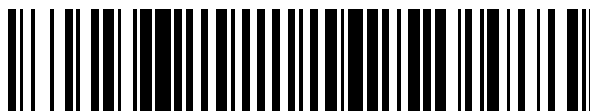


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 144**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61K 38/36** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2010 E 10163843 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 2389942**

54 Título: **Lisado plaquetario inactivado que contiene factores de crecimiento empobrecido en PDGF y VEGF y su procedimiento de preparación**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.04.2013**

73 Titular/es:

**GWOWEI TECHNOLOGY CO., LTD. (100.0%)  
1F, N 86, Sec. 1, Zhongcheng Road, Shilin District  
Taipei City 111, TW**

72 Inventor/es:

**BURNOUF, THIERRY y  
SU, CHENG-YAO**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 402 144 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento empobrecido en PDGF y VEGF y su procedimiento de preparación

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al campo de derivados plaquetarios y más específicamente al campo de concentrados con factores de crecimiento que se obtienen de plaquetas de origen humano y animal. La presente invención también se refiere a procedimientos para preparar dichos lisados plaquetarios que contienen factores de crecimiento, así como al uso de los mismos para cultivos celulares *in vitro* y *ex vivo* (tal como para el desarrollo y diferenciación de células madre), aplicaciones cosméticas o aplicaciones clínicas, por ejemplo, en combinación con injertos de hueso.

**Antecedentes**

15 Como se pone de manifiesto mediante análisis proteómico, las plaquetas humanas contienen una gran cantidad de moléculas que presentan importantes funciones fisiológicas, entre las que destacan los factores de crecimiento (GF, *Growth Factors*). Estos factores de crecimiento, que se acumulan en el interior de los gránulos  $\alpha$  plaquetarios, incluyen principalmente tres isoformas de Factores de Crecimiento Derivados de Plaquetas (PDGF-AA, -AB y -BB), el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), el Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2), el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF) y algún Factor de Crecimiento similar a Insulina (IGF). De acuerdo con el interés terapéutico de dichos factores de crecimiento, las mezclas complejas de factores de crecimiento con plaquetas humanas ya se están usando en aplicaciones terapéuticas en forma de biomateriales en gel con plaquetas de un solo donante resultantes de la activación por trombina de plasma que contiene plaquetas.

25 La activación plaquetaria generalmente conduce a la liberación de los factores de crecimiento contenidos en su interior y a su atrapamiento en una matriz de gel obtenida por conversión simultánea, inducida por trombina, de fibrinógeno en fibrina. Generalmente, este biomaterial se aplica en tejidos, en solitario o en combinación con materiales de injerto. Los geles plaquetarios que contienen factores de crecimiento se usan por tanto en medicina regenerativa para promover la curación y la regeneración de tejidos blandos y duros. Los concentrados con factores de crecimiento obtenidos de plaquetas también se usan para complementar los medios de crecimiento para cultivos celulares *in vitro* o *ex vivo*. Recientemente se ha demostrado, la posibilidad de usar secretomas plaquetarios ricos en factores de crecimiento como sustitutos de suero bovino fetal (SBF) para el desarrollo *ex vivo* de células madre mesenquimales o hematopoyéticas.

35 El uso de secretomas plaquetarios ricos en factores de crecimiento es de particular interés para el desarrollo de células madre, y más específicamente, Células Madre Mesenquimales (CMM) (o células madre hematopoyéticas) que se consideran como células "universales" emergentes, como un sustituto del Suero Bovino Fetal (SBF) o del Suero de Ternero Fetal (STF) que se consideran como posibles fuentes de transmisión de priones y virus, así como una causa de problemas inmunológicos en pacientes debido a proteínas bovinas residuales y antígenos dentro del suero Bovino o de Ternero.

40 Recientemente se han desarrollado nuevas estrategias consistentes en la producción de factores de crecimiento derivados de plaquetas recombinantes en sistemas de expresión convencionales. Por ejemplo, algunos factores de crecimiento humano recombinantes (Rh) individuales se usan en aplicaciones terapéuticas. En algunos países el Rh-PDGF-BB, expresado por levaduras modificadas por ingeniería genética, está autorizado en particular para el tratamiento de úlceras diabéticas neuropáticas crónicas en extremidades inferiores aunque para conseguir eficacia clínica al parecer se requieren grandes dosis y diversas aplicaciones semanales de este factor de crecimiento sencillo. De manera similar, las proteínas morfogénicas óseas (BMP) - 2 y -7 de tipo (Rh), que pertenecen a la superfamilia del TGF- $\beta$ , pueden producirse a partir de células de Ovario de Hámster Chino y están autorizadas para curar determinadas fracturas quirúrgicas. Sin embargo, la cantidad de factores de crecimiento recombinantes disponibles permanece extremadamente limitada, en parte debido a la dificultad para aislar, identificar, clonar y expresar estos factores de crecimiento. Adicionalmente, las preparaciones derivadas de plaquetas aún proporcionan un beneficio complementario sobre el uso de factores recombinantes sencillos, ya que en algunas aplicaciones puede conseguirse un efecto sinérgico beneficioso de la combinación de factores de crecimiento.

50 No obstante parece que los factores de crecimiento PDGF y VEGF han demostrado estar directamente relacionadas con la propagación y/o diferenciación anómala de células (véase por ejemplo Ferrara y col., *Nature Medicine*, vol. 9, no. 6, 2003, págs. 669-676; así como en la publicación EMA/ 92326/2010 de la European Medical Agency con fecha 18 de febrero del 2010 y en la comunicación de la FDA con fecha 27 de marzo de 2008 sobre "una revisión continua de seguridad de regranex (becaplermin). Por tanto, en vista del aumento de susceptibilidad del desarrollo de cánceres después del tratamiento con cada uno de estos dos factores de crecimiento, el PDGF y el VEGF deben evitarse para el cultivo de células madre o para la curación de pacientes, en particular cuando se sabe que dichos pacientes están en riesgo de padecer cáncer.

Existe por lo tanto una necesidad de desarrollar procedimientos de procesamiento de materiales plaquetarios humanos que permitan la preparación de preparaciones de factores de crecimiento a nivel industrial que sean viralmente inocuas y estén bien caracterizadas y más particularmente de preparaciones con empobrecimiento en PDGF y VEGF.

