-fenilpropionatos, fosfatos, picratos, pivalatos, propionatos, salicilatos, succinatos, sulfatos (tal como los formados con ácido sulfúrico), sulfonatos (tal como los mencionados en el presente documento), tartratos, tiocianatos, toluenosulfonatos tales como tosilatos, undecanoatos y similares.

Los principios activos que contienen un resto ácido, tales como, pero no limitado a ácido carboxílico, pueden formar sales con una diversidad de bases orgánicas e inorgánicas. Las sales básicas ilustrativas incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinostales como sales de sodio, de litio y de potasio, sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y de magnesio, sales con bases orgánicas (por ejemplo, aminas orgánicas) tales como benzatinas, diciclohexilaminas, hidrabaminas [formadas con N,N-bis(deshidro-abietil)etilendiamina], N-metil-D-glucaminas, N-metil-D-glucamidas, t-butil aminas y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina y similares. Los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con agentes tales como haluros de alquilo inferior (por ejemplo, cloruros, bromuros y yoduros de metilo, de etilo, de propilo y de butilo), dialquil sulfatos (por ejemplo, dimetil, dietil, dibutil y diamil sulfatos), haluros de cadena larga (por ejemplo, cloruros, bromuros y yoduros de decilo, de laurilo, de miristilo y de estearilo), haluros de aralquilo (por ejemplo, bromuros de bencilo y fenetilo) y otros.

El principio activo y sales del mismo, pueden existir en su forma tautomérica (por ejemplo, como una amida o un imino éter).

Todos los estereoisómeros de los presentes compuestos, tales como aquellos, por ejemplo, que puede existir debido a los carbonos asimétricos en cualquiera de los sustituyentes, incluyendo formas enantioméricas (que pueden existir incluso en ausencia de carbonos asimétricos) y formas diastereoisómeras, están contemplados y dentro del alcance de las realizaciones preferidas. Los estereoisómeros individuales de los compuestos de las realizaciones preferidas pueden, por ejemplo, estar sustancialmente exentos de otros isómeros o pueden estar mezclados, por ejemplo, como racematos o con todos los demás o con otros estereoisómeros seleccionados. Los centros quirales de las realizaciones preferidas pueden tener la configuración S o R como se define por las recomendaciones de la IUPAC de 1974.

Cuando los compuestos están en forma de sales, pueden comprender sales farmacéuticamente aceptables. Tales sales pueden incluir sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables, sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables, sales metálicas farmacéuticamente aceptables, sales de amonio y de amonio alquilado. Las sales de adición de ácido incluyen sales de ácidos inorgánicos así como ácidos orgánicos. Los ejemplos representativos de ácidos inorgánicos adecuados incluyen ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, fosfórico, sulfúrico, nítrico y similares. Los ejemplos representativos de ácidos orgánicos adecuados incluyen ácidos fórmico, acético, tricloroacético, trifluoroacético, propiónico, benzoico, cinámico, cítrico, fumárico, glicólico, láctico, maleico, málico, malónico, mandélico, oxálico, pícrico, pirúvico, salicílico, succínico, metanosulfónico, etanosulfónico, tartárico, ascórbico, pamoico, bismetilensalicílico, etanodisulfónico, glucónico, citracónico, aspártico, esteárico, palmítico, EDTA, glicólico, p-aminobenzoico, glutámico, bencenosulfónico, p-toluenosulfónico, sulfatos, nitratos, fosfatos, percloratos, boratos, acetatos, benzoatos, hidroxinaftoatos, glicerofosfatos, cetoglutaratos y similares. Los ejemplos de sales metálicas incluyen sales de litio, sodio, potasio, magnesio y similares. Los ejemplos de sales de amonio y de amonio alquilado incluyen sales de amonio, metilamonio, dimetilamonio, trimetilamonio, etilamonio, hidroxietilamonio, dietilamonio, butilamonio, tetrametilamonio y similares. Los ejemplos de bases orgánicas incluyen lisina, arginina, guanidina, dietanolamina, colina y similares.

Las sales farmacéuticamente aceptables pueden prepararse mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, haciendo reaccionar el principio activo con 1 a 4 equivalentes de una base tales como hidróxido sódico, metóxido sódico, hidruro sódico, t-butóxido potásico, hidróxido cálcico, hidróxido magnésico y similares, en disolventes como éter, THF, metanol, t-butanol, dioxano, isopropanol, etanol, etc. Pueden usarse mixturas de disolventes. Bases orgánicas como lisina, arginina, dietanolamina, colina, guandina y sus derivados, etc. también pueden usarse. Alternativamente, las sales de adición de ácido, cuando sea aplicable, se preparan mediante tratamiento con ácidos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido fónico, ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico, ácido salicílico, ácido hidroxinaftoico, ácido ascórbico, ácido palmítico, ácido succínico, ácido benzoico, ácido bencenosulfónico, ácido tartárico y similares en disolventes como acetato de etilo, éter, alcoholes, acetona, THF, dioxano, etc. Pueden usarse mezclas de diferentes disolventes.

Las composiciones descritas anteriormente pueden comprender un vehículo fisiológicamente aceptable. En un aspecto, el vehículo fisiológicamente aceptable puede comprender un tampón. En un aspecto, el vehículo fisiológicamente aceptable puede seleccionarse de solución salina, solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris, solución salina tamponada de Hank, agua o una combinación de los mismos. En un aspecto, el vehículo fisiológicamente aceptable puede comprender una solución electrolítica.

En un aspecto, el inhibidor de RHOA puede estar presente en un vehículo a una concentración, en combinación o por separado, de al menos aproximadamente 10 µM o al menos aproximadamente 25 µM, al menos aproximadamente 50 µM, al menos aproximadamente 100 µM, al menos aproximadamente 200 µM, al menos aproximadamente 500 µM, al menos aproximadamente 1 mM, al menos aproximadamente 10 mM, al menos aproximadamente 50 mM, al menos aproximadamente 100 mM o al menos aproximadamente 1 M.

En un aspecto, el inhibidor de RHOA puede estar presente en una concentración de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 500 µM, o de aproximadamente 25 µM a aproximadamente 400 µM, o de aproximadamente 50 µM a aproximadamente 300 µM, o de aproximadamente 75 µM a aproximadamente 200 µM, o de aproximadamente de 100 µM a aproximadamente 150 µM o aproximadamente 75 g.

En aspectos adicionales, las composiciones descritas pueden comprender un aditivo seleccionado de NaCl, KC1, CaC12, $MgCl_2$, $MgSO_4$, citrato de Na^3, ácido cítrico, $NaHCO_3$, fosfato de Na, acetato de Na, gluconato de Na, glucosa, maltosa, manitol y combinaciones de los mismos. Las composiciones descritas pueden comprender un aditivo seleccionado de NaCl, KC1, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $MgSO_4$, citrato de Na^3, ácido cítrico, $NaHCO_3$, fosfato de Na, acetato de Na, gluconato de Na, glucosa, maltosa, manitol y combinaciones de los mismos, en donde dicho aditivo puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,5 mmol/l a aproximadamente 150 mmol/l.

En aspectos adicionales, las composiciones descritas pueden comprender uno o más ingredientes seleccionados de D-ribosa, D-glucosa, solución de Hank, solución de Hepes, seroalbúmina bovina, péptido anticoagulante tic y agua estéril o combinaciones de los mismos.

En un aspecto, la composición puede comprender una sustancia auxiliar seleccionada de agentes de ajuste de pH y tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizantes, agentes humectantes y combinaciones de los mismos.

En un aspecto, la composición puede tener un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 7, o de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4.

En un aspecto, la composición puede ser isotónica.

En aspectos aún adicionales, la composición puede comprender un agente terapéutico adicional.

También se describe un método para almacenar plaquetas. En este aspecto, el método comprende la etapa de almacenar plaquetas en una composición como se desvela en el presente documento.

En un aspecto, el método puede comprender poner en contacto las plaquetas con una solución que comprende un inhibidor de RHOA, en donde el uno o más principios activos están presentes en un vehículo a una concentración, en combinación o por separado, de al menos aproximadamente 10 µM o al menos aproximadamente 25 µM, al menos aproximadamente 50 µM, al menos aproximadamente 1001,1 M, al menos aproximadamente 2001,1 M, al menos aproximadamente 5001,1 M, al menos aproximadamente 1 mM, al menos aproximadamente 10 mM, al menos aproximadamente 50 mM, al menos aproximadamente 100 mM o al menos aproximadamente 1 M.

