



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 369 945**

② Número de solicitud: 201100867

⑤ Int. Cl.:

A61K 35/16 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **29.07.2011**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **09.12.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
09.12.2011

⑦ Solicitante/s: **Eduardo Anitua Aldecoa
Jacinto Quincoces, 39
01007 Vitoria, Araba/Álava, ES**

⑦ Inventor/es: **Anitua Aldecoa, Eduardo**

⑦ Agente: **Trigo Peces, José Ramón**

⑤ Título: **Procedimiento de obtención de una composición que contiene factores de crecimiento a partir de un compuesto sanguíneo, y composición obtenible por dicho procedimiento.**

⑤ Resumen:

Procedimiento de obtención de una composición que contiene factores de crecimiento a partir de un compuesto sanguíneo, y composición obtenible por dicho procedimiento.

Procedimiento de obtención de una composición que contiene factores de crecimiento, que comprende las fases de tratar térmicamente un compuesto sanguíneo que contiene factores de crecimiento para aumentar su temperatura de manera que se elimine el complemento y se reduzcan las inmunoglobulinas presentes en el mismo, de liofilizar el compuesto para conseguir una composición final seca de fácil transporte, manipulación y conservación que facilita los tratamientos periódicos o crónicos con compuestos sanguíneos. Se ha comprobado que, una vez re-suspendida la composición final seca, se obtiene una composición nuevamente húmeda que conserva intactas sus propiedades biológicas.

ES 2 369 945 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de una composición que contiene factores de crecimiento a partir de un compuesto sanguíneo, y composición obtenible por dicho procedimiento.

5

Sector de la técnica

La invención se refiere a un procedimiento de obtención de una composición que contiene factores de crecimiento, con la presencia o no de componentes celulares hemáticos (plaquetas, eritrocitos y glóbulos blancos), a partir de un compuesto sanguíneo, y a la composición que contiene factores de crecimiento obtenible por medio de dicho procedimiento.

10

Estado de la técnica

15

En el estado de la técnica es conocida de forma muy extensa la preparación de compuestos sanguíneos que contienen factores de crecimiento, obtenidos a partir de la sangre de un paciente. Dichos compuestos sanguíneos con o factores de crecimiento han demostrado ofrecer propiedades biológicas muy importantes, especialmente relacionadas con el desencadenamiento y favorecimiento de la regeneración de tejidos, la disminución del dolor en cierto tipo de dolencias y enfermedades, y otras múltiples utilidades.

20

A modo de ejemplo, la solicitud de patente WO0044314A1, a favor del propio solicitante, se refiere a un método de preparación de un gel de plasma sanguíneo autólogo, rico en factores de crecimiento, a partir de la propia sangre del paciente, procedimiento que ha sido actualizado en la más reciente solicitud de patente WO2010130851A2, también a favor del propio solicitante. Ambos procedimientos comparten pasos comunes como son el centrifugado de la sangre del paciente, la separación de plasma rico en plaquetas y la adición de cloruro de calcio al plasma rico en plaquetas para producir la activación del plasma (la liberación de factores de crecimiento por parte de las plaquetas contenidas en el plasma) y para producir la coagulación del mismo hasta que el plasma adquiere una consistencia similar a un gel.

25

También se conoce, por medio de la patente ES2221770B2 un procedimiento de preparación de otro compuesto sanguíneo rico en factores de crecimiento y con propiedades biológicas muy beneficiosas, en este caso en forma líquida. Concretamente, se trata de un sobrenadante de un plasma sanguíneo rico en factores de crecimiento, obtenido a partir de la fase líquida sobrenadante que aparece tras provocar la coagulación y una posterior retracción de dicho plasma rico en factores de crecimiento. En esta patente se describen además diversos usos del sobrenadante, entre los cuales destaca su uso (favorecido por su consistencia líquida) como colirio para el tratamiento de enfermedades o dolencias oculares.

30

Un gel de plasma que contenga en factores de crecimiento, un sobrenadante o, en general, cualquier compuesto sanguíneo autólogo preparado según métodos conocidos en el estado del arte, independientemente de la aplicación para la cual vaya a utilizarse, presenta el inconveniente de que necesita ser aplicado de forma inmediata para no perder sus propiedades biológicas. Esta necesidad es especialmente crítica si el compuesto sanguíneo contiene factores de crecimiento liberados. Así, los compuestos sanguíneos no están preparados para aguantar a temperatura ambiente largos periodos de tiempo y se recomienda su aplicación inmediata (en el caso de un sobrenadante, en no más de ocho horas desde su preparación) para evitar la degradación y desnaturalización de las proteínas y factores de crecimiento o la posible contaminación bacteriana del producto.

35

La inmediatez de uso de los compuestos sanguíneos autólogos no ha sido limitante hasta la fecha ya que las aplicaciones para las cuales han sido utilizados (regeneración de tejidos, cultivo de células, aplicaciones agudas o incluso semanales o quincenales, etc.) han sido compatibles con dicha inmediatez. Sin embargo, en la actualidad están surgiendo posibles nuevas aplicaciones de los compuestos sanguíneos autólogos que contienen factores de crecimiento, que exigen infiltraciones o aplicaciones continuas del compuesto, con un intervalo entre dosificaciones relativamente breve. Los compuestos sanguíneos autólogos (gel, sobrenadante, etc.) tal como son conocidos en la actualidad, exigirían que para estas nuevas aplicaciones se estuviera extrayendo sangre continuamente al paciente, repercutiendo muy negativamente en la calidad de vida del mismo y en la factibilidad de tratamientos a largo plazo para patologías crónicas o degenerativas.

50

55

Ejemplos de patologías crónicas o degenerativas que podrían ser tratadas con un compuesto sanguíneo que contiene factores de crecimiento, pero que actualmente no lo son debido a la inmediatez de uso de los compuestos sanguíneos y a la imposibilidad de su conservación, son múltiples: patologías oculares, patologías del sistema nervioso central, patologías articulares degenerativas y en conjunto todas aquellas enfermedades o patologías que requieran la administración crónica o repetida del compuesto sanguíneo que contiene factores de crecimiento.

60

Entre las patologías enumeradas se encuentran, particularmente pero no solamente, las siguientes: el lupus eritematoso sistémico, que es una enfermedad autoinmune crónica que afecta al tejido conjuntivo y que se caracteriza por que produce una inflamación y un daño de tejidos mediados por el sistema inmunitario, específicamente debidos a la unión de anticuerpos a las células del organismo y al depósito de complejos antígeno-anticuerpo; el síndrome Sjögren, que es una enfermedad autoinmune sistémica que se caracteriza por afectar principalmente a las glándulas exocrinas y que conduce a la aparición de sequedad; la dermatomiositis, que es una enfermedad del tejido conectivo caracterizada

65

por la inflamación de los músculos y de la piel; la artritis reumatoide, la cual se trata de una enfermedad sistémica autoinmune caracterizada por provocar inflamación crónica, principalmente de las articulaciones, y que produce destrucción progresiva con distintos grados de deformidad e incapacidad funcional. Actualmente existen estudios que apuntan a que una composición sanguínea autóloga que contenga factores de crecimiento podría intervenir de forma muy satisfactoria en frenar todas estas patologías si pudiera ser aplicado de forma regular en el paciente.

La presente invención tiene como objetivo diseñar un procedimiento de obtención de una composición que contenga factores de crecimiento a partir de un compuesto sanguíneo que contiene factores de crecimiento, que permita obtener una composición capaz de ser conservada durante largos periodos de tiempo y transportada de manera sencilla, de forma que la composición resulte apta para ser aplicada no de forma inmediata sino en el momento que se desee o estime necesario. De esta manera, el procedimiento según la invención permitirá obtener una composición que podrá ser utilizada en planteamientos terapéuticos crónicos, de forma periódica, todo ello sin requerir constantes extracciones de sangre del paciente y por lo tanto mejorando la calidad de vida del mismo.

Es también objetivo de la presente invención que la composición obtenida mediante el procedimiento de la invención conserve intactas sus propiedades biológicas.

Es también objetivo de la presente invención que la composición obtenida mediante el procedimiento de la invención conserve unas propiedades biológicas mejoradas, especialmente indicadas para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

Descripción breve de la invención

Es objeto de la invención un procedimiento de obtención de una composición que contiene factores de crecimiento, con la presencia o no de componentes celulares hemáticos (plaquetas, eritrocitos y glóbulos blancos), que comprende varias fases.

En primer lugar, el procedimiento comprende la fase de disponer de un compuesto sanguíneo que contiene factores de crecimiento, liberados o no. El compuesto sanguíneo puede ser de muy diversos tipos: un gel de plasma rico en factores de crecimiento obtenido según la técnica de WO0044314A1, WO2010130851A2 u otra técnica aplicable; un sobrenadante obtenido como el componente líquido que aparece tras producir la coagulación y posterior retracción de un plasma sanguíneo, pudiendo dicho sobrenadante haber sido obtenido por ejemplo según la técnica detallada en la patente ES2221770B2; un suero sanguíneo; o, en general, cualquier compuesto sanguíneo que contenga factores de crecimiento. El compuesto sanguíneo puede contener o no componentes celulares hemáticos (plaquetas, eritrocitos y glóbulos blancos).

Posteriormente, el procedimiento según la invención comprende el paso de aplicar un tratamiento térmico al compuesto sanguíneo, durante el cual se aumenta la temperatura del mismo. El tratamiento térmico permite eliminar el complemento y reducir la presencia de algunas de las inmunoglobulinas más frecuentes en el compuesto sanguíneo que juegan un papel crítico en reacciones cruzadas desde un punto de vista inmunológico. Dicha eliminación o reducción considerable del complemento presente en el compuesto sanguíneo constituye una importantísima ventaja para la aplicabilidad del mismo a enfermedades del sistema inmune.

Adicionalmente, el procedimiento según la invención comprende una fase en la que se liofiliza el compuesto sanguíneo para conseguir una composición final prácticamente carente de humedad.

De acuerdo con la invención, los pasos de aplicar un tratamiento térmico al compuesto sanguíneo y de liofilizar el compuesto sanguíneo se realizan en orden indistinto, es decir, pueden realizarse en cualquier orden.