5 La Solicitud de Patente WO 2009/087560 desvela que los concentrados plaquetarios humanos pueden someterse a un tratamiento mediante una combinación de disolvente y detergente (S/D) que consigue dos propósitos: (a) la inactivación de virus con envoltura lipídica y (b) la liberación masiva de los factores de crecimiento de los gránulos  $\alpha$  plaquetarios. Después, podría obtenerse una mezcla compleja de factores de crecimiento derivados de plaquetas que comprendiese PDGF-AB, -BB, y -AA, TGF- $\beta$ , EGF, VEGF y factores de crecimiento similares a insulina  $\beta$ 1 (IGF- $\beta$ 1) por tratamiento con la combinación de S/D, extracción con aceite y cromatografía de interacción hidrófoba (CIH), en la que la extracción con aceite y la CHI se usaron para eliminar los agentes S/D sin influir significativamente en el contenido de PGF y de proteína. Se demostró que la preparación resultante de factores de crecimiento plaquetarios estimulaba *in vitro* diversas líneas celulares y potenciaba el desarrollo de células madre procedentes de liposucción de tejido adiposo. Adicionalmente, el documento WO 2009/087560 desvela que la sustitución de la CIH por una columna de intercambio catiónico de SP-sefaroze permite la preparación de una fracción de PDGF-VEGF purificada. De hecho, en esta estrategia, el PDGF y el VEGF se adsorben sobre la columna pero el TGF- $\beta$ , el EGF y el IGF se encuentran en límite, junto con los agentes S/D usados para la etapa de inactivación de virus. Por el contrario, el documento WO 2009/087560 desvela que el TGF- $\beta$  y el EGF pueden purificarse hasta un determinado nivel sustituyendo la CIH por un intercambiador aniónico de DEAE-sefaroze.

20 En la publicación de El-Ekiaby y col. (El-Ekiaby y col., "Solvent-detergent filtered (S/D-F) fresh frozen plasma and cryoprecipitate minipools prepared in a newly designed integral disposable processing bag system", Transfusion medicine, 2010, 20, 48-61), los autores desvelan un proceso aplicado para el tratamiento de inactivación viral de singletes o miniconjuntos de plasma y crioprecipitado para transfusión y comprende, como etapas principales, el tratamiento con S/D de Plasma Fresco Congelado (FFP) o de CrioPlasma Pobre (CPP), o de crioprecipitado con una mezcla de TnBP y Triton X-45, la extracción con aceite del material plasmático tratado con S/D y el filtrado del material plasmático extraído con aceite a través de un filtro de adsorción con S/D que contiene carbón vegetal activado. Como se describe en esta publicación, el procedimiento desvelado conserva en particular la actividad funcional de las proteínas plasmáticas (tales como factores de coagulación), no modifica la composición multimérica del VWF, reduce el TnBP y el Tritón X-45 por debajo de los niveles aceptables y permite la filtración estéril por gravedad del plasma purificado resultante. No obstante, esta publicación se refiere exclusivamente a la purificación de material plasmático y por tanto no desvela ni incluso sugiere ningún procedimiento que pudiese implementarse para la purificación de factores de crecimiento procedentes de concentrados plaquetarios.

De manera sorprendente, los presentes inventores han descubierto ahora, y tras una intensa investigación, que un procedimiento que comprende un tratamiento de un concentrado plaquetario con S/D, una extracción con aceite y una extracción con carbón vegetal o solo una extracción con carbón vegetal, permite preparar de manera fácil, rápida y eficaz un lisado plaquetario que contiene factores de crecimiento viralmente inactivados con empobrecimiento tanto en PDGF como en VEGF y en el que las concentraciones de disolvente y detergente cumplen las restricciones aprobadas por las autoridades reguladoras para los productos terapéuticos parenterales derivados de sangre tratados con S/D.

40 En particular, el procedimiento de la invención no modifica el contenido en las proteínas principales, tales como albúmina e inmunoglobulinas, y básicamente no tiene ningún impacto sobre la concentración de factores de crecimiento distintos de PDGF y VEGF, tales como TGF- $\beta$ 1, EGF e IGF.

Adicionalmente, el procedimiento de la invención permite la disolución de membranas lipídicas, inactivando por lo tanto virus con envoltura lipídica y otros patógenos similares, por ejemplo, bacterias y parásitos tales como protozoos, así como la retirada de plasma y lípidos plaquetarios que están presentes en el concentrado plaquetario de partida. El procedimiento de la presente invención por tanto hace que sea posible proporcionar mezclas de factores de crecimiento derivados de plaquetas viralmente inactivados que puedan homologarse eficazmente para su uso en tratamientos terapéuticos, terapia celular o cultivo celular.

Finalmente, considerando el hecho de que, en parte debido al riesgo de contaminación bacteriana y de pérdida de actividad funcional por hemostasis, cuando las plaquetas, que normalmente tienen una vida útil limitada de 5 o 7 días, se usan clínicamente por vía intravenosa para la corrección de trombocitopenia cuantitativa funcional, normalmente cada año se desecha un número elevado de unidades plaquetarias de más de 5 o 7 días. Al permitir usar reservas plaquetarias caducadas para la preparación de concentrados derivados de plaquetas, el procedimiento de la invención finalmente revela un interés económico extremadamente prometedor.

## 55 **Sumario de la invención**

Un objeto de la presente invención es un procedimiento para preparar un lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento con empobrecimiento en PDGF y VEGF y que comprende las etapas de poner en contacto un concentrado plaquetario de partida con un disolvente y/o un detergente, incubar dicho concentrado plaquetario de partida con el disolvente y/o el detergente durante al menos un periodo de 5 minutos a 6 horas, a un