En un aspecto, el método puede comprender poner en contacto las plaquetas con una solución que comprende un inhibidor de RHOA presente en una solución a una concentración de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 5001,1 M, o de aproximadamente 25 1,l M a aproximadamente 4001,1 M, o de aproximadamente 501,l M a aproximadamente 3001,1 M, o de aproximadamente 75 µM a aproximadamente 200 µM, o de aproximadamente 100 µM a aproximadamente 150 µM o aproximadamente 75 µM.

En un aspecto, la etapa de almacenamiento puede llevarse a cabo a una temperatura de aproximadamente 1 °C a aproximadamente 20 °C, o a aproximadamente 1 °C, o aproximadamente 2 °C, o aproximadamente 3 °C, o aproximadamente 4 °C, o aproximadamente 5 °C. °C, o aproximadamente 6 °C, o aproximadamente 7 °C, o aproximadamente 8 °C, o aproximadamente 9 °C, o aproximadamente 10 °C, o aproximadamente 11 °C, o aproximadamente 12 °C, o aproximadamente 13 °C, o aproximadamente 14 °C, o aproximadamente 15 °C, o aproximadamente 16 °C.

En un aspecto, la etapa de almacenamiento puede llevarse a cabo durante un período de tiempo de aproximadamente 7 a 20 días, o de aproximadamente 10 a 15 días, o más de 7 días, o más de 8 días, o más de 9 días, o más de 10 días, o más de 11 días, o más de 12 días, o más de 13 días o más de dos semanas.

En un aspecto, la composición puede usarse en una cantidad suficiente para inhibir una actividad dañina de plaquetas seleccionada de la polimerización de F-actina, despolimerización de F-actina, contracción de actomiosina, polimerización de tubulina, anclaje de espectrina o combinaciones de los mismos.

En un aspecto, aplicando los métodos descritos, la supervivencia de las plaquetas puede ser superior al 65 %, superior al 70 %, superior al 75 %, superior al 80 %, superior al 85 %, superior al 90 % o superior a 95 %, o más de aproximadamente 99 % después de un período de almacenamiento de 24 horas a 5 °C.

En un aspecto, también se desvela un método para revertir la activación plaquetaria, que comprende poner en contacto plaquetas activadas con una composición como se describe en el presente documento. En un aspecto, la etapa de contacto puede llevarse a cabo a una temperatura de aproximadamente 0 °C. En otro aspecto más, las composiciones desveladas pueden usarse para revertir las lesiones por almacenamiento en refrigeración en las plaquetas. En este

aspecto, las plaquetas que tienen lesiones por almacenamiento en refrigeración pueden ponerse en contacto con una composición como se desvela en el presente documento, durante un período de tiempo suficiente para revertir las lesiones por almacenamiento en refrigeración.

Ejemplos que incluyen ejemplos de referencia

El Solicitante ha probado la capacidad de tres inhibidores químicos, CASINA, NSC23766 y G04, que se dirigen a Cdc42, Rad y RhoA, respectivamente (FIGURA 2), de inhibir la actividad de las GTPasas y las consiguientes funciones dependientes del citoesqueleto de las plaquetas humanas. CASINA y NSC23766 son ejemplos de referencia no reivindicados mencionados en los ejemplos de esta solicitud. Un inhibidor de Cdc42 desarrollado racionalmente con actividad sobre la activación por factores de intercambio de nucleótidos de guanina es CASINA (29, *Nature Biotech* en revisión). CASINA fue descubierto recientemente por el grupo Zheng como una molécula pequeña que reconoce un dominio de bolsillo que bloquea específicamente la capacidad de interacción de GEF con Cdc42 (FIGURA 3A). Se ha descubierto que la CASINA suprime el envejecimiento de las células madre hematopoyéticas a través de su actividad inhibidora específica de Cdc42 (29). En plaquetas, inhibe la activación de Cdc42 (FIGURA 3B) y previene los cambios de forma de plaquetas inducidos por colágeno (FIGURA 3C). Estos cambios dependen de la señalización de la integrina e implican la polimerización de F-actina y la formación de filopodios, como se demuestra mediante la tinción de faloides (FIGURA 3C, paneles inferiores). La inhibición de Cdc42 por CASINA da como resultado la prevención de la agregación plaquetaria inducida por colágeno (FIGURA 3D) que puede revertirse mediante un lavado del inhibidor (FIGURA 3D, paneles superior e inferior).

De forma similar, un inhibidor de Rac, NSC23766 (3034), con la capacidad de alterar la activación de Rac 1 mediante múltiples señales de activación que pueden ser cruciales en la señalización de plaquetas asociada con Gplb/GpX (35). NSC23766 se descubrió en un cribado virtual basado en la estructura de compuestos que encajan en un surco superficial de Rac 1 que se sabe que es crítico para la especificación del factor de intercambio de nucleótidos de guanina (34) (FIGURA 4A). NSC23766 puede bloquear eficazmente la activación de Rac 1 (FIGURA 4B) y los reordenamientos del citoesqueleto dependientes de Rac (lamelipodios de actina) de plaquetas estimuladas por colágeno (30, 32, 35), lo que indica su capacidad para suprimir la señalización dependiente de integrina de colágeno (FIGURA 4C). Finalmente, NSC23766 inhibe reversiblemente, de forma dependiente de la dosis, la agregación de plaquetas inducida por colágeno (FIGURA 4D, paneles superior e inferior).

Finalmente, G04/Rhosina también se desarrolló por los presentes inventores como un inhibidor del sitio de activación de RhoA GTPasa que bloquea de forma transitoria y específica la actividad de RhoA y las funciones de señalización mediadas por RhoA (36, 37). G04 contiene dos anillos aromáticos unidos por un enlazador, y se une al área superficial intercalando Trp58 de RhoA (FIG. 5A) con un Kd submicromolar e inhibe eficazmente la activación de RhoA catalizada por GEF. En plaquetas, G04 inhibe específicamente la actividad de RhoA inducida por colágeno (FIGURA 5B) y las funciones celulares mediadas por RhoA, incluida la propagación de plaquetas dependiente de fibrinógeno (FIGURA 5C) y la agregación de plaquetas dependiente de colágeno (FIGURA 5D). El efecto por colágeno o trombina es reversible (FIGURA 5D, inferior).

Además de la reversibilidad, cada inhibidor imita transitoriamente los efectos de inactivación génica de Cdc42, de Rac1 o de RhoA en plaquetas, respectivamente, y no muestra ningún efecto aditivo en las respectivas células con inactivación génica (datos no mostrados), indicando su especificidad y falta de toxicidad.

Una combinación de CASINA (10 µM), G04 (75 µM) y/o NSC23766 en plaquetas murinas marcadas con carboxifluoresceína C57B1/6 incubadas a 0 °C o 5 °C durante 3,5 horas. Después de volver a calentar, las plaquetas se infundieron en 5 ratones congénicos (por grupo) y se compararon con el control (almacenado a temperatura ambiente) y el grupo de plaquetas refrigeradas sin tratar (FIGURA 7). Mientras que la combinación de NSC23766, G04 y CASINA dan como resultado una reversión casi completa de la deficiencia de supervivencia inducida por el almacenamiento refrigerado, NSC23766 solo o NSC23766 en combinación con CASINA o G04 no dieron como resultado una reversión significativa de la lesión por almacenamiento de plaquetas (FIGURA 7). En un segundo experimento centrado en las combinaciones específicas con más actividad para revertir el deterioro de la supervivencia asociado con el uso de inhibidores de Rho GTPasa, analizamos la recuperación de 24 horas (%) y la supervivencia (horas) de las plaquetas que se habían almacenado en presencia de varias combinaciones de fármacos (FIGURA 6A).