Adicionalmente, el procedimiento según la invención puede comprender el paso de filtrar el compuesto sanguíneo. Dicho paso se realiza antes de la liofilización (no necesariamente inmediatamente antes, ya que en caso de aplicarse el tratamiento térmico antes de efectuar la liofilización, el filtrado se realiza antes del tratamiento térmico).

El procedimiento de obtención de una composición a partir de un compuesto sanguíneo autólogo permite conseguir una composición final seca que presenta múltiples ventajas sobre el compuesto sanguíneo húmedo convencional. Una ventaja importante es que una composición seca es evidentemente más fácil de manejar y transportar que un compuesto húmedo (líquido, con consistencia de gel más o menos viscoso o con otra consistencia). Asimismo, al no contener agua, la composición seca puede mantenerse a temperatura ambiente e incluso conservarse de forma ilimitada, constituyendo un producto de larga estabilidad (gracias a lo cual puede aplazarse su uso y no ha de ser utilizado necesariamente de forma inmediata, una vez preparado). Adicionalmente, al no contener agua, la composición seca no tiene riesgo de sufrir contaminaciones. Otra ventaja de la composición seca es que puede recuperar rápidamente su estado original; para ello basta con re-suspender la misma en cualquier solvente isotónico que se emplee rutinariamente (por ejemplo agua), proceso que puede efectuarse *in situ*.

Una ventaja adicional de la composición seca según la invención es que, tal como se ha comprobado, una vez re-suspendida dicha composición para recuperar un estado húmedo y poder ser administrada, la composición re-suspendida conserva las propiedades biológicas que caracterizaban al compuesto sanguíneo húmedo antes de realizar

el procedimiento según la invención. Es decir, la composición re-suspendida sigue conservando una concentración análoga de factores de crecimiento con actividad biológica; además, los efectos inducidos por la composición seca una vez re-suspendida en la proliferación celular, la migración y quimiotaxis celular y en la síntesis auto y paracrina de factores de crecimiento son idénticos a los del compuesto sanguíneo húmedo. Esta conservación de propiedades biológicas se consigue gracias, entre otros motivos, a la adecuada temperatura a que es sometido el producto durante la ejecución del procedimiento según la invención. Por otra parte, debido a la baja temperatura utilizada en las diferentes fases del procedimiento, la pérdida de constituyentes volátiles comprendidos en el compuesto sanguíneo que pudiera producirse durante la ejecución del procedimiento es mínima. Las bajas temperaturas también permiten mantener un riesgo muy bajo de contaminación microbiana y que la preparación no sufra alteraciones desde un punto de vista enzimático (es ventajoso que las preparaciones que contienen enzimas, como es el caso del compuesto sanguíneo de la presente invención, se mantengan tratadas a bajas temperaturas para que no se vean dañadas).

Otro efecto extremadamente beneficioso de la invención es que la composición seca y, por lo tanto, la composición final re-suspendida son composiciones libres o con una presencia reducida de complemento, lo cual convierte la composición final re-suspendida en una composición particularmente óptima para tratar algunas enfermedades de naturaleza autoinmune.

Todo lo anterior permite que la composición seca pueda ser utilizada para tratamientos no inmediatos, por ejemplo para tratar de forma regular patologías crónicas y, particularmente, patologías crónicas de naturaleza autoinmune. Así, si la composición seca obtenida según la invención se almacena por ejemplo en dosis, el tratamiento crónico con la misma se convierte en un proceso muy sencillo: el paciente crónico puede llevar su dosis (por ejemplo en un envase) a cualquier lugar sin complicaciones ni temores; cuando desea administrarse la dosis, basta con que humedezca (re-suspenda) la misma y, una vez recuperada la consistencia húmeda original (líquida u otra), efectúe la aplicación de la forma aplicable.

Todas estas particularidades y ventajas asociadas a la composición obtenida mediante el procedimiento según la invención pueden resumirse en: una estabilidad óptima, una especial indicación para algunas patologías de naturaleza autoinmune; una solubilidad fácil, rápida y completa; una conservación ilimitada; una buena protección contra las influencias externas nocivas y una rápida disponibilidad de uso.

Es asimismo objeto de la invención una composición que contiene factores de crecimiento, comprendiendo o no componentes celulares hemáticos, obtenible por medio del procedimiento según la invención. Dicha composición presenta todas las ventajas descritas con anterioridad.

Descripción breve de las figuras

Los detalles de la invención se aprecian en las figuras que se acompañan, no pretendiendo éstas ser limitativas del alcance de la invención:

- La Figura 1 muestra una gráfica del número de keratocitos por centímetro cuadrado en tres córneas tratadas con sobrenadante de plasma líquido convencional, no sometido a tratamiento térmico, y con sobrenadante tratado térmicamente según la invención.

- La Figura 2 muestra una gráfica de los niveles de PDGF-AB en los sobrenadantes de tres donantes, antes y después de ser tratados térmicamente según la invención.

- La Figura 3 muestra los niveles del factor D del complemento en los sobrenadantes de tres donantes, antes y después de realizar sobre dichos sobrenadantes un tratamiento térmico de acuerdo con la invención.

- La Figura 4 muestra una gráfica del número de fibroblastos por centímetro cuadrado en tres córneas tratadas con sobrenadante de plasma líquido convencional, no sometido a tratamiento térmico, y con sobrenadante tratado térmicamente según la invención.

- La Figura 5 muestra una gráfica de la concentración de factores de crecimiento PDGF-AB y TGF- β 1 en un sobrenadante sin liofilizar y en un sobrenadante liofilizado según la invención.

- La Figura 6 muestra una gráfica de la concentración de factores de crecimiento VEGF y EGF en un sobrenadante sin liofilizar y en un sobrenadante liofilizado según la invención.

- La Figura 7 muestra una gráfica de la cantidad de fibroblastos conjuntivales contenida por centímetro cuadrado en tres sobrenadantes líquidos, antes y después de realizar un filtrado de los sobrenadantes.

- La Figura 8 muestra una gráfica de la concentración de factores de crecimiento TGF- β 1 en sobrenadante filtrado y sin filtrar.

- La Figura 9 muestra una gráfica de la concentración de factores de crecimiento IGF-I en sobrenadante filtrado y sin filtrar.

- La Figura 10 muestra una gráfica del número de células primarias procedentes de keratocitos corneales humanos (HCK) tras 72 horas de tratamiento con un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) convencional y con un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) filtrado, tratado térmicamente y liofilizado según la invención.

- La Figura 11 muestra una gráfica del número de células primarias procedentes de fibroblastos conjuntivales humanos corneales humanos (HCF) tras 72 horas de tratamiento con un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) convencional y con un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) filtrado, tratado térmicamente y liofilizado según la invención, el cual posteriormente ha sido re-suspendido.

- La Figura 12 muestra una gráfica de la concentración de células en un cultivo de células primarias de keratocitos corneales humanos (HCK) realizado en un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) convencional y en un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) filtrado, tratado térmicamente y liofilizado según la invención, el cual posteriormente ha sido re-suspendido.

- La Figura 13 muestra una gráfica de la concentración de células en un cultivo de células primarias de fibroblastos conjuntivales humanos (HCF) realizado en un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) convencional y en un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) filtrado, tratado térmicamente y liofilizado según la invención, el cual posteriormente ha sido re-suspendido.

Descripción detallada de la invención

Es objeto de la invención un procedimiento de obtención de una composición que contiene factores de crecimiento, con la presencia o no de componentes celulares hemáticos (plaquetas, eritrocitos y glóbulos blancos), que comprende las siguientes fases:

- a) Disponer de un compuesto sanguíneo que contiene factores de crecimiento, liberados o no, preparado según cualquier procedimiento de preparación aplicable. Un ejemplo de compuesto sanguíneo con factores de crecimiento liberados es aquel en el que, utilizando el agente que fuere (cloruro cálcico, trombina, sales de calcio, otros agentes que contengan iones divalente o combinaciones de los mismos, o cualquier otro sistema que active la coagulación), se ha liberado el contenido de factores de crecimiento de las plaquetas y se ha activado la cascada de coagulación, logrando un producto rico en proteínas y factores de crecimiento tanto plasmáticos como plaquetarios. El compuesto sanguíneo puede ser de muy diversos tipos: un gel de plasma rico en factores de crecimiento obtenido según la técnica de WO0044314A1, WO2010130851A2 u otra técnica aplicable; un sobrenadante obtenido como el componente líquido que aparece tras producir la coagulación y posterior retracción de un plasma sanguíneo, pudiendo dicho sobrenadante haber sido obtenido por ejemplo según la técnica detallada en la patente ES2221770B2; un suero sanguíneo; o, en general, cualquier compuesto sanguíneo que contenga factores de crecimiento en cualquier cantidad y que haya sido obtenido por cualquier procedimiento. El compuesto sanguíneo puede contener o no componentes celulares hemáticos (plaquetas, eritrocitos y glóbulos blancos).
- b) Aplicar un tratamiento térmico al compuesto sanguíneo, de manera que se consigue eliminar el complemento y reducir la presencia de algunas de las inmunoglobulinas más frecuentes del compuesto sanguíneo que juegan un papel crítico en reacciones cruzadas desde un punto de vista inraunológico. Dicha eliminación o reducción considerable del complemento presente en el compuesto sanguíneo constituye una importantísima ventaja para la aplicabilidad del mismo a enfermedades del sistema inmune. Así, se sabe que la presencia del sistema de complemento de un compuesto sanguíneo pudiera ser perjudicial ya que está implicado en la sobre-estimulación del sistema inmune y en muchos casos en la propia sintomatología de la enfermedad que se pretende tratar con el compuesto sanguíneo. El complemento del plasma está relacionado con diversas alteraciones tales como posibles reacciones adversas de enfermedades autoinmunes (Lupus eritematoso, artritis, etc.) mediadas por complemento (vía clásica del complemento) o reacciones adversas derivadas de enfermedades inflamatorias crónicas mediadas por complemento. Además, parte de los factores del complemento potencian la inflamación y la fagocitosis y actúan produciendo la lisis de células y microorganismos. Por su parte, las inmunoglobulinas (Ig) y más concretamente la IgG es la más presente en el compuesto sanguíneo y entre sus principales funciones biológicas destacan la fijación del complemento, la unión a receptores para Fe en células fagocíticas al opsonizar partículas durante la fagocitosis y la unión a receptores en células NK durante la citotoxicidad mediada por anticuerpos. Por lo tanto, la eliminación o reducción considerable del complemento presente en el compuesto sanguíneo constituye una importantísima ventaja para la aplicabilidad del mismo a enfermedades del sistema inmune. Gracias al tratamiento térmico se puede lograr, entonces, una composición final adaptada a las necesidades de pacientes con problemas del sistema inmune. Además, se ha comprobado que el tratamiento térmico no altera la presencia de factores de crecimiento y proteínas en el compuesto sanguíneo ni modifica o reduce la funcionalidad y potencialidad del mismo. Por su parte, la reducción total o parcial de las inmunoglobulinas resulta importante en pacientes con enfermedades auto-inmunes ya que diferentes IgG participan en algunos de los procesos agudos de rechazo y por lo tanto reducir su presencia en la formulación ayuda a tratar distintos tejidos en estos pacientes sin riesgos de rechazo o reacción inmune aguda alguna.