- pH mantenido en el intervalo de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,0, y a una temperatura dentro del intervalo de aproximadamente 2 °C a 50 °C, preferentemente dentro del intervalo de 25 °C a 40 °C, retirar el disolvente y/o el detergente por extracción con aceite para obtener una fase de proteína acuosa, e incubar dicha fase de proteína acuosa con carbón vegetal, o retirar el disolvente y/o el detergente incubando el concentrado plaquetario tratado con disolvente y/o detergente solo con carbón vegetal.
- En una realización preferida, el disolvente usado en el procedimiento de la invención se selecciona del grupo que consiste en di o trialquilfosfatos con diferentes cadenas alquilo y es preferentemente el tri-n-butilfosfato (TnBP).
- En una realización preferida, el detergente usado en el procedimiento de la invención se selecciona del grupo que consiste en derivados de polioxietileno de ácidos grasos, ésteres parciales de anhídridos de sorbitol, detergentes no iónicos, desoxicolato sódico y sulfobetainas y más preferentemente del grupo que consiste en Triton X-45, Triton X-100, Tween 80 y Tween 20.
- En una realización preferida, la concentración de cada uno de dicho disolvente y/o dicho detergente durante la etapa de incubación del concentrado plaquetario con el disolvente/detergente varía de 0,2 a 5%, preferentemente de 0,2 a 2% en volumen con respecto al volumen del concentrado plaquetario de partida. En una realización preferida del procedimiento de la invención, el concentrado plaquetario de partida se pone en contacto solo con TnBP al 2% o con TnBP al 1% y Triton X-45 al 1%, basándose en el volumen del concentrado plaquetario.
- Adicionalmente, en una realización preferida de la presente invención, la extracción con aceite se realiza con un aceite de calidad farmacéutica, usándose el aceite en una cantidad del 2 al 20% en peso, o del 5 al 15% en peso o del 5 al 10% en peso, basándose en el peso de la mezcla del concentrado plaquetario con el disolvente y/o el detergente.
- En una realización preferida, cuando la extracción con aceite se realiza antes de la incubación con carbón vegetal activado, el carbón vegetal activado se usa en una cantidad de 50 a 250 g/l, preferentemente de 55 a 200 g/l, o de 60 a 150 g/l, o de 65 a 100 g/l de una fase de proteína acuosa recuperada después de la extracción con aceite.
- En otra realización, cuando no se realiza extracción con aceite antes de la incubación con carbón vegetal activado, el carbón vegetal activado se usa en una cantidad de 250 a 1250 g/l, preferentemente de 275 a 1000 g/l, o de 300 a 750 g/l, o de 325 a 500 g/l del concentrado plaquetario una vez tratado con el disolvente y/o el detergente.
- En una realización preferida, el procedimiento de la invención comprende una etapa de centrifugación adicional después de la extracción con aceite, y/o después de la incubación con carbón vegetal.
- El procedimiento de la invención puede también comprender posiblemente una etapa adicional que consiste en cromatografiar, nanofiltrar (para la retirada de agentes patógenos) y/o ultrafiltrar el lisado plaquetario resultante.
- En una realización preferida, el procedimiento de la invención comprende una etapa preliminar de preparación de un concentrado plaquetario de partida, preparándose dicho concentrado plaquetario de partida por aféresis o por aislamiento de la capa leucocitoplaquetaria procedente de sangre entera y encontrándose en estado fresco, caducado, conservado en líquido o caducado y conservado congelado.
- Otro objeto de la presente invención es un lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento empobrecido en PDGF y VEGF, o un lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento empobrecido en PDGF y VEGF obtenido por el procedimiento de la invención.
- En una realización preferida, este lisado plaquetario comprende los factores de crecimiento TGF- $\beta$ , IGF y EGF. En otra realización, este lisado plaquetario comprende adicionalmente bFGF.
- En una realización preferida, el lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de acuerdo con la invención comprende:
- un nivel de PDGF-AB menor que 10, más preferentemente menor que 5, más preferentemente menor que 3 mg/ml de dicho lisado; y/o
  - un nivel de VEGF menor que 0,1, más preferentemente menor que 0,01 mg/ml de dicho lisado; y/o
  - un nivel de TGF- $\beta$  mayor que 50, más preferentemente mayor de 100, más preferentemente mayor de 150, más preferentemente mayor de 200, más preferentemente mayor de 250 ng/ml de dicho lisado; y/o
  - un nivel de EGF mayor que 0,5, más preferentemente mayor que 1, más preferentemente mayor que 1,5, más preferentemente mayor que 2, más preferentemente mayor que 2,5 ng/ml de dicho lisado; y/o
  - un nivel de IGF mayor que 20, más preferentemente mayor que 50, más preferentemente mayor que 100 ng/ml de dicho lisado.
- Otro objeto de la presente invención es el uso del lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento empobrecido en PDGF y VEGF obtenido por el procedimiento de la invención o el lisado plaquetario de la invención viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento empobrecidos en PDGF y VEGF para promover la regeneración o la reconstrucción ósea, o para el tratamiento de un hueso fracturado.

Otro objeto de la presente invención es el uso del lisado plaquetario viralmente activado que contiene factores de crecimiento empobrecido en PDGF y VEGF obtenido por el procedimiento de la invención o el lisado plaquetario de la invención viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento empobrecido en PDGF y VEGF para el cultivo celular *in vitro* o *ex vivo* y preferentemente para promover la proliferación y/o la diferenciación de células madre. En una realización preferida, el lisado plaquetario de la invención que contiene factores de crecimiento se usa para promover la diferenciación de células madre hacia un linaje osteoblástico y/o condrocítico.

### **Figuras**

Figura 1. Proceso de preparación de la mezcla de factores de crecimiento enriquecida en TGF- $\beta$ 1 y empobrecida en PDGF-AB y VEGF.

Figura 2. Contenido en PDGF-AB (A), VEGF (B), EGF (C), IGF-1 (D) y TGF- $\beta$ 1 (E) en CP-S/D-O (a) y después del tratamiento con 1,5 (b); 3 (c); 3,5 (d); y 4 (e) g de carbón vegetal activado por 20 ml de CP-S/D-O (es decir fase de proteína acuosa recuperada después de extracción con aceite).

Figura 3. Análisis SDS-PAGE de las fracciones plaquetarias en condiciones no reducidas (A) y reducidas (B). CP de partida (carril 1), después de tratamiento con disolvente-detergente y después de una extracción con aceite (CP-S/D-O; 2) y después de adsorción con carbón vegetal (CP-S/D-OC; 3). Marcador de proteína previamente teñido con Novex Sharp (M). a: fibrinógeno; b: IgG; c: albúmina; d: subunidades de fibrinógeno; e: cadena pesada de IgG; f: cadena ligera de IgG.

Figura 4. Datos de proliferación de células con MTS en líneas celulares MG63 (A) y SIRC (B) cultivadas en MEM complementado con SBF al 10% (v/v) (a); sin FBS (b); y con 1 (c), 3 (d), 5 (e) y 10 % (f) de CP-S/P-OC. La viabilidad celular se determinó 5 días después del cultivo.

### **Memoria descriptiva detallada**

Un objeto de la presente invención es un procedimiento par la preparación de un lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento empobrecido en PDGF y VEGF que comprende las etapas de poner en contacto un concentrado plaquetario de partida con un disolvente y/o un detergente, incubar dicho concentrado plaquetario de partida con un disolvente y/o detergente durante al menos un periodo de 5 minutos a 6 horas, a un pH mantenido en un intervalo de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,0, y a una temperatura dentro del intervalo de 2 °C a 50 °C, retirar el disolvente y/o el detergente por extracción con aceite para obtener una fase de proteína acuosa e incubar dicha fase de proteína acuosa con carbón vegetal o retirar el disolvente y/o el detergente incubando el concentrado plaquetario tratado con disolvente y/o detergente solo con carbón vegetal.

Como se usa en la presente invención, la expresión “viralmente inactivado”, significa que el lisado plaquetario que contiene factores de crecimiento está sustancialmente libre de virus infecciosos, y más particularmente de virus con envoltura lipídica, tales como por ejemplo el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC), el virus del Nilo Oriental (VNO), el virus TT, el virus del Dengue, el citomegalovirus (CMV), el virus de Epstein Barr (VEB), el Herpes Virus Humano 8 (HVH-8), el espumovirus de Simio, el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave (coronavirus SARS), el H1NI y otros virus gripales, así como otros con envoltura lipídica tales como retrovirus, virus de la hepatitis, citomegalovirus, virus de la láctico deshidrogenasa, virus del grupo herpes, rhabdovirus, leucovirus, mixovirus, alfavirus, arbovirus paramixovirus, arenavirus, y coronavirus. Por “sustancialmente libre”, se entiende que la preparación con factores de crecimiento derivados de plaquetas tiene un grado de inactivación de virus al menos mayor que  $4\log_{10}$  según se requiere para caracterizar las fuertes etapas de reducción viral, por el Committee for proprietary medicinal products (CPMP) de la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales (EMA) en su “Note for guidance on virus validation studies” (Referencia CPMP/BWP/268/95), y preferentemente mayor que  $5\log_{10}$  o incluso  $6\log_{10}$  y por lo tanto no es probable que sea responsable de la transmisión a pacientes de infección transmitida por la sangre debido a virus con envoltura lipídica.