De forma similar, el tratamiento de plaquetas refrigeradas con CASINA o G04 solo no mejoró la recuperación de plaquetas en 24 horas (FIGURA 6B) o la supervivencia (FIGURA 6C) *in vivo*. Sin embargo, una triple combinación de CASINA, G04 y NSC23766 dio como resultado una recuperación (FIGURA 6B) y supervivencia (FIGURA 6C) significativamente mejoradas de plaquetas refrigeradas después de la infusión. El uso de la misma combinación de triple inhibidor durante el almacenamiento de plaquetas refrigeradas a 5 °C en lugar de a 0 °C dio como resultado una reversión completa de la recuperación y supervivencia de las plaquetas refrigeradas *in vivo* (FIGURA 6D) como se determina por análisis de regresión de múltiples resultados (software COSTCO) y prueba ANOVA con corrección de Bonferroni para diferencias estadísticas. El Solicitante descubrió que la recuperación de 24 horas de las plaquetas refrigeradas se redujo significativamente (~20 %) en comparación con el grupo control (almacenadas a temperatura ambiente, $p<0,01$). De forma interesante, la recuperación acortada se revirtió completamente por incubación con el cóctel de tres inhibidores (FIGURA 6D). En conjunto, estos datos indican que la combinación inhibitoria de Cdc42,

Rac1 y RhoA con CASINA, NSC23766 y G04 pueden inhibir de manera específica y reversible la activación plaquetaria y pueden ser útiles para revertir la lesión de plaquetas por almacenamiento en refrigeración.

Finalmente, los inhibidores de GTPasa de la familia Rho pueden prevenir la lesión por almacenamiento de plaquetas humanas *in vitro* según lo evaluado por la formación de micropartículas y el contenido de GpIb (CD42b) en micropartículas. El Solicitante descubrió que el uso de inhibidores resultó en la reversión de la generación de micropartículas dependientes de la refrigeración (Figura 8A-B). Finalmente, el Solicitante analizó la formación de microdominios de balsas lipídicas en la membrana plaquetaria mediante análisis diferencial en lisados enriquecidos en fragmentos de membrana resistentes a Triton-X-100 en plaquetas humanas almacenadas refrigeradas durante 3 y 7 días (Figura 9). Los presentes inventores descubrieron una correlación completa entre los resultados de supervivencia de plaquetas refrigeradas en presencia de combinaciones de inhibidores con la formación de microdominios de balsas lipídicas, lo que sugiere que la combinación de inhibidores que contiene G04, NSC23766 y CASINA dan como resultado la reversión de la formación de balsas lipídicas inducidas por refrigeración. De forma interesante, retirar por lavado G04, NSC23766 y CASINA da como resultado la restauración de los mismos niveles de balsas lipídicas que se encuentran en plaquetas almacenadas durante 3 o 7 días a temperatura ambiente (Figura 9), lo que sugiere que la retirada de estos inhibidores da como resultado modificaciones reológicas de la membrana plaquetaria similares a las observadas en plaquetas sin procesar, de almacenamiento convencional durante el mismo período de tiempo (Figura 9). Estos datos proporcionan una prueba de concepto de que el almacenamiento a largo plazo (6 días) de plaquetas en plasma que contiene inhibidores de Rho GTPasa no es perjudicial para las plaquetas, pero puede prevenir aún más su activación asociada a lesiones de almacenamiento.

Por lo tanto, los datos del Solicitante respaldan firmemente que la inhibición reversible de múltiples familias Rho de GTPasas por inhibidores químicos puede prevenir significativamente el daño por almacenamiento refrigerado y mejorar la supervivencia de las plaquetas y la función de transfusión después de la refrigeración al interferir con la formación de microdominios de balsas lipídicas, dinámica de actomiosina y agrupación de GPIb en microdominios de membrana.

El Solicitante analizó y confirmó además que la inhibición reversible de múltiples familias Rho de GTPasas por inhibidores químicos puede prevenir significativamente el daño por almacenamiento refrigerado y mejorar la supervivencia plaquetaria y la función de transfusión después de la refrigeración. Se cree que el mecanismo es a través de la inhibición de la formación de microdominios de balsas lipídicas reguladas por Rho GTPasa, dinámica de actomiosina y agrupación de GPIb en microdominios de membrana.

Para validar aún más los presentes resultados de la mejora de la supervivencia de plaquetas refrigeradas murinas en primates, el Solicitante primero analizó la supervivencia de plaquetas humanas agrupadas (n = 10 donantes por experimento) transfundidas en ratones NSG con macrófagos agotados, irradiados, trombocitopénicos. Estos ratones inmunodeficientes permiten la supervivencia de las plaquetas humanas durante un período de tiempo corto (<24 horas) pero lo suficientemente largo como para permitir la comparación. En este modelo, el Solicitante descubrió que, en dos experimentos independientes (n = 4 ratones por grupo y experimento), la incubación de plaquetas durante el almacenamiento con los inhibidores G04 (inhibidor de RhoA), NSC23766 (NSC; inhibidor de Rac) en ausencia de etapa de lavado o con una etapa de lavado a temperatura ambiente de los inhibidores usados *in vitro*. De forma interesante, la Casina (inhibidor de Cdc42) no modificó la mala supervivencia de las plaquetas refrigeradas (FIGURA 10A-10B). En segundo lugar, estos resultados se validaron aún más mediante la aplicación de una combinación de G04, NSC y Casina en plaquetas exogámicas de macaco de la India biotiniladas y transfundidas de forma autóloga después de un almacenamiento refrigerado de 7 días. Como se ve en la FIGURA 10C, un ensayo cruzado aleatorizado donde los mismos macacos fueron transfundidos con control (no tratados con inhibidores, control) o inhibidores (prueba), demostró que la combinación de inhibidores dio como resultado una mejora (recuperaciones positivas) en el grupo de prueba.

Para definir mejor el efecto de la inhibición de RhoA y descartar cualquier efecto inespecífico de G04, los presentes inventores analizaron plaquetas de ratones de tipo silvestre (Ts) y de ratones con deficiencia genética de RhoA inducida por interferón (polI:C) (FIGURA 11A). G04 y en un menor grado, NSC, fueron capaces de reducir el nivel de Flot-1 en la balsa lipídica de membrana (microdominios) de plaquetas Ts refrigeradas (FIGURA 11B). De forma interesante, los niveles de Flot-1 unido a la membrana en RhoA-deficiente ($RhoA^{\Delta/\Delta}$) fue similar a los encontrados en plaquetas refrigeradas Ts tratadas con G04 (FIGURA 10C) y NSC no parece añadir ninguna inhibición adicional significativa.

A continuación, el Solicitante analizó si la fagocitosis de plaquetas murinas refrigeradas por células THP-1 monocíticas activadas se modificaba mediante el pretratamiento con los inhibidores de la familia Rho. El pretratamiento de plaquetas refrigeradas con G04 o la combinación de G04, Casina y NSC reducen la capacidad de ser reconocidos por las células THP-1 activadas (FIGURA 12A). El uso de plaquetas genéticamente deficientes en RhoA murino (FIGURA 12A, recuadro) fueron resistentes a la fagocitosis inducida por refrigeración y no mostraron respuesta a G04 o a la combinación de G04, Casina y NSC (FIGURA 12A). Estos resultados indican claramente que G04 bloquea la capacidad de las plaquetas refrigeradas para presentar ligandos susceptibles de ser reconocidos por las células macrófagas y este efecto depende exclusivamente de la actividad de RhoA. Estos resultados se confirmaron en plaquetas humanas. La fagocitosis por células THP-1 de plaquetas humanas refrigeradas se evitó por completo

mediante el almacenamiento con G04 o una combinación de G04, Casina y NSC incluso después de eliminar los inhibidores por lavado a temperatura ambiente (FIGURA 12B).

Finalmente, el Solicitante examinó si la ausencia de translocación de microdominios de balsa lipídica a la membrana (FIGURA 9) se correlaciona con cambios en las actividades de galactosil-transferasa y sialil-transferasa. Estas actividades deberían reducir mediante la transferencia a otros sustratos los residuos de galactosilo y sialilo de GpIb en la membrana, una etapa crucial en el proceso de lesión de almacenamiento en refrigeración de plaquetas. El Solicitante descubrió que G04 o G04 en combinación con Casina y NSC prevenían completamente la presencia de actividades de galactosil- (FIGURA 12C) o sialil-transferasa (FIGURA 12D) en la membrana plaquetaria. Este efecto es completamente reversible ya que el lavado de los inhibidores restablece el transporte de estas enzimas a la membrana (FIGURA 12C-D).