ES 2 369 945 A1

- c) Liofilizar el compuesto sanguíneo, para eliminar casi en su totalidad el contenido en agua del mismo y permitir que el compuesto sanguíneo pase a un estado de no humedad que permite su conservación durante largos periodos de tiempo.

5 La liofilización preferentemente se realiza sin la adición de coadyuvantes (azúcares tales como la trehalosa, componentes químicos, etc.). Los coadyuvantes son necesarios para liofilizar muchas sustancias, pero se ha comprobado que el compuesto sanguíneo consigue liofilizarse correctamente sin ellos y que realizando la liofilización sin añadir ningún coadyuvante se consigue una composición seca final (y por lo tanto una composición re-suspendida para aplicar al paciente) más biocompatible. Por ejemplo, algunos estudios realizados han demostrado que algunos coadyuvantes como la trehalosa actúan negativamente sobre la proliferación celular.

15 El procedimiento presenta la particularidad, además, de que en principio los pasos de aplicar un tratamiento térmico al compuesto sanguíneo y de liofilizar el compuesto sanguíneo se pueden realizar en orden indistinto. Sin embargo, se considera preferente el orden según el cual el paso de aplicar un tratamiento térmico al compuesto sanguíneo se realiza antes del paso de liofilizar el compuesto sanguíneo. Este orden preferente obedece a que el producto, al ser tratado térmicamente con anterioridad, contendrá todas las propiedades y potencialidad que se pretenden con este proceso (reducción del complemento e IgG) antes de ser liofilizado. Hay que tener en cuenta que la liofilización se realiza con el ánimo de mejorar la conservación y mantenimiento del preparado por lo tanto es preferente que constituya la etapa final y no la inicial. Por lo tanto, en resumen, primero se pretende optimizar el producto y posteriormente desarrollar su proceso de conservación y mantenimiento.

25 El tratamiento térmico puede ser cualquier tratamiento que permita elevar convenientemente la temperatura del compuesto sanguíneo, siendo preferente que se someta al compuesto sanguíneo a una temperatura superior a 37°C durante un tiempo igual o superior a 1 minuto (por ejemplo introduciendo el compuesto sanguíneo en un baño de agua a esta temperatura y durante este tiempo). Dado que la temperatura de 37°C es la temperatura corporal y la temperatura a la cual el complemento y las inmunoglobulinas ejercen su máxima actividad biológica, es preferente de acuerdo con la invención calentar el compuesto sanguíneo a una temperatura superior a dichos 37°C para conseguir eliminar alguno de los citados componentes.

30 De forma especialmente ventajosa, el compuesto sanguíneo se somete a una temperatura de entre 50 y 60°C (preferentemente a 56°C), ya que a esa temperatura se consigue optimizar la degradación de componentes del complemento y maximizar la protección de las proteínas y factores de crecimiento que componen el producto. Así, se ha comprobado que temperaturas inferiores a este rango no garantizan que durante la incubación se elimine del compuesto sanguíneo el complemento. Por otro lado, incubar con temperaturas superiores a 60-65°C produciría la desnaturalización de los factores de crecimiento y de las proteínas contenidas en el compuesto sanguíneo. Además, preferentemente se somete el compuesto sanguíneo a dicha temperatura durante entre 20 y 70 minutos (preferentemente entre 30 y 60 minutos) ya que a esos tiempos nuevamente se consigue optimizar la degradación de componentes del complemento y maximizar la protección de las proteínas y factores de crecimiento que componen el producto.

La fase de liofilización comprende preferentemente los pasos de:

- 45 - congelar el compuesto sanguíneo a una temperatura menor de 0°C durante igual o superior a 1 minuto;
- realizar un secado primario del compuesto sanguíneo a una temperatura menor o igual a 0°C y a alto vacío, durante un tiempo igual o superior a 1 minuto, de manera que la mayor parte del agua libre contenida en el compuesto sanguíneo pasa a vapor;
- 50 - opcionalmente, realizar un secado secundario del compuesto sanguíneo a una temperatura mayor o igual a 0°C y a alto vacío, durante un tiempo igual o superior a 1 minuto, de manera que permite finalmente eliminar las últimas trazas de vapor de agua, evaporando el agua no congelada contenida en el compuesto sanguíneo hasta conseguir una humedad final de menos del 1%;
- 55 - opcionalmente, realizar un secado terciario del compuesto a una temperatura mayor o igual a 0°C y a alto vacío, durante un tiempo igual o superior a 1 minuto, de manera que se elimine la humedad residual que haya quedado en el producto mediante evaporación y reducir su contenido de humedad, lo que mejorará la estabilidad del producto final.

60 De forma especialmente ventajosa, el compuesto sanguíneo se congela a una temperatura de entre -60 y -40°C (preferentemente a -50°C) durante un tiempo superior a 1 hora (preferentemente un tiempo superior a 2 horas) ya que fuera de este rango, especialmente si las temperaturas de congelación son inferiores, aumenta el riesgo de que el compuesto sanguíneo pierda sus propiedades biológicas como consecuencia de la congelación. Además, es conveniente congelar durante el tiempo mínimo de 1 hora para asegurar que el compuesto sanguíneo se congela de forma homogénea (la homogeneidad garantiza la estabilidad de la liofilización y que no se alteren las propiedades biológicas del producto).

ES 2 369 945 A1

A su vez, el secado primario se realiza de forma especialmente ventajosa a entre -60 y -40°C y entre 0,05 y 0,15 mBar (preferentemente a -50°C y 0,1 mBar). La utilización de rangos bajos de temperatura se realiza para asegurar que el producto está totalmente congelado durante el proceso de sublimación, así como para preservar las propiedades físicas, químicas, y biológicas del producto inicial, evitando la posible desnaturalización de proteínas del producto liofilizado. La duración concreta del proceso depende de la cantidad de producto a liofilizar y ha sido establecida para asegurar la total sublimación del hielo necesaria para un adecuado secado.

En cuanto al secado secundario, éste se realiza de manera especialmente ventajosa a entre +15 y +25°C y entre 0,05 y 0,15 mBar (preferentemente a +20°C y 0,1 mBar) ya que estas condiciones permiten eliminar la humedad residual que haya quedado en el producto mediante evaporación y reducir su contenido de humedad por debajo del 1% con objeto de mejorar la estabilidad del producto final.

Finalmente, el secado terciario se realiza de manera especialmente ventajosa a entre +15 y +25°C y vacío total (preferentemente a +20°C y vacío total), logrando eliminar finalmente toda humedad, lo que proporcionará las óptimas características de estabilidad y uniformidad del producto final.

El procedimiento según la invención puede comprender, además, el paso adicional de filtrar el compuesto sanguíneo para eliminar o evitar la aparición de componentes de alto peso molecular, agregados plaquetarios o restos de fibrina que pudieran alterar la uniformidad del congelado y la estabilidad del liofilizado, lo que repercutiría también negativamente en la re-suspensión de la composición seca (téngase en cuenta que la velocidad de disolución de un liofilizado es inversamente proporcional al tamaño de las partículas que lo constituyen y que partículas gruesas comprendidas en la composición seca podrían producir que la disolución de la composición seca fuera más lenta o simplemente nula). En caso de realizarse, dicho paso adicional de filtrar el compuesto sanguíneo se ejecuta antes de la liofilización, aunque no necesariamente inmediatamente antes. El paso de filtrar el compuesto sanguíneo podrá no ser necesario, por ejemplo, cuando se disponga al comienzo del procedimiento de un compuesto sanguíneo ya filtrado.

Ejemplo de procedimiento

A continuación se describe un ejemplo de procedimiento de preparación de una composición final re-suspendida a partir de una composición seca obtenida a su vez según el procedimiento de la invención y a partir de un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento.

En primer lugar, se prepara un plasma rico en factores de crecimiento a partir de sangre extraída de un paciente, centrifugando en primer lugar la misma para separar la sangre en diferentes fracciones, como es conocido en el estado de la técnica. Entonces, se extrae la fracción de plasma mediante un dispositivo PTD (por sus siglas en inglés "Plasma Transfer Device") a un tubo de fraccionamiento de 9 ml y se procede a activar el plasma; la activación se realiza estimando el volumen de plasma contenido en el tubo de fraccionamiento y añadiendo posteriormente 50 µl de PRGF® Activator por cada mililitro de plasma. La activación del plasma equivale a la liberación de factores de crecimiento por parte de las plaquetas contenidas en el plasma.

En segundo lugar, se obtiene el sobrenadante a partir del plasma rico en factores de crecimiento. Para ello, el plasma rico en factores de crecimiento, ya activado, se incuba en bloque de calor a 37°C entre 1 hora y hora y media hasta la completa retracción del coágulo de fibrina. Posteriormente, el tubo de fraccionamiento se centrifuga a 1000 g durante 10 minutos con dos finalidades principales: precipitar el coágulo de fibrina formado, y extraer lo máximo posible el volumen de sobrenadante que podría quedar retenido en el interior del coágulo. Entonces, los tubos centrifugados se introducen en una cabina de flujo laminar, donde pueden ser abiertos para mantener la completa esterilidad de la muestra. Con una jeringuilla de 10 ml a la que se ha acoplado una aguja intramuscular roma, se recoge todo el sobrenadante liberado. Posteriormente, se retira la aguja roma de la jeringuilla y se acopla un filtro de PVDF de 0,22 µm, y se procede a la filtración del sobrenadante. Durante el proceso de filtración, la jeringa con el filtro se conecta a los dispensadores multidosis, administrando 1 ml de sobrenadante filtrado por dispositivo. Finalmente, los dispositivos se cierran herméticamente.