Como se usa en la presente invención, la expresión “empobrecido en PDGF y VEGF”, se refiere a que el lisado plaquetario que contiene factores de crecimiento está sustancialmente libre de PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) y de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular).

En una realización particular, la concentración de PDGF-AB en el lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de acuerdo con la invención es menor que 10 ng/ml de lisado, preferentemente inferior que 5 ng/ml de lisado, incluso preferentemente menor que 3 ng/ml.

En una realización particular, la concentración de VEGF en el lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de acuerdo con la invención es menor que 0,1 ng/ml de lisado, preferentemente menor que 0,01 ng/ml de lisado.

Como se usa en la presente invención, “carbón vegetal activado”, “carbón activado” o “carbón vegetal” se refiere a una forma de carbón que se ha procesado para hacerla extremadamente porosa. El carbón vegetal activado posee por tanto un área superficial muy grande, que proporciona una capacidad de adsorción muy importante. El carbón

vegetal activado se produce generalmente a partir de materiales de fuentes carbonáceas como cáscaras de frutos secos, turba, madera, fibra de coco, lignita, carbón y alquitran. Puede obtenerse mediante diversos procesos que comprenden la reactivación física (un precursor se desarrolla en carbón vegetal activado usando gases) y activación química (la materia prima se impregna con determinados productos químicos tales como un ácido, una base fuerte o una sal antes de la carbonización).

El carbón vegetal activado puede usarse a granel o envasado en cartuchos de filtración disponibles en el mercado.

En una realización preferida, el carbón vegetal activado para su uso en la presente invención es un carbón vegetal activado en polvo obtenido por tratamiento con vapor y/o químico. La porosidad del carbón vegetal puede ser microporosa (intervalo de tamaño de poro <10 nm), mesoporosa (intervalo de tamaño de poro de 10-25 nm) o macroporosa (intervalo de tamaño de poro > 25 nm), o una combinación de las mismas. Diferentes fuentes y el tipo de tratamiento pueden ejercer influencia sobre el tipo de porosidad que se obtiene eventualmente.

En una realización preferida, el grado y/o la porosidad del carbón vegetal activado son adecuados para retener el disolvente, el detergente, el PDGF y el VEGF. Los carbonos vegetales activados adecuados para su uso en el procedimiento de la presente invención pueden proceder de diversos proveedores, tales como, por ejemplo, en el caso de cartuchos de filtración de carbón vegetal pre-ensados, 3M/CUNO (carbón vegetal activado de CUNO) y Pall (carbón activado AKS).

Cuando se usan carbonos vegetales activados de 3M/CUNO, se prefiere carbón vegetal activado de grado 5 (porosidad). Adicionalmente, la retirada de disolvente, detergente, PDGF y VEGF es más eficaz con carbono activado 3M/CUNO con porosidad 5 de grado 5 que con porosidades de 2, 3 y 4. De manera similar, cuando se usa carbón vegetal activado de Pall, se prefiere AKS de grado 6 a AKS de grado 7 y 4, ya que proporciona una mejor retirada del disolvente, detergente, PDGF y VEGF.

En una realización preferida, el carbón vegetal activado para su uso en el procedimiento de la invención es capaz de adsorber azul de metileno en un intervalo de 100 a 550, y en una realización de 300 a 500 g/m<sup>2</sup> o en otra realización de 100 a 300 g/m<sup>2</sup> (el azul de metileno se usa normalmente como una sustancia patrón para medir la capacidad de adsorción del carbón vegetal activado). El carbón vegetal también puede seleccionarse dependiendo de la viscosidad del fluido que vaya a tratarse; se prefiere carbón vegetal diseñado para fluidos de baja viscosidad (por ejemplo, con una viscosidad inferior a 20 cp).

Un carbón vegetal específico que puede usarse es CUNO R55, en el que el primer 5 indica el índice de filtración (relacionado con la viscosidad) el segundo 5 indica el grado de carbón.

La expresión “retirar el disolvente y/o el detergente”, se refiere a que el nivel de disolvente y/o detergente en el lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento es extremadamente bajo, y preferentemente no detectable. De hecho, el experto en la materia conoce bien que las concentraciones elevadas en disolvente y/o detergente están directamente relacionadas con una toxicidad prolongada y más particularmente con la aparición de afecciones neurológicas (tal como se desvela en J. P. R. Pelletier, S. Transue, E. L. Snyder. Pathogen inactivation techniques. Best Practice & Research Clinical Haematology Vol. 19, No. 1, páginas 205-242, 2006).

Por lo tanto, en la presente invención, la expresión “extremadamente bajo” con respecto al disolvente, se refiere a que el nivel de disolvente es menor de 100 ppm, preferentemente menor de 50 ppm, preferentemente menor de 20 ppm, más preferentemente menor de 10 ppm, menor de 5 ppm e incluso más preferentemente menor de 1 ppm.

Además, en la presente invención, la expresión “extremadamente bajo” en lo que respecta al detergente, se refiere a que el nivel de detergente es menor de 500 ppm, preferentemente menor de 250 ppm, más preferentemente menor de 100 ppm, más preferentemente menor de 50 ppm, e incluso más preferentemente menor de 10 ppm.

El lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de acuerdo con la invención u obtenido mediante el procedimiento de la invención comprende al menos los siguientes factores de crecimiento funcionales: la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ), que comprende, entre otros, TGF- $\beta$ 1 y/o TGF- $\beta$ 2, el factor de crecimiento similar a insulina (IGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). En una realización preferida, el lisado plaquetario de la invención que contiene factores de crecimiento comprende adicionalmente el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF).

En una realización particular, la concentración de TGF- $\beta$ 1 en el lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de acuerdo con la invención es al menos similar a la del concentrado plaquetario de partida y preferentemente es mayor de 50, preferentemente mayor de 100, preferentemente mayor de 150, preferentemente mayor de 200, preferentemente mayor de 250 ng/ml que la del lisado.

En una realización particular, la concentración de IGF en el lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de acuerdo con la invención es al menos similar a la del concentrado plaquetario de partida y preferentemente es mayor de 20, preferentemente mayor de 50, preferentemente mayor de 100 ng/ml que la del lisado.

En una realización particular, la concentración de EGF en el lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de acuerdo con la invención es mayor de 0,5, preferentemente mayor de 1, preferentemente mayor de 1,5, preferentemente mayor de 2 y preferentemente mayor de 2,5 ng/ml que la del lisado.

5 En una realización particular, el lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de la invención u obtenido mediante el procedimiento de la invención no conduce a reacciones de transfusión relacionadas con células sanguíneas. Por "reacciones de transfusión relacionadas con células sanguíneas", se entiende que este lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento carece de células vivas intactas (tales como, por ejemplo, eritrocitos, plaquetas y leucocitos) y por lo tanto permite impedir que se produzca una serie de reacciones de transfusión bien conocidas, que incluyen complicaciones inmunológicas (tal como aloinmunización) y hemolíticas, en pacientes (véase, por ejemplo, Stroncek et Rebull, "Platelet transfusions", The Lancet, 4 de agosto 2007; volumen 370: 427-438). De hecho, un receptor que es inmunocompetente a menudo presenta una respuesta inmunitaria contra los antígenos de las células sanguíneas del donante, dando produciendo así una diversidad de consecuencias clínicas dependiendo de las células sanguíneas y de los antígenos específicos implicados. Los antígenos más comúnmente implicados se seleccionan en las siguientes categorías: (1) los HLA de clase I, que comparten plaquetas y leucocitos, (2) los HLA de clase II, que están presentes en algunos leucocitos, (3) antígenos específicos de granulocitos, (4) antígenos específicos de plaquetas (tales como, por ejemplo, el antígeno plaquetario humano APH) y (5) antígenos específicos de Eritrocitos.