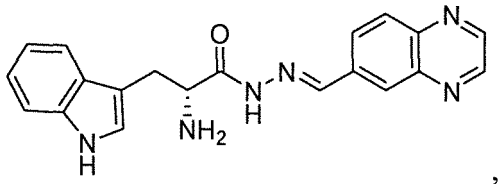
En conjunto, estos nuevos datos respaldan firmemente la conclusión de que el inhibidor de Rho GTPasa G04 solo o G04 en combinación con NSC23766 y/o Casina evitará la lesión de plaquetas por almacenamiento refrigerado. Este efecto se reproduce en plaquetas de ratón, de seres humanos y de primates no humanos. El mecanismo implica la prevención de la formación de balsas lipídicas de membrana ricas en galactosil y sialil transferasa en membranas de plaquetas refrigeradas a través de una modulación de la dinámica de la actomiesina.

Todos los porcentajes y relaciones se calculan en peso a menos que se indique lo contrario.

Todos los porcentajes y relaciones se calculan basándose en la composición total a menos que se indique lo contrario.

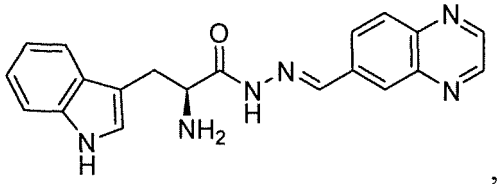
REIVINDICACIONES

1. Una composición, que comprende plaquetas y un inhibidor de RHOA seleccionado de:



,

o sal del mismo,



,

o sal del mismo o combinaciones de los mismos; y un vehículo aceptable.

2. Un método para almacenar plaquetas que comprende formar la composición de la reivindicación 1 y almacenar dicha composición.

3. Un método para revertir la activación plaquetaria que comprende formar la composición de la reivindicación 1.

4. Un método para revertir la lesión por almacenamiento en refrigeración en plaquetas que comprende formar la composición de la reivindicación 1, en donde dichas plaquetas tienen lesiones por almacenamiento en refrigeración.

5. Un método para ralentizar el daño plaquetario que comprende formar la composición de la reivindicación 1.

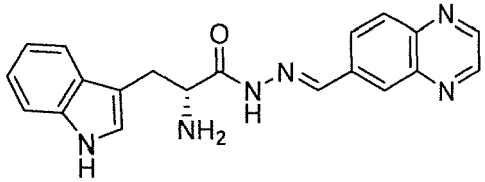
6. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en donde el vehículo comprende solución salina, solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris, solución salina tamponada de Hank, agua, una solución electrolítica o una combinación de los mismos.

7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde las plaquetas se almacenan en presencia del inhibidor de RHOA a una temperatura de 1 °C a 20 °C.

8. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 6 o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-7, que comprende además un aditivo seleccionado de NaCl, KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $MgSO_4$, citrato de Na_3, ácido cítrico, $NaHCO_3$, fosfato de Na, acetato de Na, gluconato de Na, glucosa, maltosa, manitol, D-ribosa, D-glucosa, solución de Hank, solución de HEPES, seroalbúmina bovina, péptido anticoagulante de garrapatas, agua estéril, un agente de ajuste del pH, un agente tamponante del pH, un agente de ajuste de la tonicidad, un estabilizante, un agente humectante y combinaciones de los mismos.

9. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 6 u 8 o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-8, que comprende además un agente terapéutico.

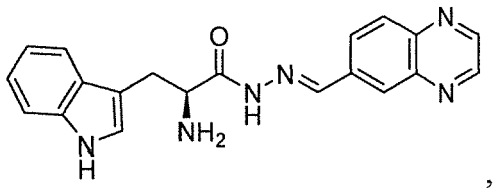
10. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 6, 8, 9 o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en donde el inhibidor de RHOA es



,

o sal del mismo.

11. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 6, 8-10 o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en donde el inhibidor de RHOA es



,

o sal del mismo.

12. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 6, 8-11 o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-11, en donde el inhibidor de RHOA está presente en dicho vehículo a una concentración de al menos 10 µM.

13. El uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 6, 8-12 en el almacenamiento de plaquetas a una temperatura de 1 °C a 20 °C.

FIG 1

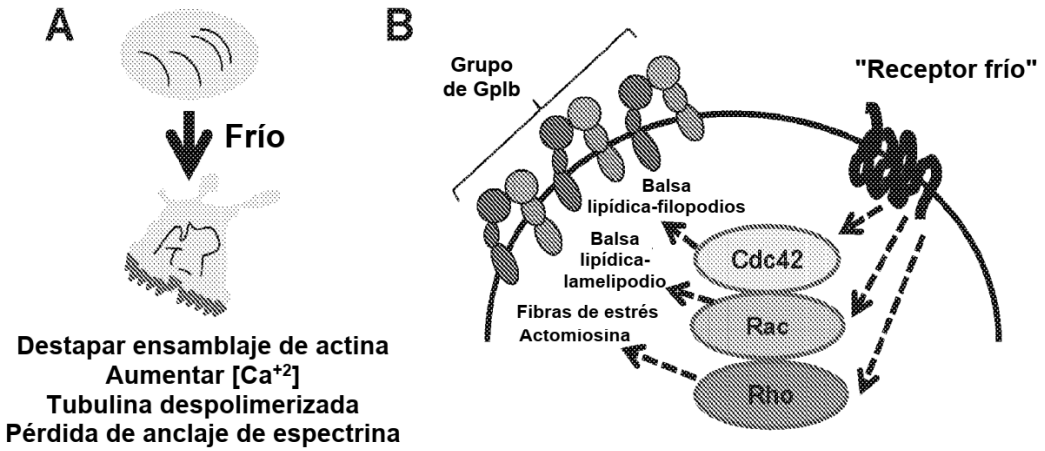


FIG 2

Inhibidores de rho GTPasa

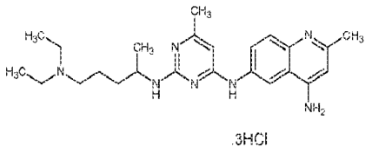
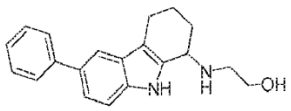
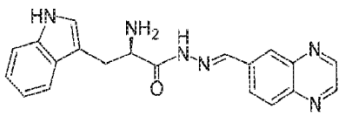
COMPUESTOS		DIANA
	NSC23766	RAC
	CASINA	CDC42
	G04	RHOA

FIG 3.