A continuación se ejecuta el procedimiento según la invención, para obtener una composición final seca a partir del sobrenadante líquido filtrado. Así, los dispositivos multidosis, con el sobrenadante filtrado en su interior, son tratados térmicamente, introduciéndose en un baño de agua precalentado previamente a 56°C y durante entre 30 a 60 minutos. Tras este periodo, se introducen inmediatamente en un liofilizador previamente enfriado a -50°C para proceder a su congelación donde se mantendrán en un rango de tiempo de entre 2 y 8 horas según el volumen de sobrenadante hasta que las muestras se encuentren congeladas de forma homogénea. Posteriormente, se realiza un secado primario a -50°C y 0,1 mBar durante como máximo 24 h. Seguidamente, se realiza un secado secundario a +20°C y 0,1 mBar durante máximo 6 h y finalmente se realiza un secado terciario a +20°C y vacío total durante como máximo 12 h. El producto resultante es un polvo uniforme y homogéneo que aparece ligeramente compactado y que se puede re-suspender (es decir, diluir volviendo a su consistencia de sobrenadante) tras contacto con una solución acuosa de manera rápida y sencilla.

La composición final seca debe ser re-suspendida para poder ser aplicada. Para ello, el médico o el paciente toma una dosis de composición final seca y la sumerge en un volumen determinado de agua destilada estéril dentro de

un contenedor, agitando posteriormente el contenedor hasta conseguir la completa disolución la composición seca y la obtención de una composición final nuevamente húmeda o líquida que conserva las propiedades biológicas del sobrenadante húmedo inicial, previo al tratamiento térmico y la liofilización. Dicha composición final puede entonces ser directamente aplicada al paciente, por ejemplo como colirio en los ojos.

5

Resultados experimentales

10 A continuación se describen los resultados de tres estudios experimentales realizados sobre el procedimiento y la composición según la invención, efectuado y obtenida respectivamente a partir de un sobrenadante de plasma sanguíneo rico en factores de crecimiento. Se detallan asimismo las conclusiones técnicas alcanzadas a partir de dichos resultados.

15 1. *Influencia de la temperatura del tratamiento térmico sobre el efecto biológico y los niveles de factores de crecimiento del sobrenadante seco final*

Como se ha mencionado, el tratamiento térmico realizado por la presente invención a temperaturas adecuadas permite conservar las propiedades biológicas del sobrenadante, es decir, que la composición seca final presente sustancialmente las mismas propiedades que el sobrenadante líquido inicial.

20 Pues bien, tras realizarse una experimentación sobre córnea, se ha comprobado que el proceso de tratamiento térmico (baño de agua a 56°C durante 30 minutos) no afecta a su efecto biológico sobre la proliferación de fibroblastos de córnea y conjuntiva ni de células epiteliales corneales. La multiplicación de dichas células en cultivo *in vitro* es similar en el caso del sobrenadante no tratado térmicamente. Así, en la Figura 1, que muestra el número keratocitos por centímetro cuadrado en tres córneas tratadas con sobrenadante de plasma líquido convencional, no sometido a tratamiento térmico, y con sobrenadante tratado térmicamente según la invención, se puede observar que la proliferación de fibroblastos de córnea (keratocitos) es prácticamente la misma en respuesta al sobrenadante de plasma líquido convencional, no sometido a tratamiento térmico que al sobrenadante tratado térmicamente según la invención. Lo mismo ocurre en el caso de los fibroblastos conjuntivales y las células epiteliales corneales estudiadas.

25 También se han analizado los niveles de factores de crecimiento presentes en los sobrenadantes líquidos convencionales y en sobrenadantes tratados térmicamente según la invención. Se ha comprobado que, en el caso de factores plaquetarios como el PDGF-AB o el TGF- β 1, el tratamiento térmico no afecta a sus niveles medidos en el sobrenadante final. Por otra parte, se ha comprobado que factores de crecimiento plasmáticos analizados como el IGF-I no varían su concentración por efecto de la temperatura mientras que otros agentes como las inmunoglobulinas G y M (IgG e IgM) presentan un 9% y un 13% de disminución respectivamente en sus valores. También se ha comprobado que el factor D del complemento desaparece totalmente cuando el sobrenadante es sometido a tratamiento técnico. Se pueden observar ejemplos de estos resultados en las siguientes figuras. Así, la Figura 2 muestra los niveles de PDGF-AB en los sobrenadantes de tres donantes, antes y después de realizar sobre dichos sobrenadantes un tratamiento térmico de acuerdo con la invención. Como puede observarse, dichos niveles se mantienen prácticamente constantes (en el primer sobrenadante descienden ligeramente, en el segundo se mantienen constantes y en el tercero aumentan ligeramente). Por otro lado, la Figura 3 muestra los niveles del factor D del complemento en los sobrenadantes de tres donantes, antes y después de realizar sobre dichos sobrenadantes un tratamiento térmico de acuerdo con la invención. Como puede observarse, en los sobrenadantes líquidos iniciales existe una presencia de factor D mientras que en los sobrenadantes tratados térmicamente no se detecta presencia alguna del mismo.

50 2. *Influencia del proceso de liofilización sobre el efecto biológico y los niveles de factores de crecimiento del sobrenadante*

Como se ha mencionado en esta descripción, el proceso de liofilización realizado por la presente invención permite conservar las propiedades biológicas del sobrenadante, es decir, que la composición seca final presente sustancialmente las mismas propiedades que el sobrenadante líquido inicial.

55

Durante la experimentación, se ha analizado el efecto del proceso de liofilización del sobrenadante de plasma sobre la proliferación de fibroblastos conjuntivales y keratocitos. Los resultados del análisis muestran que dicho tratamiento no afecta al crecimiento de dichos tipos celulares en ninguno de los tres sobrenadantes (de respectivos tres donantes) estudiados. Por ejemplo, en la Figura 4, que muestra el número de fibroblastos por centímetro cuadrado en tres córneas tratadas con sobrenadante de plasma líquido convencional, no sometido a tratamiento térmico, y con sobrenadante tratado térmicamente según la invención, se observa que la presencia de fibroblastos se mantiene relativamente constante (en el primer sobrenadante descienden ligeramente, en el segundo aumentan ligeramente y en el tercero descienden ligeramente).

65 También se han analizado los niveles de factores de crecimiento presentes en los sobrenadantes líquidos convencionales y en sobrenadantes liofilizados según la invención. Se ha comprobado que los niveles de factores de crecimiento analizados no varían tras el proceso de liofilización, tanto el caso de los factores plaquetarios como TGF- β 1, PDGF-AB, VEGF y EGF como en caso de factores plasmáticos como IGF-1 o factor D del complemento. A modo de ejem-

plo, la Figura 5 muestra la concentración de factores de crecimiento PDGF-AB y TGF- β 1 en un sobrenadante sin liofilizar y sin tratar térmicamente y en un sobrenadante liofilizado y tratado térmicamente según la invención; en ella se observa cómo la concentración de los primeros aumenta ligeramente, mientras que la concentración de los segundos disminuye ligeramente, siendo la concentración de ambos en el producto final (sobrenadante liofilizado) en cualquier caso elevada. En la Figura 6 se muestran, análogamente, la concentración de factores de crecimiento VEGF y EGF en un sobrenadante sin liofilizar y sin tratar térmicamente y en un sobrenadante liofilizado y tratado térmicamente según la invención; en ella se observa cómo la concentración de ambos disminuye ligeramente, aunque se mantiene en valores elevados.

3. *Influencia del proceso de filtración sobre el efecto biológico y los niveles de factores de crecimiento del sobrenadante*

Se ha estudiado también si la filtración del sobrenadante pudiera conllevar algún efecto biológico indeseado en el mismo, o si por el contrario no afecta a sus propiedades biológicas.

Pues bien, los resultados obtenidos de los estudios *in vitro* muestran que el proceso de filtración del sobrenadante no modifica el efecto biológico que ejerce sobre la proliferación de células fibroblásticas y epiteliales de córnea y conjuntiva (fibroblastos conjuntivales, keratocitos y epiteliales corneales).

Por ejemplo, la Figura 7 muestra la cantidad de fibroblastos conjuntivales contenida por centímetro cuadrado en tres sobrenadantes líquidos, antes y después de realizar un filtrado de los sobrenadantes. Como puede observarse, la proliferación de fibroblastos conjuntivales en el sobrenadante filtrado es similar a la proliferación en el sobrenadante no filtrado.

Por su parte, los niveles de factores de crecimiento medidos en los sobrenadantes filtrados y no filtrados son muy similares para los tres sobrenadantes analizados (provenientes, como en todos los casos, de tres donantes diferentes). La Figura 8 muestra las concentraciones del factor de crecimiento TGF- β 1 en los sobrenadantes filtrados y sin filtrar, pudiendo comprobarse que dichas concentraciones no varían de forma importante por el hecho de filtrarse los sobrenadantes. Este hecho no se produce solamente en el caso de los factores de crecimiento contenidos en los gránulos alfa de las plaquetas (por ejemplo TGF- β 1, PDGF-AB, VEGF, EGF o TSP-1), sino que también se produce en el caso de factores de crecimiento presentes en el plasma como IGF-I (factor de crecimiento derivado de insulina tipo I) o la endostatina. La Figura 9 muestra, en este sentido, la concentración de factor de crecimiento IGF-I en el sobrenadante de tres donantes, antes y después de realizar un filtrado. Como puede observarse, el nivel de IGF-I se mantiene prácticamente constante en los tres casos.

4. *Influencia del procedimiento de la invención, comprendiendo los pasos de filtrar, tratar térmicamente y liofilizar el sobrenadante, sobre diversas propiedades del mismo*

La Figura 10 muestra una gráfica de la proliferación de células primarias procedentes de keratocitos corneales humanos (HCK) tras 72 horas de tratamiento con un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) convencional y con un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) filtrado, tratado térmicamente y liofilizado según la invención, el cual posteriormente ha sido re-suspendido. Como puede observarse, el número de células primarias es ligeramente mayor en el caso del sobrenadante obtenido según el procedimiento de la presente invención.