20 En una realización particular, el lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de la invención se prepara a partir de concentrados plaquetarios extraídos de donantes de grupo sanguíneo AB y por lo tanto carece de hemaglutininas anti-A o anti-B, evitando así en particular posibles reacciones hemolíticas en receptores.

25 En otra realización particular, el lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de la invención se prepara a partir de concentrados plaquetarios tipificados extraídos de donantes de sangre del mismo grupo (por ejemplo, donantes de grupo A o de grupo B) para usar en pacientes del mismo grupo sanguíneo que el de los donantes.

30 Más específicamente, en lo que respecta al procedimiento de preparación de la invención, las células sanguíneas vivas (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) se destruyen/lisan mediante el tratamiento con disolvente-detergente, reduciendo de esta manera, y preferentemente previniendo, el riesgo de exposición del paciente a antígenos extraños y a células sanguíneas intactas. El procedimiento de la invención permite por tanto preparar un lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento bien a partir de plaquetas obtenidas del propio paciente que va a tratarse o a partir de plaquetas alogénicas.

En otra realización, el lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento obtenido mediante el procedimiento de la invención comprende adicionalmente inmunoglobulinas tales como IgG, IgM, y/o IgA.

35 En una realización particular, la concentración de inmunoglobulina IgG en el lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de acuerdo con la invención es preferentemente mayor de 5 g/l que la del lisado y preferentemente aproximadamente de 8 g/l en comparación con la del lisado.

40 En otra realización, el lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento obtenido mediante el procedimiento de la invención puede someterse adicionalmente a etapas de purificación adicionales tales como cromatografía de intercambio iónico para retirar las inmunoglobulinas tales como IgG, IgM y/o IgA.

En otra realización, el lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de la invención u obtenido mediante el procedimiento de la invención comprende al menos uno de albúmina, fibrinógeno y protrombina.

45 En una realización particular, la concentración de albúmina en el lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de acuerdo con la invención es preferentemente mayor de 30 g/l en comparación con la del lisado.

En otra realización, el lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de la invención u obtenido mediante el procedimiento de la invención comprende adicionalmente  $\alpha$ 1-antitripsina,  $\alpha$ 2-antiplasmina,  $\alpha$ 2-macroglobulina, transferrina, fibronectina y C1-INH.

50 En una realización preferida, la incubación del concentrado plaquetario con el disolvente y/o detergente realizada en el procedimiento de la invención varía de 2 a 4 horas a un pH fisiológico, por ejemplo, a un pH que varía de pH 7,0 a pH 7,5 (en el que las plaquetas de partida son plaquetas recientes) o a un pH que varía de pH 6,8 a 8,2 (en el que las plaquetas de partida son plaquetas caducadas y/o congeladas). Ventajosamente, la temperatura de incubación es de aproximadamente 31 °C.

55 Los disolventes adecuados para su uso en el procedimiento de la invención son di- o trialkilfosfatos, tales como tri-(n-butil)fosfato, tri-(t-butil)fosfato, tri-(n-hexil) fosfato, tri-(2-etilhexil)fosfato, tri-(n-decil) fosfato, di-(n-butil)fosfato, di-(t-

butil)fosfato, di-(n-hexil)fosfato, di-(2-etilhexil)fosfato, di-(n-decil)fosfato así como dialquifosfatos con diferentes cadenas alquilo. Pueden emplearse di o trialquifosfatos que tienen diferentes cadenas alquilo, por ejemplo etil di-(n-butil)fosfato. Un trialquifosfato especialmente preferido es el tri-(n-butil)fosfato (TnBP).

5 Los detergentes adecuados para su uso en el procedimiento de la invención incluyen derivados de polioxietileno de ácidos grasos, ésteres parciales de anhídridos de sorbitol, por ejemplo los productos comercializados con los nombres "Tween 80" conocido también como "polisorbato 80", "Tween 20" y detergentes no iónicos, tal como alquifenol oxietilado comercializado con el nombre "Triton X-100" o "Triton X-45". Otros detergentes que se contemplan son el desoxicolato sódico y las sulfobetainas, tales como N-dodecil-N, N-dimetil-2-amonio-1-etano sulfonato. Los detergentes especialmente preferidos son "Triton X-45", "Triton X-100", "Tween 80" y "Tween 20".

10 En una realización particular de la invención, el concentrado de plaquetas de partida se incuba con un disolvente y un detergente, preferentemente TnBP y Triton X-45.

15 Ventajosamente, la concentración final del disolvente o del detergente o de cada uno de disolvente y detergente, está comprendida en un intervalo de desde 0,2 a 5%, preferentemente de 0,2 a 2% en volumen con respecto al volumen del concentrado plaquetario. En una realización preferida, el concentrado plaquetario de partida se incuba con TnBP al 2%. En otra realización preferida, el concentrado plaquetario de partida se incuba con TnBP al 1% y Triton X-45 al 1%.

El disolvente y/o detergente pueden extraerse del fluido biológico por extracción con aceite con aceite de calidad farmacéutica y por extracción con carbón vegetal o solo por extracción con carbón vegetal, de tal manera que el lisado restante está empobrecido en disolvente y/o detergente.

20 El aceite de calidad farmacéutica también puede ser un aceite de origen natural, extraído, por ejemplo, de una planta o de un animal, o un compuesto sintético de estructura similar. Los aceites de origen natural adecuados incluyen aceite de ricino (conocido también como aceite *Ricinus*), aceite de soja, aceite de girasol o de algodón. Un compuesto sintético preferido es un triglicérido sintético. Los ejemplos de triglicéridos sintéticos adecuados incluyen trioleína, tristearina, tripalmitina, trimiristina y sus combinaciones.

25 La cantidad de aceite de calidad farmacéutica es la cantidad que permite la extracción de al menos el 80% de productos químicos del proceso solubles en lípidos, usándose el aceite en una cantidad del 2 al 20% en peso en base al peso del concentrado de las plaquetas, preferentemente del 5 al 15% en peso y más preferentemente del 5 al 10% en peso.

30 La extracción con carbón vegetal puede realizarse con cualquiera de los carbones vegetales activados mencionados anteriormente, siempre que dichos carbones vegetales permitan la adsorción y retención de las partículas de disolvente y/o detergente. La extracción con carbón vegetal puede realizarse en lote (es decir, el carbón vegetal se mezcla con la fase de proteína acuosa recuperada después de la extracción con aceite) o en columna (la fase de proteína acuosa se pasa después sobre carbón vegetal previamente sedimentado) o a través de cartuchos comerciales previamente envasados. En una realización preferida, la extracción con carbón vegetal se realiza en lote.