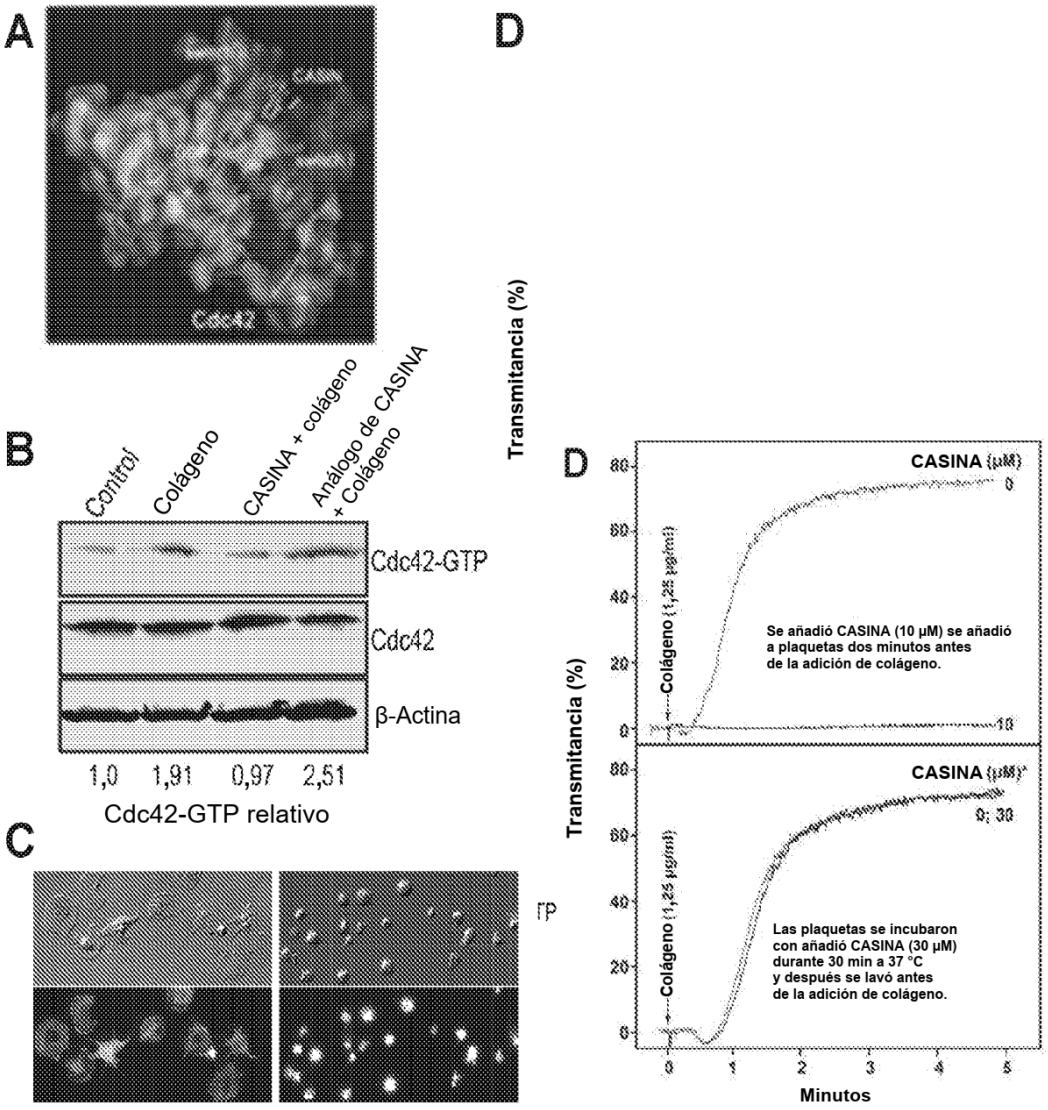

A
Cdc42
B
Control
Colágeno
CASINA + colágeno
Análogo de CASINA + Colágeno
Cdc42-GTP
Cdc42
β-Actina
1,0
1,91
0,97
2,51
Cdc42-GTP relativo
C
GTP
D
Transmitancia (%)
D
CASINA (μM)
0
10
Colágeno (1,25 μg/ml)
Se añadió CASINA (10 μM) se añadió a plaquetas dos minutos antes de la adición de colágeno.
CASINA (μM)
0; 30
Las plaquetas se incubaron con añadió CASINA (30 μM) durante 30 min a 37 °C y después se lavó antes de la adición de colágeno.
Minutos

FIG 4.

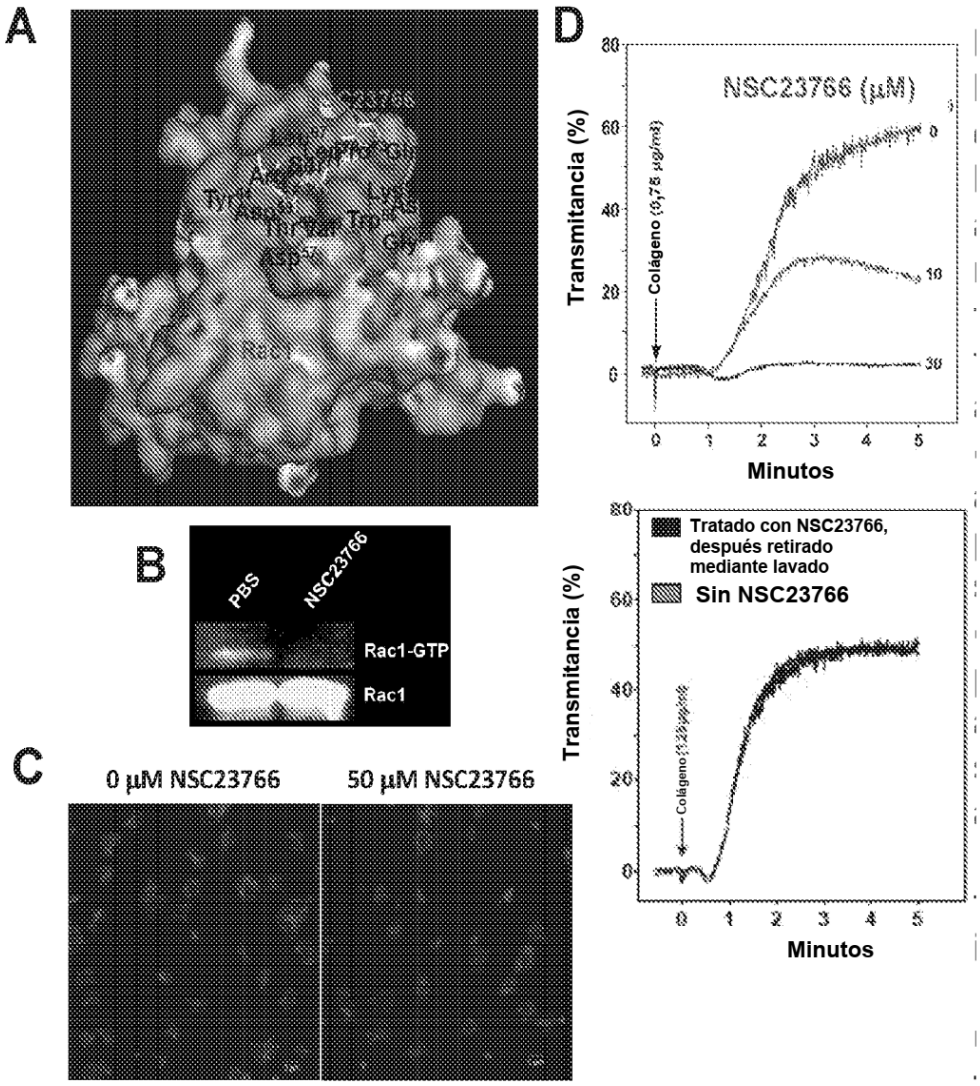

A
B
PBS
NSC23766
Rac1-GTP
Rac1
C
0 μM NSC23766
50 μM NSC23766
D
NSC23766 (μM)
Transmitancia (%)
Colágeno (3,75 μg/ml)
Minutos
Tratado con NSC23766, después retirado mediante lavado
Sin NSC23766

FIG 5.