La Figura 11 muestra una gráfica de la proliferación de células primarias procedentes de fibroblastos conjuntivales humanos corneales humanos (HCF) tras 72 horas de tratamiento con un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) convencional y con un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) filtrado, tratado térmicamente y liofilizado según la invención, el cual posteriormente ha sido re-suspendido. Al igual que en la gráfica anterior, el número de células primarias es ligeramente mayor en el caso del sobrenadante obtenido según el procedimiento de la presente invención.

La Figura 12 muestra el efecto de la aplicación de un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) convencional y de un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) filtrado, tratado térmicamente y liofilizado según la invención, el cual posteriormente ha sido re-suspendido, sobre la migración del cultivo de células primarias de keratocitos corneales humanos (HCK). Como puede observarse, el número de células primarias es sólo ligeramente mayor en el caso de utilizarse como medio de cultivo un sobrenadante convencional.

La Figura 13 muestra el efecto de la aplicación de un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) convencional y de un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) filtrado, tratado térmicamente y liofilizado según la invención, el cual posteriormente ha sido re-suspendido, sobre la migración del cultivo de células primarias de fibroblastos conjuntivales humanos (HCF) tras realizar una incubación de células durante 24 horas. El comportamiento en ambos casos es, como puede comprobarse, muy similar, aunque es ligeramente mejor en el caso del sobrenadante obtenido según la invención.

ES 2 369 945 A1

En resumen, tras analizarse todas las gráficas con resultados experimentales, puede concluirse que el comportamiento y las propiedades la composición final re-suspendida son muy similares (con ligeras variaciones irrelevantes) a los del sobrenadante de aplicación inmediata convencional. Por lo tanto, se puede concluir que el hecho de filtrar, tratar térmicamente y liofilizar un sobrenadante húmedo para obtener un producto seco re-suspendible no afecta a las propiedades del producto y, por otra parte, proporciona las numerosas ventajas enumeradas en el presente documento.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 369 945 A1

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de obtención de una composición que contiene factores de crecimiento, que comprende las fases de:

- a) disponer de un compuesto sanguíneo que contiene factores de crecimiento, liberados o sin liberar,
- b) aplicar un tratamiento térmico al compuesto sanguíneo, en el cual el compuesto sanguíneo se somete a una temperatura entre 50 y 60°C durante un tiempo entre 20 y 70 minutos,
- c) liofilizar el compuesto sanguíneo,

15 donde los pasos de aplicar un tratamiento térmico al compuesto sanguíneo y de liofilizar el compuesto sanguíneo se realizan en orden indistinto.

20 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, que se **caracteriza** por que la liofilización del compuesto sanguíneo se realiza sin la adición de coadyuvantes.

3. Procedimiento, según la reivindicación 1, que se **caracteriza** por que el paso de aplicar un tratamiento térmico al compuesto sanguíneo se realiza antes del paso de liofilizar el compuesto sanguíneo.

25 4. Procedimiento, según la reivindicación 1, que se **caracteriza** por que: el compuesto sanguíneo se somete a una temperatura de 56°C durante un tiempo entre 30 y 60 minutos.

5. Procedimiento, según la reivindicación 1, que se **caracteriza** por que el paso de liofilizar comprende los pasos de:

- congelar el compuesto sanguíneo a una temperatura menor que 0°C durante un tiempo igual o superior a 1 minuto,
- realizar un secado primario del compuesto sanguíneo a una temperatura menor o igual a 0°C y a alto vacío, durante un tiempo igual o superior a 1 minuto.

35 6. Procedimiento, según la reivindicación 5, que se **caracteriza** por que:

- la congelación del compuesto sanguíneo se realiza a una temperatura entre -60 y -40°C durante un tiempo superior a 1 hora,
- el secado primario del compuesto sanguíneo se realiza a una temperatura entre -60 y -40°C y a una presión entre 0,05 y 0,15 mBar.

45 7. Procedimiento, según la reivindicación 6, que se **caracteriza** por que:

- la congelación del compuesto sanguíneo se realiza a una temperatura de -50°C durante un tiempo superior a 2 horas,
- el secado primario del compuesto sanguíneo se realiza a una temperatura de -50°C y a una presión de 0,1 mBar.

55 8. Procedimiento, según la reivindicación 5, que se **caracteriza** por que el paso de liofilizar comprende el paso adicional de:

- realizar un secado secundario del compuesto sanguíneo a una temperatura mayor o igual a 0°C y a alto vacío, durante un tiempo igual o superior a 1 minuto.

60 9. Procedimiento, según la reivindicación 8, que se **caracteriza** por que:

- el secado secundario del compuesto sanguíneo se realiza a una temperatura entre +15 y +25°C y a una presión entre 0,05 y 0,15 mBar.

ES 2 369 945 A1

10. Procedimiento, según la reivindicación 9, que se **caracteriza** por que:

- el secado secundario del compuesto sanguíneo se realiza a una temperatura de +20°C y a una presión de 0,1 mBar.

5

11. Procedimiento, según la reivindicación 8, que se **caracteriza** por que comprende el paso adicional de:

- realizar un secado terciario del compuesto sanguíneo a una temperatura mayor o igual a 0°C y a alto vacío, durante un tiempo igual o superior a 1 minuto.

10

12. Procedimiento, según la reivindicación 11, que se **caracteriza** por que:

- el secado terciario del compuesto sanguíneo se realiza a una temperatura entre +15 y +25°C y en vacío total.

15

13. Procedimiento, según la reivindicación 12, que se **caracteriza** por que:

- el secado terciario del compuesto sanguíneo se realiza a una temperatura de +20°C y en vacío total.

20

14. Procedimiento, según la reivindicación 1, que se **caracteriza** por que comprende el paso adicional de filtrar el compuesto sanguíneo, el cual se realiza antes de la liofilización.

25

15. Procedimiento, según la reivindicación 1, que se **caracteriza** por que el compuesto sanguíneo que contiene factores de crecimiento es un sobrenadante de plasma sanguíneo.

30

16. Procedimiento, según la reivindicación 1, que se **caracteriza** por que el compuesto sanguíneo que contiene factores de crecimiento es un gel de plasma sanguíneo.

17. Procedimiento, según la reivindicación 1, que se **caracteriza** por que el compuesto sanguíneo que contiene factores de crecimiento es un suero sanguíneo.

35

18. Procedimiento, según la reivindicación 1, que se **caracteriza** por que el compuesto sanguíneo no comprende ningún componente celular hemático.

19. Procedimiento, según la reivindicación 1, que se **caracteriza** por que el compuesto sanguíneo comprende algún componente celular hemático.

40

20. Composición que contiene factores de crecimiento, obtenible según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.