35 En una realización preferida, cuando la extracción con aceite se realiza antes de la incubación con carbón vegetal activado, la extracción con carbón vegetal se realiza con carbón vegetal activado en una cantidad de 50 a 250 g/l, preferentemente de 55 a 200 g/l, o de 60 a 150g/l, o de 65 a 100 g/l de dicha fase de proteína acuosa. En una realización adicional preferida, la extracción con carbón vegetal se realiza con carbón vegetal activado en una cantidad de 75 g/l de la fase de proteína acuosa recuperada después de la extracción con aceite.

En otra realización preferida, cuando la extracción no se realiza con aceite antes de la incubación con aceite vegetal activado, la extracción con carbón vegetal se realiza con carbón vegetal activado en una cantidad de 250 a 1250 g/l, preferentemente de 275 a 1000 g/l, o de 300 a 750g/l, o de 325 a 500 g/l del concentrado plaquetario tratado con disolvente y/o detergente.

45 En una realización preferida, el nivel de disolvente después de la extracción con aceite y carbón vegetal o después de la extracción solo con carbón vegetal, es menor de 100 ppm, preferentemente menor de 50 ppm, preferentemente menor de 20 ppm, más preferentemente menor de 10 ppm, menor de 5 ppm e incluso más preferentemente menor de 1 ppm.

50 En una realización preferida, el nivel de detergente después de la extracción con aceite y carbón vegetal o extracción solo con carbón vegetal es menor de 500 ppm, preferentemente menor de 250 ppm, más preferentemente menor de 100 ppm, más preferentemente menor de 50 ppm e incluso más preferentemente menor de 10 ppm.

55 En una realización preferida, el procedimiento de la invención puede comprender adicionalmente al menos una etapa de centrifugación después de la extracción con aceite, o después de la incubación con carbón vegetal. Preferentemente, la etapa de centrifugación realizada después de la extracción con aceite y carbón vegetal o extracción solo con carbón vegetal permite retirar los residuos celulares. Ventajosamente, la etapa de centrifugación



se realiza de 800 a 20000 x g. durante 10 a 30 minutos, y preferentemente a 10000 x g. durante 15 minutos.

En una realización preferida, el procedimiento de la invención también puede comprender adicionalmente al menos una etapa adicional seleccionada de una purificación cromatográfica y/o una ultrafiltración y/o una nanofiltración y/o una filtración estéril.

5 La posible purificación cromatográfica se realiza después posteriormente a la extracción con aceite y carbón vegetal o a la extracción con carbón vegetal. Preferentemente, la mezcla de carbón vegetal y de la fase de proteína acuosa recuperada después de la extracción con aceite, o de carbón vegetal y del concentrado plaquetario tratado con disolvente y/o detergente se centrifuga después de la incubación. El sobrenadante se recoge y se carga sobre el soporte cromatográfico en particular para fraccionar los componentes de la mezcla o para retirar algunos  
10 componentes. Las columnas cromatográficas adecuadas que pueden usarse comprenden matrices de fase inversa (interacción hidrófoba), o matrices de adsorción de proteínas, tales como matrices de intercambio iónico (anión y catión) y matrices de afinidad (tal como inmutofinidad o heparina inmovilizada), o matrices de exclusión de tamaño. En una realización preferida, los factores de crecimiento contenidos en el lisado plaquetario se retienen sobre los soportes cromatográficos usados y posteriormente se eluyen con un tampón de elución adecuado. Preferentemente,  
15 las condiciones cromatográficas se seleccionan de manera que se permita la separación/purificación cromatográfica a un pH que sea compatible con la estabilidad y la función fisiológica de los factores de crecimiento de interés, por ejemplo un pH sustancialmente neutro de tal manera que puede impedirse la desnaturalización de los factores de crecimiento. Las condiciones de carga, lavado y elución se determinan de acuerdo con el conocimiento general del experto en la materia.

20 Después de la retirada del disolvente y/o detergente por extracción con aceite y carbón vegetal o solo por extracción con carbón vegetal, podría añadirse una etapa adicional para inactivar o retirar los virus sin envoltura, tales como parvovirus B19 o, posiblemente, el virus de la hepatitis A (VHA), por ejemplo por nanofiltración y más particularmente por nanofiltración usando una membrana de filtro de tamaño de poro de 75-nm, 35-nm, 20-nm, 15-nm o 10-nm.

25 En una realización particular, el concentrado plaquetario usado como material de partida en el procedimiento de la invención corresponde a concentrados plaquetarios convencionales individuales o agrupados, por ejemplo concentrados plaquetarios que se prepararon para transfusiones. El concentrado plaquetario también puede originarse a partir del aislamiento de la capa leucocitoplaquetaria de sangre completa. Una unidad de concentrado plaquetario derivado de la capa leucocitoplaquetaria generalmente corresponde de 30 a 50 ml. Las plaquetas  
30 derivadas de la placa leucocitoplaquetaria pueden usarse como material de partida como una sola unidad o como un conjunto de unidades individuales, por ejemplo en forma de una unidad terapéutica, que corresponde a un conjunto de 4 a 6 unidades individuales (como se desvela en la Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components – 13<sup>a</sup> edición (2007), editada por el Council of Europe.

35 El concentrado plaquetario también puede obtenerse mediante procedimientos convencionales de aféresis, citoféresis o plaquetoféresis (véase por ejemplo la Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 13<sup>a</sup> edición (2007), editada por el Council of Europe) y puede obtenerse usando CMM+ (Haemonetics), Trima Accell o COBE Spectra (Gambro) o Amicus (Baxter). Un procedimiento de aféresis generalmente produce un mayor volumen por donante (correspondiente a un concentrado plaquetario de 300 ml), cuando se compara con el obtenido mediante procedimientos de aislamiento de la capa leucocitoplaquetaria.

40 En una realización preferida, el procedimiento de la invención comprende una etapa preliminar que consiste en preparar un concentrado plaquetario de partida. Ventajosamente, los procedimientos para preparar un concentrado plaquetario de partida incluyen, pero sin limitación, procedimientos realizados en bancos de sangre convencionales tales como aféresis o preparaciones plaquetarias de donaciones de sangre completa y procedimientos de laboratorios móviles, tales como los que utilizan dispositivos protectores/separadores de células sanguíneas o de  
45 mesa.

El concentrado plaquetario utilizado como material de partida en el procedimiento de la invención puede ser reciente, es decir menor de 5 o 7 días después de la extracción, caducado, es decir más de 5 o 7 días después de la extracción, o caducado y congelado durante varias semanas a -20 °C o a una temperatura más fría.

50 En una realización particular, el concentrado plaquetario utilizado como material de partida para el procedimiento de la invención puede comprender adicionalmente leucocitos y/o eritrocitos. El concentrado plaquetario de partida puede por lo tanto comprender diversos leucocitos diferenciados y no activados tales como linfocitos, granulocitos neutrófilos y monocitos. Los neutrófilos y monocitos, en particular, son ricos en gránulos que contienen mieloperoxidasa, que cataliza la oxidación de cloruro para generar ácido hipocloroso y otros derivados de oxígeno reactivos que actúan como fuertes oxidantes bactericidas tóxicos a microorganismos y hongos.