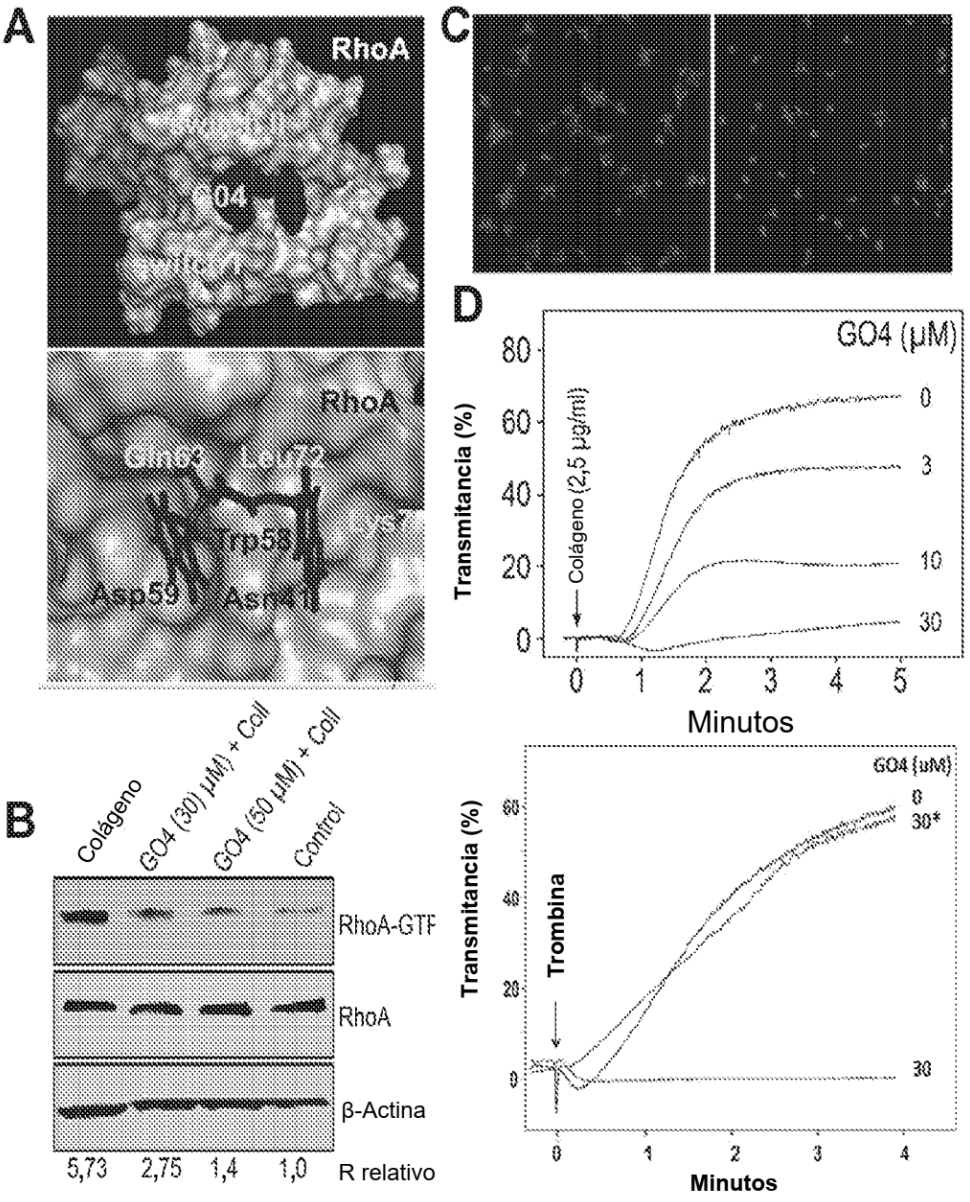

A
RhoA
GO4
RhoA
Gln63
Leu72
Trp58
Asp59
Asn41
B
Colágeno
GO4 (30) µM) + Coll
GO4 (50 µM) + Coll
Control
RhoA-GTP
RhoA
β-Actina
5,73
2,75
1,4
1,0
R relativo
C
D
GO4 (µM)
0
3
10
30
Transmitancia (%)
Colágeno (2,5 µg/ml)
Minutos
GO4 (µM)
0
30*
30
Trombina
Transmitancia (%)
Minutos

FIG 6

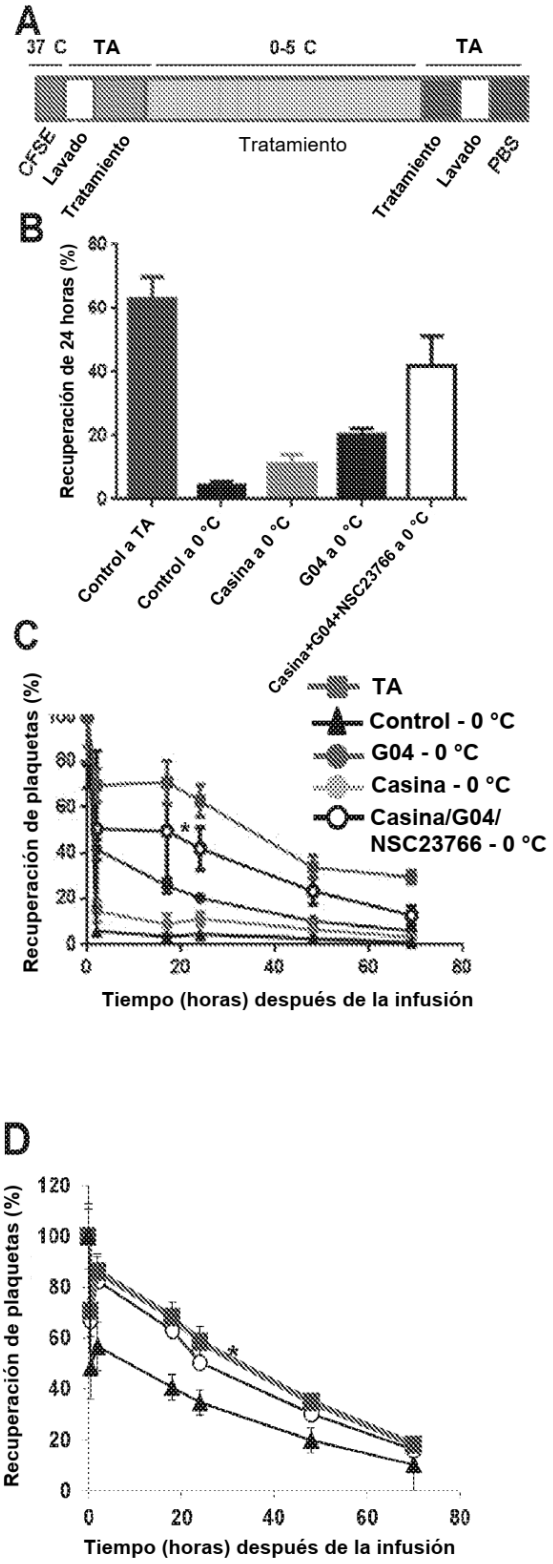

A
37 C
TA
0-5 C
TA
CFSE
Lavado
Tratamiento
Tratamiento
Tratamiento
Lavado
PBS
B
Recuperación de 24 horas (%)
Control a TA
Control a 0 °C
Casina a 0 °C
G04 a 0 °C
Casina+G04+NSC23766 a 0 °C
C
Recuperación de plaquetas (%)
TA
Control - 0 °C
G04 - 0 °C
Casina - 0 °C
Casina/G04/
NSC23766 - 0 °C
Tiempo (horas) después de la infusión
D
Recuperación de plaquetas (%)
Tiempo (horas) después de la infusión

FIG 7

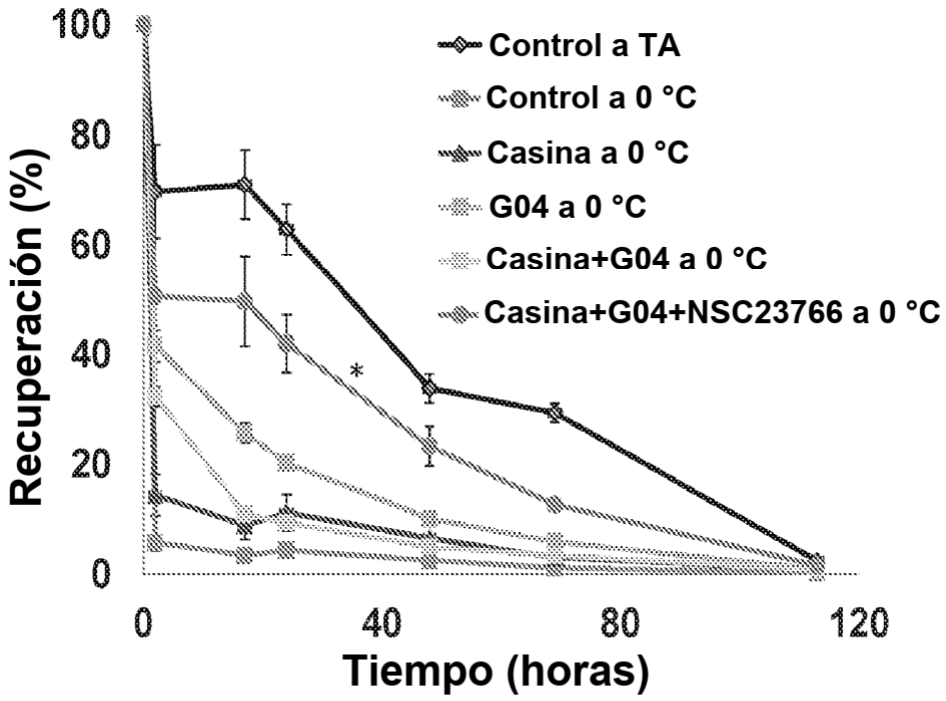

Control a TA
Control a 0 °C
Casina a 0 °C
G04 a 0 °C
Casina+G04 a 0 °C
Casina+G04+NSC23766 a 0 °C
Recuperación (%)
100
80
60
40
20
0
0
40
80
120
Tiempo (horas)
*