45

50

55

60

65

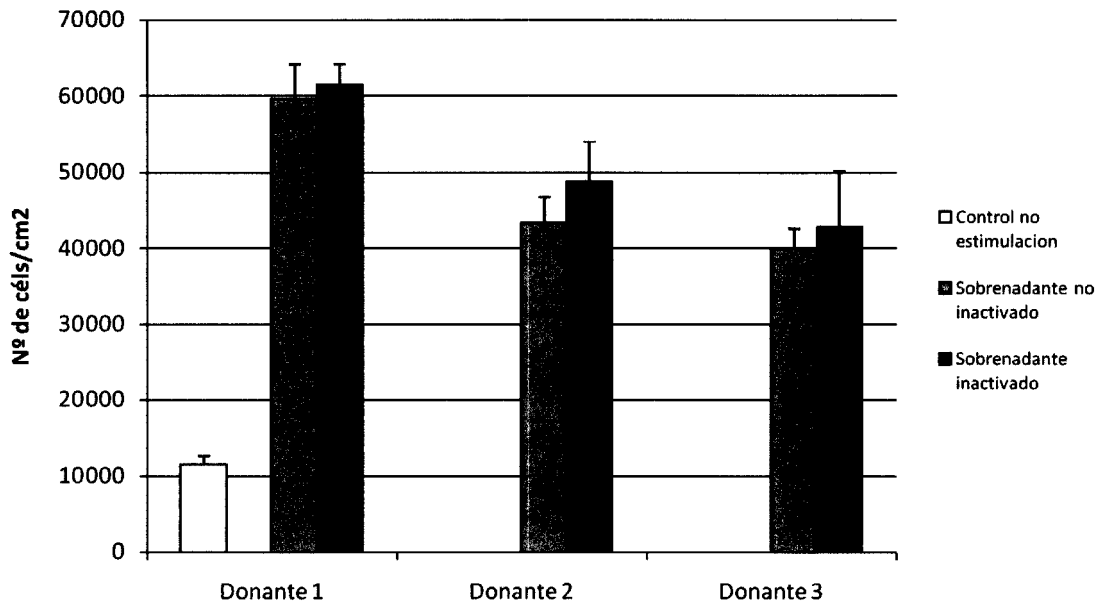


FIG.1

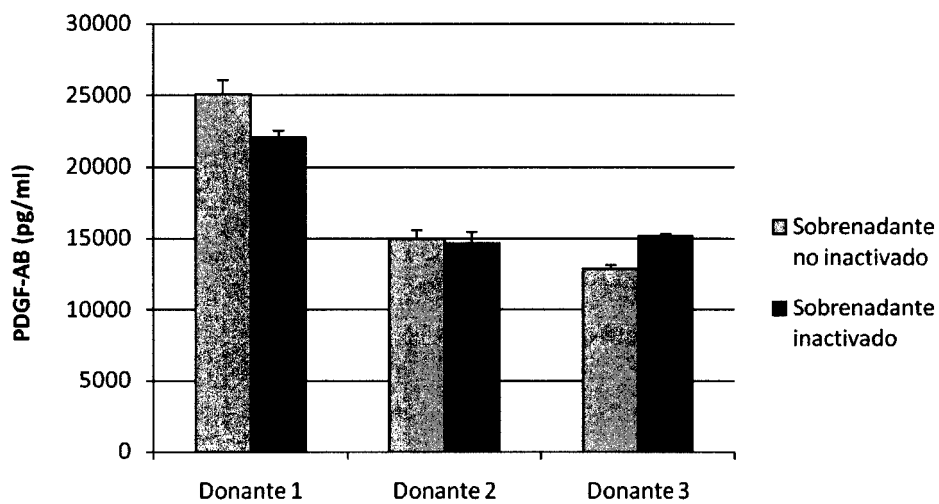


FIG.2

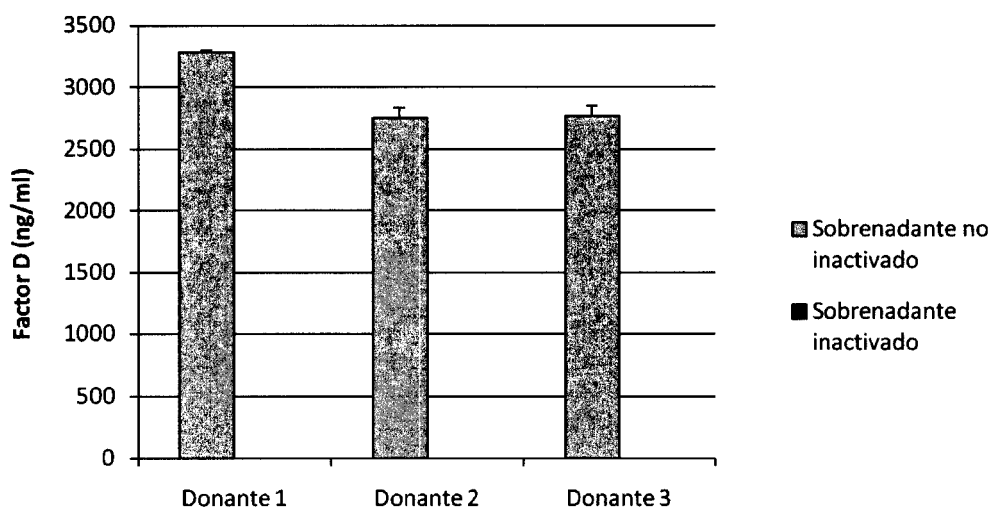


FIG.3

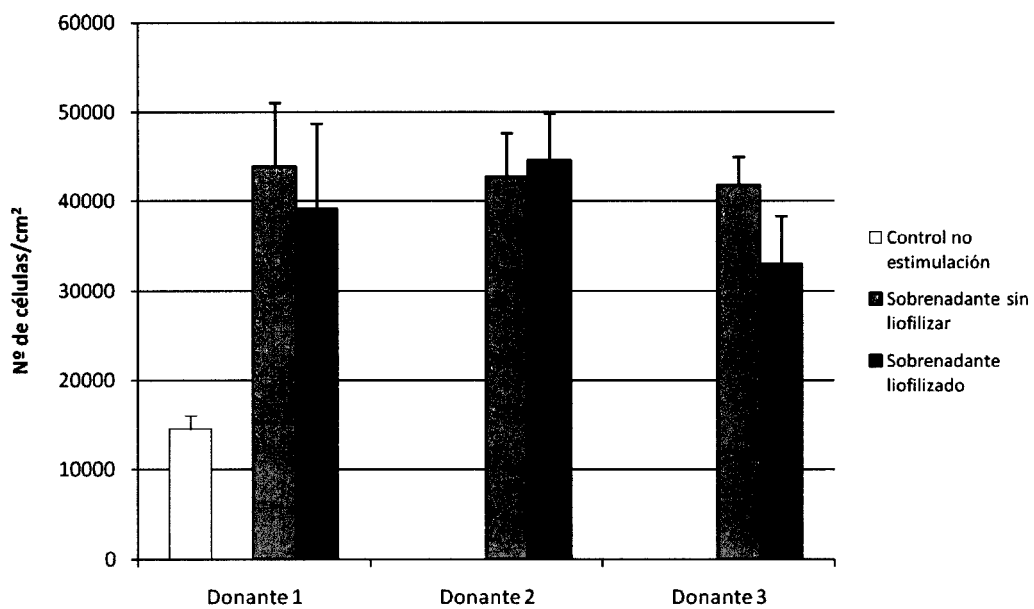


FIG.4

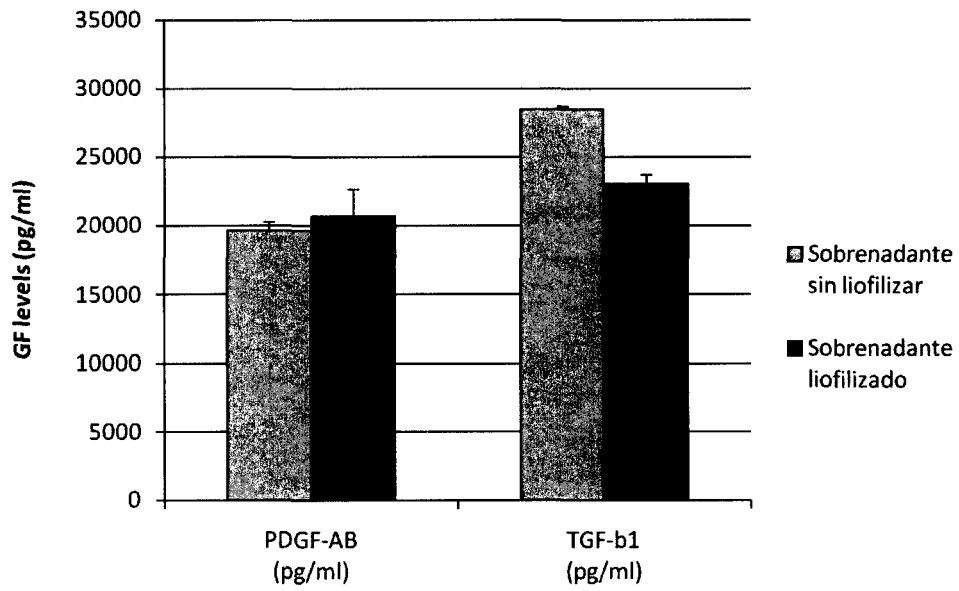


FIG.5

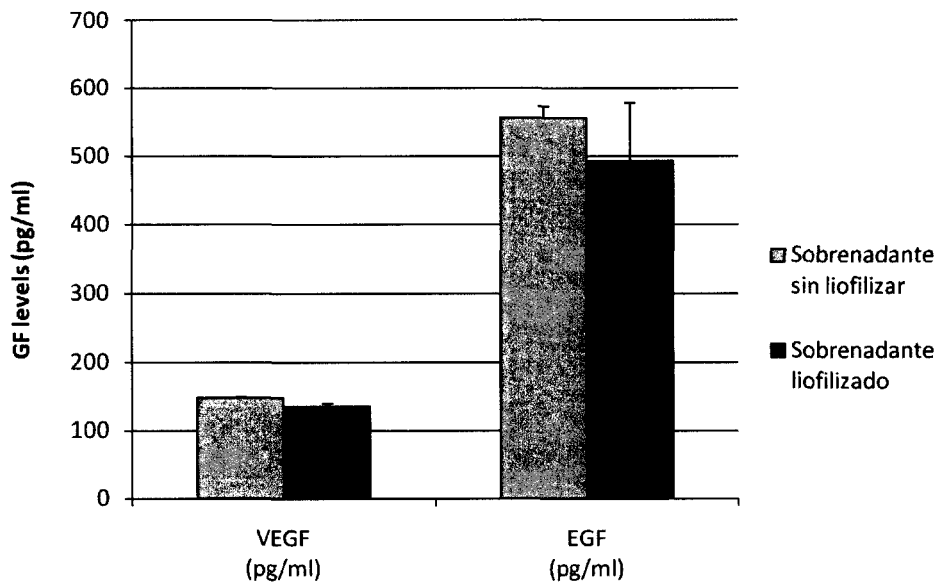


FIG.6

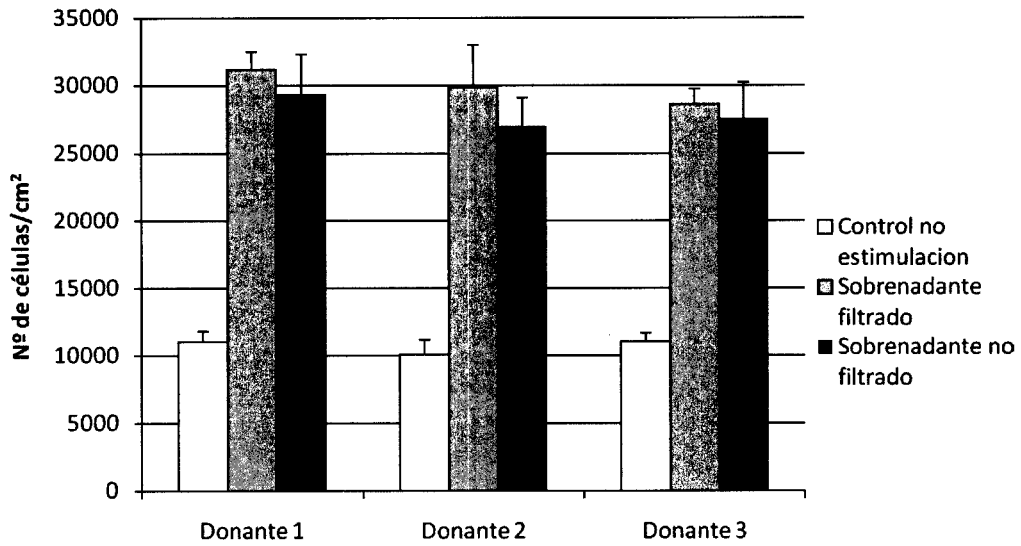


FIG.7

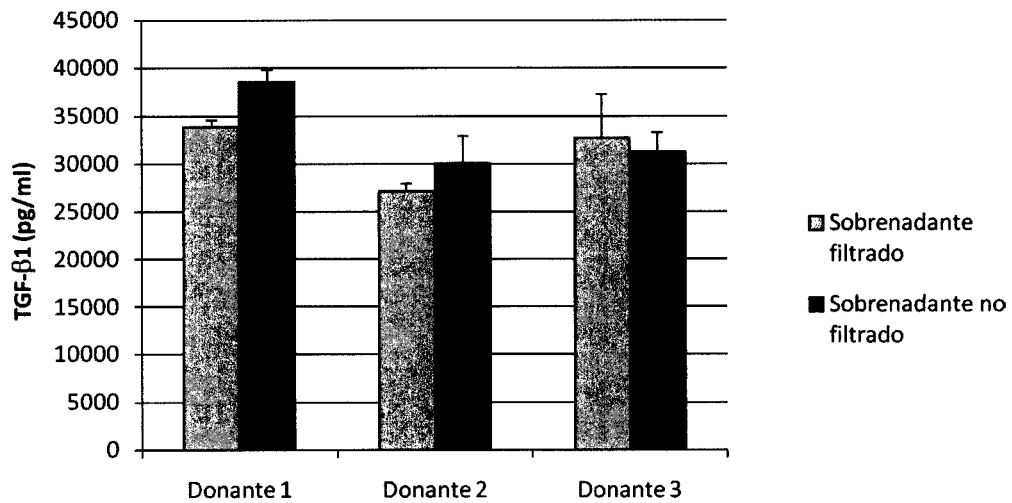


FIG.8

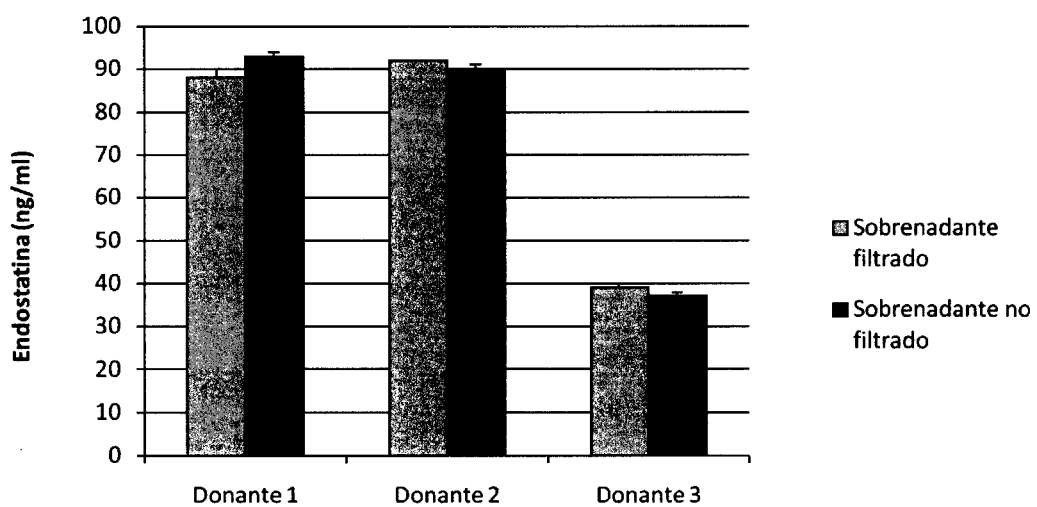


FIG.9

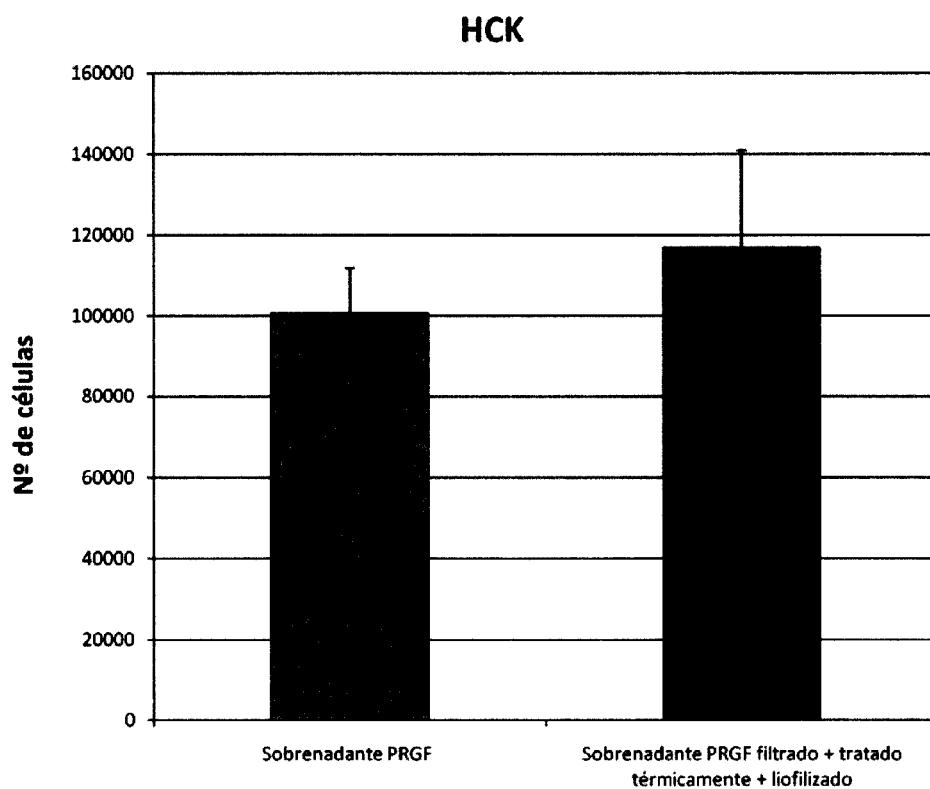


FIG.10

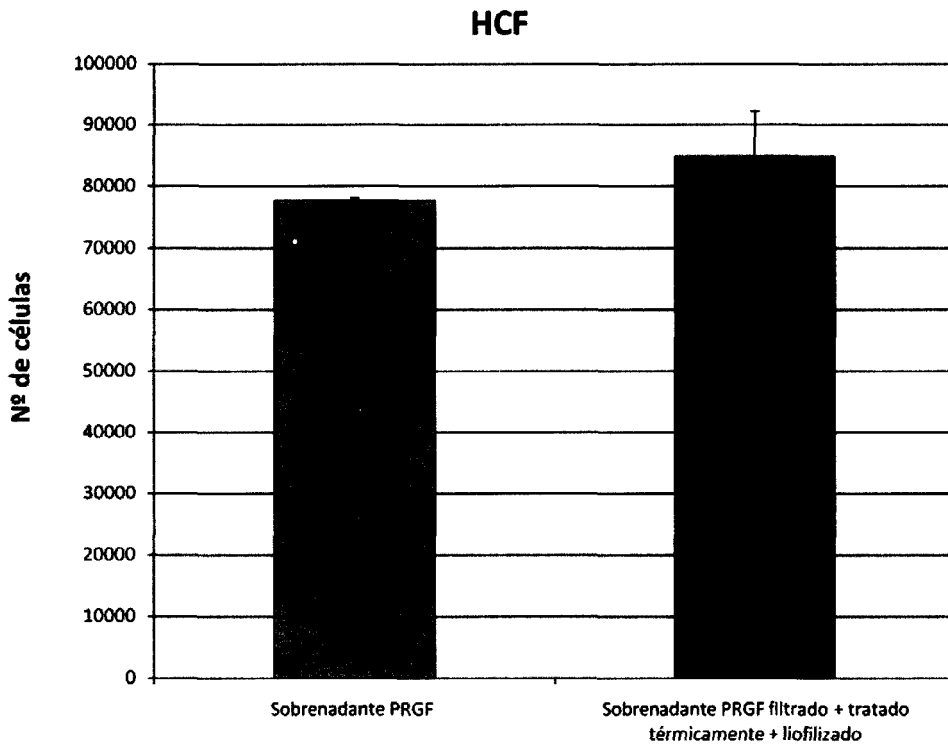


FIG.11

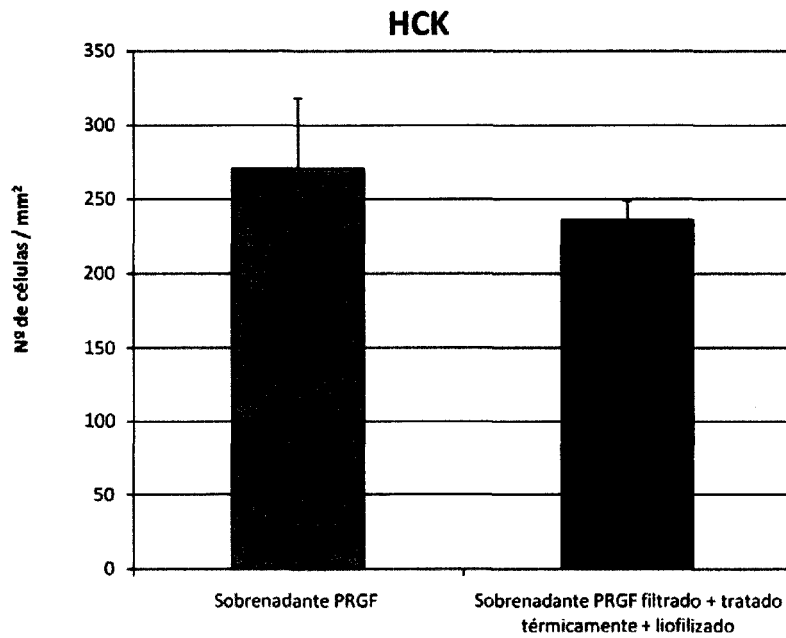


FIG.12

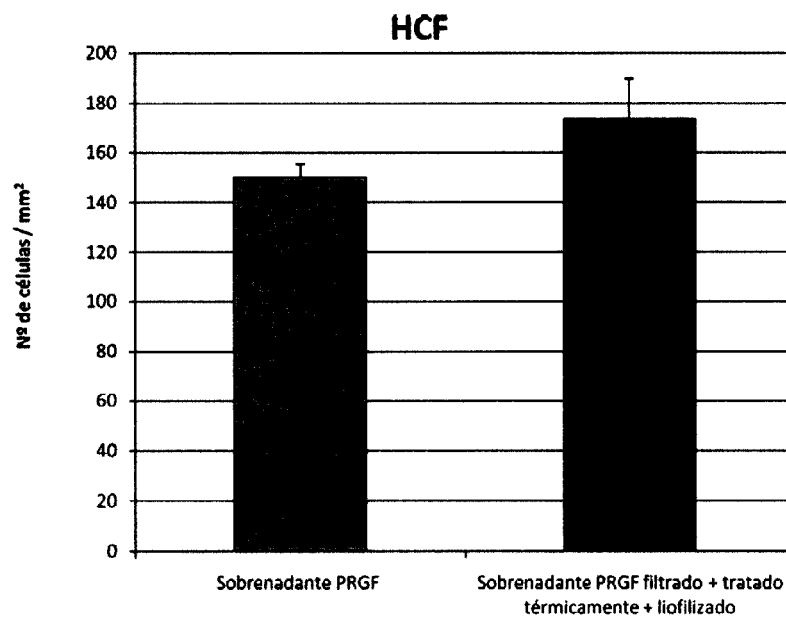


FIG.13



21 N.º solicitud: 201100867

22 Fecha de presentación de la solicitud: 29.07.2011

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	YANG <i>et al.</i> Preparation of a respiratory syncytial virus human reference serum for use in the quantitation of neutralization antibody. <i>Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization</i> . Junio 2007. Vol. 35, nº 3, páginas 183-187. ISSN 1045-1056 (Impreso). doi:10.1016/j.biologicals.2006.09.004. Ver Resumen y apartado 2.1 de Materiales y Métodos.	1-4,14-20
Y		5-13
Y	WO 03026786 A2 (CLEARANT, INC. [US/US]) 03.04.2003, Ejemplos.	5-13
X	US 5871997 A (ROTHER, R. P., et al.) 16.02.1999, ejemplo 5.	1,4,15-20
Y		2,5-10,14
Y	WO 2008078189 A2 (MAXYGEN HOLDINGS, LTD.) 03.07.2008, ejemplos 1,3.	5-10
Y	RODRÍGUEZ FURLÁN L. T., <i>et al.</i> Inulin like lyoprotectant of bovine plasma proteins concentrated by ultrafiltration. <i>Food Research International</i> . Abril 2010. Vol. 43, nº 3, páginas 788-796. ISSN 0963-9969. doi:10.1016/j.foodres.2009.11.015. Ver todo el documento, especialmente Introducción, apartados 2.4 y 2.5 de Materiales y Métodos, y Figuras 1 y 2.	2,14
Y	AYACHE, S., <i>et al.</i> Comparison of proteomic profiles of serum, plasma, and modified media supplements used for cell culture and expansion. <i>Journal of translational medicine</i> . 04.06.2006. Vol. 4, nº 40, páginas 1-12. ISSN 1479-5876 (Electrónico). doi:10.1186/1479-5876-4-40. Ver resumen, Introducción, Métodos, y 1er párrafo de Discusión.	1,4,15-20
Y	WO 2008048228 A2 (DEPARTMENT OF THE ARMY [US/US]) 24.04.2008, resumen; página 12, líneas 5-10; página 16, líneas 10-17.	1,4,15-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

08.11.2011

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K35/16 (2006.01)

A61K38/18 (2006.01)

A61K9/19 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.11.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-20	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-20	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	YANG <i>et al.</i> Preparation of a respiratory syncytial virus human reference serum for use in the quantitation of neutralization antibody. <i>Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization</i> . Junio 2007. Vol. 35, nº 3, páginas 183-187. ISSN 1045-1056 (Impreso). doi:10.1016/j.biologicals.2006.09.004.	Junio 2007
D02	WO 03026786 A2 (CLEARANT, INC. [US/US])	03.04.2003
D03	US 5871997 A (ROTHER, R. P., et al.)	16.02.1999
D04	WO 2008078189 A2 (MAXYGEN HOLDINGS, LTD.)	03.07.2008
D05	RODRÍGUEZ FURLÁN L. T., <i>et al.</i> Inulin like lyoprotectant of bovine plasma proteins concentrated by ultrafiltration. <i>Food Research International</i> . Abril 2010. Vol. 43, nº 3, páginas 788-796. ISSN 0963-9969. doi:10.1016/j.foodres.2009.11.015.	Abril 2010