55 Por lo tanto, cuando el concentrado plaquetario de partida comprende diversos leucocitos diferenciados y no activados, el lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento obtenido mediante el procedimiento de la invención comprende adicionalmente componentes antimicrobianos así como diversos factores de crecimiento que se originan a partir de los leucocitos.

En una realización particular, los leucocitos se eliminan del concentrado plaquetario utilizado como material de partida, preferentemente mediante leucorreducción, de tal manera que se impiden los efectos proinflamatorios de las proteasas e hidrolasas ácidas contenidas en los leucocitos. La leucorreducción también permite reducir el riesgo de una posible contaminación priónica.

5 Un recuento plaquetario normal en una persona sana generalmente está comprendido entre 150.000 y 400.000 plaquetas por  $\text{mm}^3$  de sangre, es decir de 150 a  $400 \times 10^9$  plaquetas/l. Este recuento plaquetario "normal" se encuentra aproximadamente en el 95% de las personas sanas, mientras que el 5% restante puede haber un recuento plaquetario estadísticamente anómalo (o muy bajo o muy alto).

10 Cuando las plaquetas se recogen por aféresis, el recuento plaquetario es generalmente mayor de  $1,2 \times 10^9$  plaquetas por ml para una bolsa de 250 ml, correspondiendo por lo tanto a un recuento plaquetario de más de aproximadamente  $3 \times 10^{11}$  plaquetas por bolsa (unidad).

En una realización preferida, el número de plaquetas en el concentrado plaquetario de partida es de 3 a 10 veces mayor que el normalmente encontrado en la sangre.

15 El lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de la invención u obtenido mediante el procedimiento de la invención puede mezclarse con armazones artificiales, tales como los preparados con colágeno, quitosano, cerámicas por ejemplo o con adhesivos de fibrina o selladores de fibrina derivados de plasma, tales como los que se usan para fines terapéuticos, es decir, para un tratamiento curativo o profiláctico para el tratamiento de afecciones en seres humanos y/o en animales, para restablecer, corregir o modificar las funciones fisiológicas de los mismos a través de un efecto farmacológico, inmunológico o metabólico.

20 El lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de la invención u obtenido mediante el procedimiento de la invención es especialmente adecuado para el tratamiento de afecciones en seres humanos y/o en animales y/o para ponerse en contacto con partes superficiales del organismo de los mismos ya que el disolvente y/o detergente se ha aclarado y es viralmente inocuo.

25 Al alisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento, también pueden añadirse otros compuestos que comprenden, pero sin limitación, agentes quimioterapéuticos, antibióticos y/u hormonas.

Otro objeto de la invención es el uso del lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de la invención u obtenido mediante el procedimiento de la invención, en aplicaciones terapéuticas, así como para cultivo de células *in vitro* o *ex vivo*. Cuando se usa para el cultivo de células *in vitro* o *ex vivo*, el lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de la invención u obtenido mediante el procedimiento de la invención está presente en el medio de cultivo en el intervalo del 1% al 30%, preferentemente, del 2% al 20% más preferentemente del 3% al 10%, con respecto al volumen del medio de cultivo.

30

Otro objeto de la invención es un producto cosmético y/o farmacéutico que comprende el lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de la invención u obtenido mediante el procedimiento de la invención.

35 Por "producto farmacéutico", se entiende un gel plaquetario, un adhesivo plaquetario, un adhesivo y/o sellante de fibrina enriquecido con factores de crecimiento, armazones artificiales.

Por "producto cosmético", se entiende cualquiera de las diversas preparaciones aplicadas al organismo humano para embellecer, conservar o modificar el aspecto o para limpiar, colorear, acondicionar o proteger la piel, el cabello, las uñas, los labios, los ojos o los dientes.

40 Otro objeto de la invención es el uso del lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de la invención u obtenido mediante el procedimiento de la invención en un medio de cultivo que es adecuado para el cultivo *in vitro* o *ex vivo* de fibroblastos, condrocitos, osteoblastos, queratinocitos, células madre y/o células para trasplantes. Otro objeto de la presente invención es un medio de cultivo adecuado para el cultivo *in vitro* o *ex vivo* de fibroblastos, condrocitos, osteoblastos, queratinocitos, células madre y/o células para trasplantes y que contiene el lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de la invención u obtenido mediante el procedimiento de la invención.

45

En una realización preferida, el uso del lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de la invención promueve la propagación y/o la diferenciación de células madre, en particular de Células Madre Mesenquimales (CMM). En una realización preferida, el uso del lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de la invención promueve la diferenciación de células madre hacia un linaje osteoblástico o condrocítico.

50

Otro objeto de la presente invención es el uso del lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento empobrecido en PDGF y VEGF de la invención para promover la reconstrucción ósea, la regeneración ósea o la curación de heridas, así como para uso cosmético.

- 5 Lo anterior y otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción, haciendo referencia a las figuras acompañantes.

## Ejemplos

### I-Material y procedimientos

#### 1-Recogida de plaquetas por aféresis

- 10 Los concentrados plaquetarios (CP) de partida se recogieron a partir donantes voluntarios después de dar su consentimiento usando un sistema de componente múltiple CMM + (Haemonetics, Braintree, USA). Se extrajo sangre completa a través de un catéter venoso, usando un flujo intermitente, e inmediatamente se anticoaguló a una proporción de 1/9 con una solución de citrato en dextrosa Fórmula A. Las plaquetas se separaron de los eritrocitos y de los otros componentes de la sangre por centrifugación continua, se suspendieron en plasma y se recogieron en un envase estéril. Se realizaron diversos ciclos de separación hasta que el volumen total del CP recogido alcanzó un intervalo de volumen entre 225 y 215 ml y una diana de rendimiento plaquetario predefinida igual a o mayor que  $3,0 \times 10^{11}$ . Los CP se conservaron mezclando lentamente a temperatura ambiente y se procesaron en el intervalo de 24 a 72 horas después de la recogida.

#### 2-Recuentos celulares

- 20 El contenido de eritrocitos, plaquetas y leucocitos en el CP de partida se determinó usando un contador celular (ABC Vet automatic blood counter, ABX Diagnostics, Montpellier, Francia).

#### 3-Procesamiento de los concentrados plaquetarios de partida

##### *a-Diseño del estudio:*

Los concentrados plaquetarios de partida se procesaron de acuerdo con el diseño del estudio que se indica en la Figura 1.

- 25 En resumen, el CP (300 ml) se transfirió a una bolsa de plástico y se procesó como se describe en el documento EP 1 685 852. Los concentrados de plasma se incubaron con una combinación de tri-butil fosfato al 1% (concentración final) (v/v) (TnBP; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y Triton X-45 al 1% (concentración final) (v/v) (Sigma, Missouri, Estados Unidos), a temperatura ambiente (TA) durante 1 h agitando suavemente de manera constante (70 rpm; FINEPCR, Seúl, Corea).

- 30 Después se añadió aceite de soja al 10% (v/v; concentración final) (Sigma, Missouri, Estados Unidos) y se mezcló primero vigorosamente durante 30 segundos y después a 70 rpm con el CP tratado con S/D (CP-S/D) durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA).