FIG 8

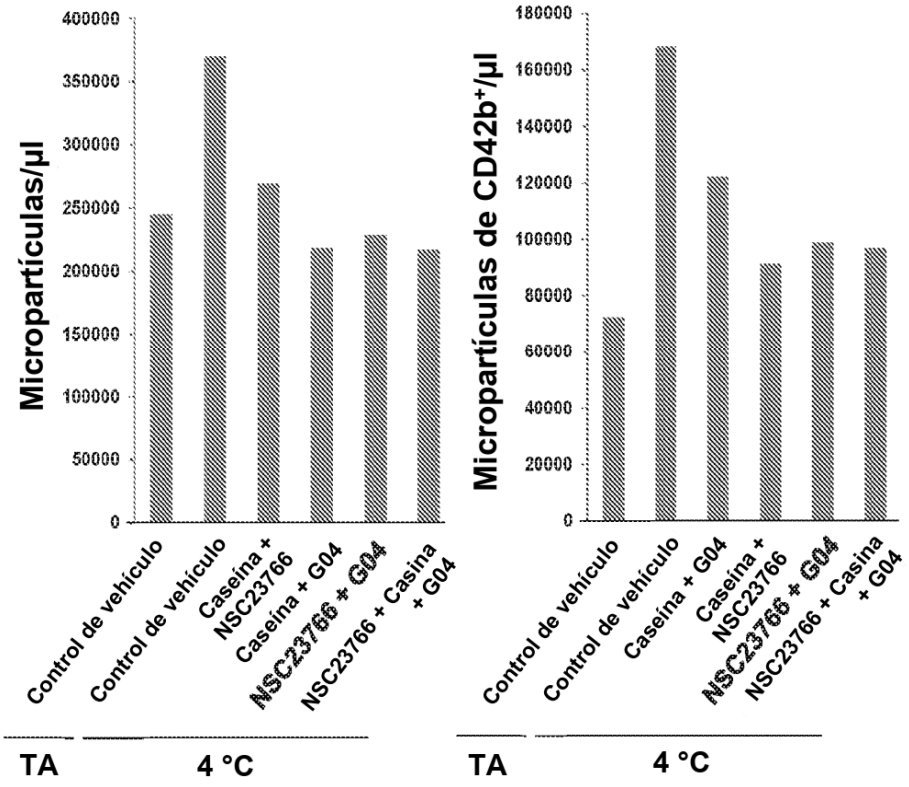

Micropartículas/µl
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
Control de vehículo
Control de vehículo
Caseína + NSC23766
Caseína + G04
NSC23766 + G04
NSC23766 + Casina + G04
TA
4 °C
Micropartículas de CD42b+/µl
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
Control de vehículo
Control de vehículo
Caseína + G04
Caseína + NSC23766
NSC23766 + G04
NSC23766 + Casina + G04
TA
4 °C

FIG 9

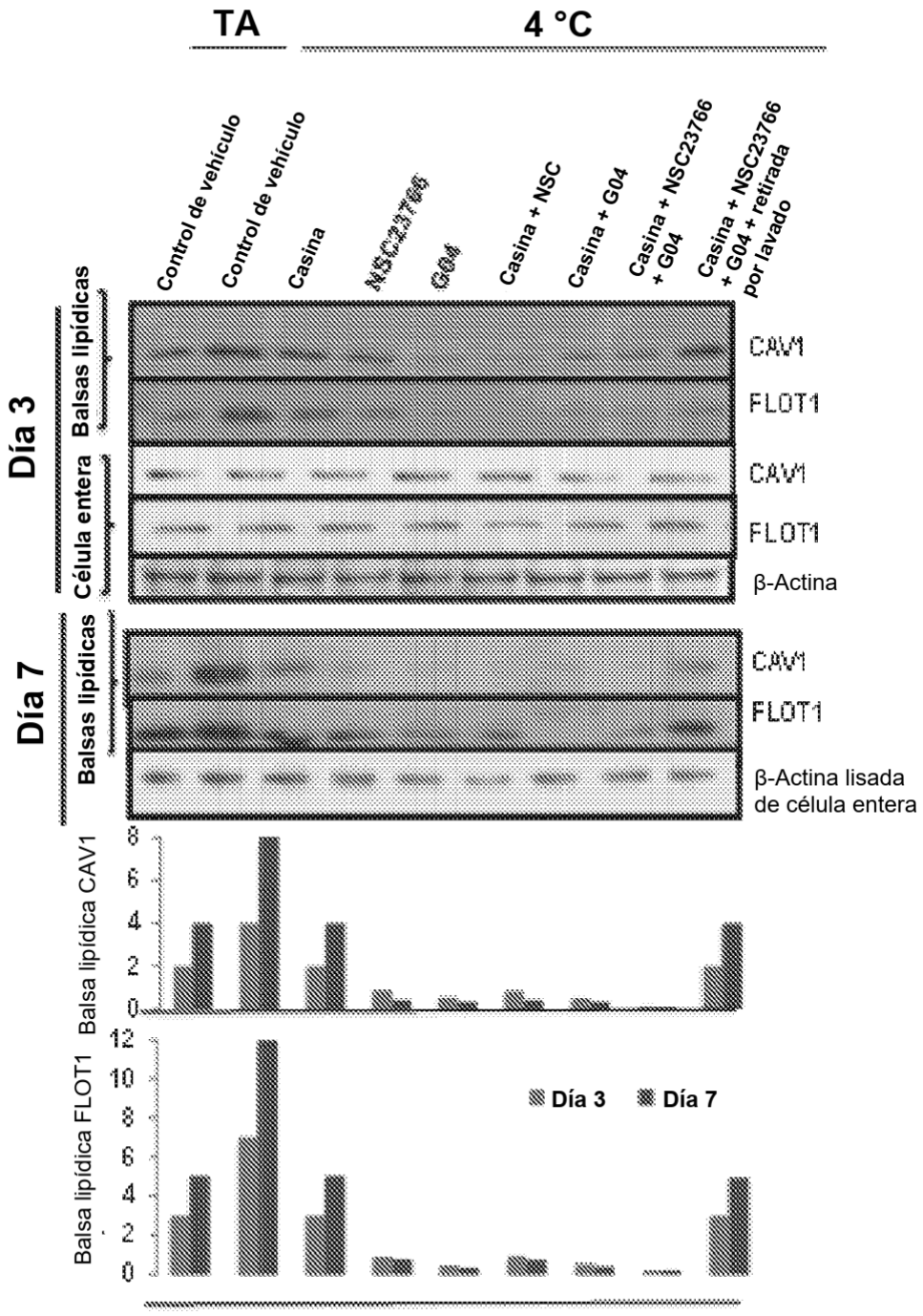
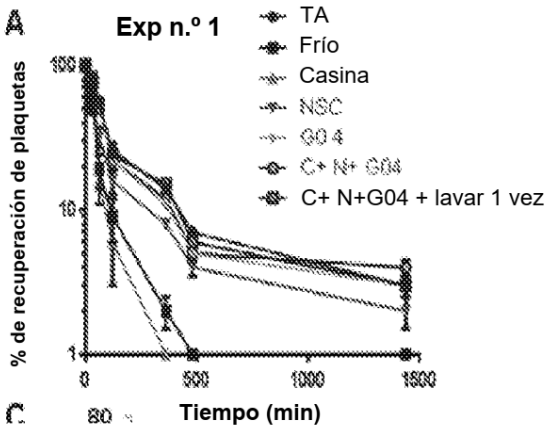
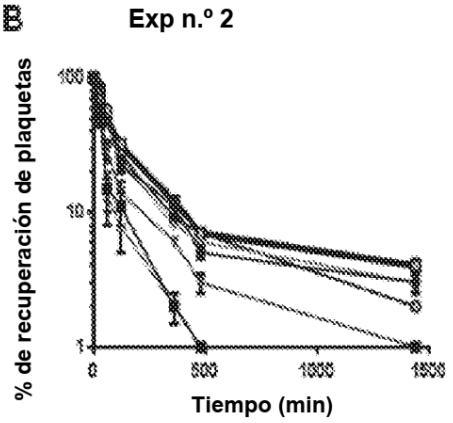