D06	AYACHE, S., <i>et al.</i> Comparison of proteomic profiles of serum, plasma, and modified media supplements used for cell culture and expansion. <i>Journal of translational medicine</i> . 04.06.2006. Vol. 4, nº 40, páginas 1-12. ISSN 1479-5876 (Electrónico). doi:10.1186/1479-5876-4-40.	04.06.2006
D07	WO 2008/048228 A2 (DEPARTMENT OF THE ARMY [US/US])	24.04.2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente describe y reivindica un procedimiento para la obtención de una composición que contiene factores de crecimiento partiendo de un producto sanguíneo que contiene factores de crecimiento. El producto se somete a un tratamiento térmico para eliminar el complemento y posteriormente se liofiliza en varios pasos (congelación, secado primario, secado secundario y secado terciario), pudiéndose incluir un paso adicional de filtración antes de la liofilización.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue el procedimiento de la invención tal y como está reivindicado, por lo que la solicitud cumple el requisito de novedad según el artículo 6 de la Ley 11/1986 de Patentes.

Existen, sin embargo, varios documentos en el estado de la técnica que describen procedimientos similares al de la solicitud, o algunas de las características técnicas reivindicadas en la misma. Por tanto, la presente solicitud no cumple el requisito de actividad inventiva según el artículo 8 de la mencionada Ley de Patentes.

El documento D01 describe un procedimiento de obtención de un suero humano (que comprende los mismos pasos que el procedimiento de la solicitud. Así, en D01 el suero es inactivado térmicamente a 56°C durante 30 minutos, y posteriormente es filtrado y liofilizado sin añadir ningún coadyuvante a la composición. Aunque en el documento D01 no se indique de forma explícita que se obtiene una composición que contiene factores de crecimiento, se considera conocimiento general en este campo técnico que la sangre contiene factores de crecimiento (ver, por ejemplo, el documento D06), por lo que el suero obtenido con el procedimiento de D01 sería una composición como la de la reivindicación 1 de la presente solicitud. Por tanto, este documento afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 4, 14, 17 y 20. Además, puesto que resultaría obvio para el experto en la materia utilizar los diferentes compuestos sanguíneos de las reivindicaciones 15, 16, 18 a 19 en lugar de suero, este documento afecta también la actividad inventiva de las reivindicaciones 15, 16, 18 y 19.

En el documento D02 se divulga un procedimiento de liofilización de diversos materiales orgánicos en tres pasos. En los ejemplos se concretan las condiciones de la liofilización en D02, que son esencialmente las mismas que las de las reivindicaciones 5 a 13 de la solicitud. Aunque los tiempos y las temperaturas no sean exactamente iguales en ambos casos, las diferencias no son lo suficientemente importantes como para obtener un efecto inesperado. Aunque en ninguno de los ejemplos de D02 se parte de un compuesto sanguíneo, no supondría un esfuerzo inventivo para el experto en la materia aplicar el proceso de liofilización descrito en D02 a compuestos sanguíneos (de hecho, en el párrafo [9] de D02 se incluyen la sangre y sus componentes entre los productos a los que se puede aplicar el proceso de liofilización). Por tanto, resultaría evidente la combinación de los documentos D01 y D02 para incluir el procedimiento de liofilización de D02 en el proceso de D01 y, de este modo, obtener el procedimiento reivindicado en la solicitud, por lo que las reivindicaciones 5 a 13 no tendrían actividad inventiva a la luz de lo divulgado en los documentos D01 y D02.

En el ejemplo 5 del documento D03 se describe un proceso de inactivación del complemento en muestras de suero humano liofilizado mediante incubación a 56°C durante 30 minutos. Aunque el uso que se da al suero tratado en D03 no es el mismo que en la solicitud, es obvio que el producto obtenido en D03 es una composición que contiene factores de crecimiento, y sería evidente para el experto en la materia emplear la información divulgada en D03 para obtener la composición reivindicada en la solicitud. Por tanto, este documento afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 1, 4 y 15 a 20 según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

Hay diferencia entre la solicitud y D03 en el procedimiento de liofilización, que en D03 no se especifica detalladamente. En el documento D04 se describe un proceso de liofilización en 2 pasos que resulta muy similar al proceso reivindicado en las reivindicaciones 5 a 10 de la solicitud (en D04 no se contempla el paso final de secado terciario). Aunque existen ligeras variaciones en los tiempos y temperaturas empleados, el esquema general coincide en ambos casos, y los productos resultantes de cada paso deberían ser los mismos (o muy similares) en los dos procedimientos. Por tanto, el experto en la materia encontraría evidente la combinación del documento D04 con el D03 para obtener el procedimiento de las reivindicaciones 5 a 10 que, por consiguiente, no tienen actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

Otro aspecto de la solicitud que no aparece divulgado en D03 es el paso adicional de filtración del producto antes de proceder a la liofilización. En el documento D05 encontramos un proceso de análisis de plasma bovino en el que el plasma es filtrado antes de la liofilización (ver apartados 2.4 y 2.5). El experto en la materia combinaría de forma evidente esta información con el documento D03 para incluir el paso de filtración en el procedimiento, y, de este modo, llegar al procedimiento de la solicitud. Así, la combinación de los documentos D03 y D05 afecta la actividad inventiva de la reivindicación 14 de la presente solicitud. Además, el documento D05 compara la estabilidad de las proteínas del plasma liofilizado en presencia y ausencia de agentes protectores; aunque se observa un mayor porcentaje de proteína desnaturalizada cuando el tratamiento no incluye sustancias protectoras, la información divulgada en D05 indica que es posible la liofilización de compuestos sanguíneos en ausencia de coadyuvantes, por lo que la combinación de D05 con D03 afectaría también la actividad inventiva de la reivindicación 2 de la solicitud según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

El documento D06 divulga un estudio de los niveles de diversos factores (incluidos factores de crecimiento) en muestras de suero y plasma sanguíneo. El proceso empleado incluye la inactivación del complemento mediante calentamiento a 56°C durante 1 hora (ver página 2, columna 1, párrafo 5), aunque no contempla el paso de liofilización. Este paso lo encontramos en el documento D07, en el que se describe un procedimiento para la liofilización de plasma sanguíneo. Puesto que resultaría evidente para el experto en la materia combinar los documentos D06 y D07 para llegar al procedimiento de la solicitud, se considera que las reivindicaciones 1, 4 y 15 a 20 de la misma no cumplen el requisito de actividad inventiva del artículo 8 de la Ley de Patentes.