TA
4 °C
Control de vehículo
Control de vehículo
Casina
NSC23766
G04
Casina + NSC
Casina + G04
Casina + NSC23766 + G04
Casina + NSC23766 + G04 + retirada por lavado
Día 3
Balsas lipídicas
Célula entera
CAV1
FLOT1
CAV1
FLOT1
β-Actina
Día 7
Balsas lipídicas
CAV1
FLOT1
β-Actina lisada de célula entera
Balsa lipídica CAV1
Balsa lipídica FLOT1
Día 3
Día 7

FIG 10


A
Exp n.º 1
TA
Frío
Casina
NSC
G0 4
C+ N+ G04
C+ N+G04 + lavar 1 vez
% de recuperación de plaquetas
100
10
1
0
500
1000
1500
Tiempo (min)


B
Exp n.º 2
% de recuperación de plaquetas
100
10
1
0
500
1000
1500
Tiempo (min)

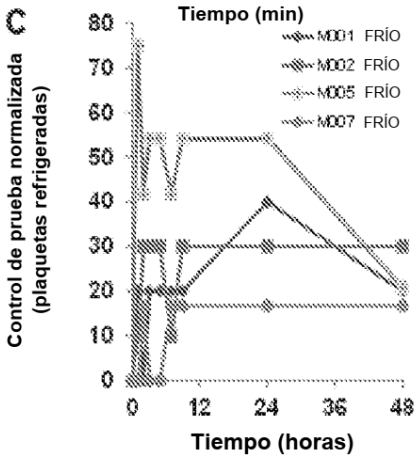

C
Tiempo (min)
M001 FRÍO
M002 FRÍO
M005 FRÍO
M007 FRÍO
Control de prueba normalizada (plaquetas refrigeradas)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
12
24
36
48
Tiempo (horas)

FIG 11

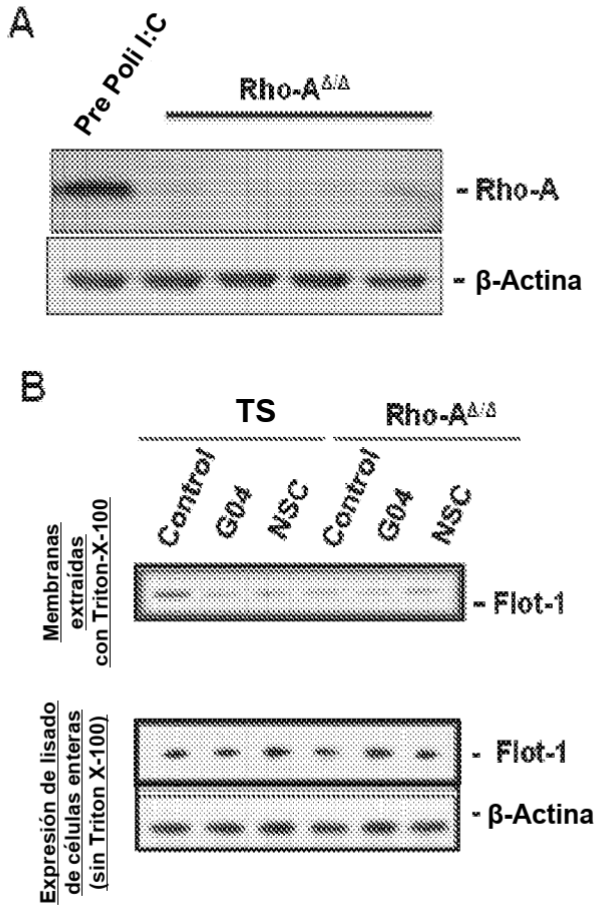
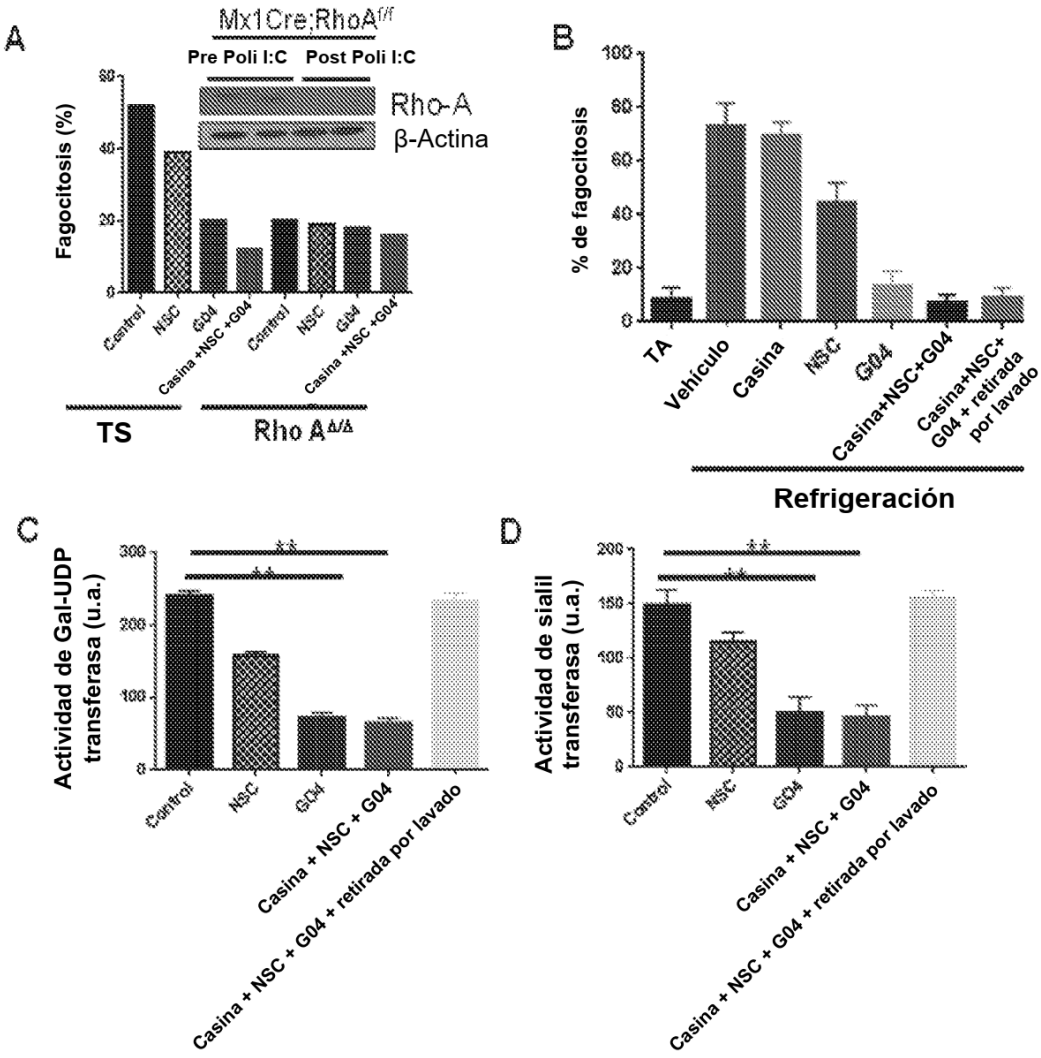

A
Pre Poli I:C
Rho-A$^{\Delta/\Delta}$
- Rho-A
- β-Actina
B
TS
Rho-A$^{\Delta/\Delta}$
Control
G04
NSC
Control
G04
NSC
Membranas extraídas con Triton-X-100
- Flot-1
Expresión de lisado de células enteras (sin Triton X-100)
- Flot-1
- β-Actina

FIG 12


A
Mx1Cre:RhoA f/f
Pre Poli I:C
Post Poli I:C
Rho-A
β-Actina
Fagocitosis (%)
Control
NSC
G04
Casina +NSC +G04
TS
Rho A Δ/Δ
B
% de fagocitosis
TA
Vehículo
Casina
NSC
G04
Casina+NSC+G04
Casina+NSC+ G04 + retirada por lavado
Refrigeración
C
Actividad de Gal-UDP transferasa (u.a.)
Control
NSC
G04
Casina + NSC + G04
Casina + NSC + G04 + retirada por lavado
D
Actividad de sialil transferasa (u.a.)
Control
NSC
G04
Casina + NSC + G04
Casina + NSC + G04 + retirada por lavado