Después, la mezcla de aceite/CP-S/D se decantó durante 45 minutos para separar una fase oleaginoso transparente (parte superior), una fase turbia (intermedia) y una fase de proteína acuosa transparente (parte inferior).

- 35 La fase de proteína acuosa (aproximadamente 270 ml) se recuperó por gravedad desde la parte inferior de la bolsa y se aclaró por centrifugación a 6.000 xg durante 10 min a 20-25 °C para sedimentar cualquier residuo celular o material insoluble.

- 40 Después de la centrifugación, el sobrenadante (CP-S/D-O; aproximadamente 265 ml) se recuperó y se mezcló durante 30 min a 70 rpm a TA con 19,9 g de carbón vegetal activado (3M, St. Paul, MN, Estados Unidos) correspondiente a una proporción de 1,5 g/20 ml de CP-S/D-O. Después, la mezcla se centrifugó (6000 x g; 10 min, TA) para sedimentar el carbón vegetal y recuperar un sobrenadante transparente (CP-S/D-OC). Las muestras se tomaron a lo largo del proceso y se congelaron a -80 °C hasta el análisis. Los datos presentados son cifras promedio de cuatro o cinco repeticiones.

#### 4-Impacto de la proporción de carbón vegetal

- 45 Se realizaron experimentos preliminares a pequeña escala para determinar la cantidad óptima de carbón vegetal a usar para retirar el TnBP y el Triton X-45 y para evaluar el impacto sobre el contenido en GF (factor de crecimiento) y proteína. Se mezclaron cantidades en aumento de carbón vegetal (1,5 a 4 g) con el CP-S/D-O (20 ml) durante 30 min, TA y 70 rpm usando un mezclador rotatorio. Después las mezclas se centrifugaron (6.000 x g; 10 min, TA) para sedimentar el carbón vegetal y recuperar el sobrenadante transparente que se congeló a -30 °C hasta la valoración.

50

## 5-Ensayos con factores de crecimiento

Se tomaron muestras de 1 ml en cada etapa de los procedimientos. Se centrifugaron a 10.000 x g durante 15 min (Microfuge® 22R, Beckman Coulter, Fullerton, CA) para sedimentar las plaquetas y/o los residuos celulares y obtener sobrenadante acelulares para realizar las mediciones de los factores del crecimiento derivados de plaquetas.

5 Después, los sobrenadantes se congelaron inmediatamente a -80 °C. Las muestras se descongelaron a 37 °C y se analizaron al cabo de 1 h por inmunoensayos sensibles y específicos disponibles en el mercado. Los patrones y las muestras se sometieron a ensayo por duplicado y se calcularon los valores promedio. Los resultados se multiplicaron por el factor de dilución aplicado a las muestras.

10 Mediante ensayo ELISA se midieron en particular el PDGF-AB, TG-β1, EGF, VEGF e IGF-1 usando kits Quantikine (R&D Systems; Minneapolis, MN).

*a-PDGF AB*

El PDGF-AB se sometió a ensayo usando el kit de ELISA Quantikine (Nº DHD00B, R&D Systems, Minneapolis, MN). Las muestras se diluyeron 100 veces en el Diluyente Calibrator (RD6-11). Las placas se incubaron durante 2 h, se lavaron y se incubaron con anticuerpos contra PDGF-AB conjugados con enzimas durante 3 horas más a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron usando Tampón de Lavado, después se añadió Solución de Sustrato durante 20-30 min a temperatura ambiente. Los pocillos se protegieron de la luz. Se añadió Solución de Detención a cada pocillo y se determinaron las absorciones a 450 nm usando un vector de placa de microtitulación. La dosis detectable mínima fue de 1,7 pg/ml.

15

*b-TGF-β1*

El TGF-β1 se determinó usando el kit de ELISA Quantikine (DB100B, R&D Systems). Las muestras se diluyeron 100 veces en el Diluyente Calibrator (RD5-26). Se prepararon series de diluciones de patrones de TGF-β1 (890207) en volúmenes de 100 µl en placas de microtitulación de 96 pocillos revestidas con el receptor II de TGF- β. Antes del análisis del TGF-β1 se realizó una activación con ácido y neutralización para activar el TGF-β1 latente contra la forma inmunorreactiva. Para este fin, se mezclaron muestras de 0,5 ml con 0,1 ml de HCl 1N, se incubó a temperatura ambiente durante 10 min, se neutralizó mediante una adición de 0,1 ml de NaOH 1,2 N/HEPES 0,5 M ácido (N-[2-hidroxietil]piperacina-N0-[2-etanosulfónico]) de Sigma (H-7523), y se centrifugó. Después, la fracción del sobrenadante se sometió a ensayo para determinar el contenido de TGF-β1 total. Se aplicaron alícuotas (50 µl) por duplicado a la placa de microtitulación, que después se tapó e incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Después los pocillos se lavaron, se añadió anticuerpo policlonal contra TGF-β1 conjugado con enzima y la incubación continuó durante 1,5 h a temperatura ambiente. Las mediciones se efectuaron como se ha descrito anteriormente. El límite de detección de TGF-β1 fue de 4,61 pg/ml.

20

25

30

*c-EGF*

El EGF se sometió a ensayo usando el kit de ELISA Quantikine (Nº DEG00, R&D Systems, Minneapolis, MN). Las muestras se diluyeron 20 veces en el Diluyente Calibrator (RD6N). En los pocillos se añadieron 200 µl de patrón, control o muestra. Las placas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Cada pocillo se aspiró y se lavó llenando con Tampón de Lavado. A cada pocillo se añadió conjugado de EGF y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron usando el Tampón de Lavado y la Solución de Sustrato (200 µl) se añadió a cada pocillo. La mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y se protegió de la luz. Se añadió Solución de Detención (50 µl) a cada pocillo. Se determinó la densidad óptima de cada pocillo a los 30 minutos, usando un lector de microplaca (lector de microplaca Versa-Max™, Molecular Devices, Estados Unidos) ajustado a 450 nm. La dosis detectable mínima fue de 0,7 pg/ml.

35

40

*d-VEGF*

El VEGF se sometió a ensayo usando el kit de ELISA Quantikine (Nº DVE00 R&D Systems, Minneapolis, MN). Las muestras se diluyeron 2 veces en Diluyente Calibrator (RD6U). La dosis detectable mínima es típicamente menor de 9,0 pg/ml y la MDD media fue de 50 ng/ml, como indica el fabricante. Se añadieron 100 µl de diluyente de ensayo (RD1W) a cada pocillo seguido de 100 µl de patrón (VEGF patrón). Las placas se taparon con tiras adhesivas y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 3 veces y después se incubaron con VEGF conjugado con enzima durante 2 h a temperatura ambiente.

45

*e-IGF-1*

El IGF-1 se cuantificó usando un kit de ELISA Quantikine (Nº DG100, de R&D Systems). Las muestras se diluyeron 100 veces en Diluyente Calibrator (RD5-22). La dosis detectable mínima varió de 0,007 a 0,056 ng/ml y la MDD media fue de 0,026 ng/ml, como indica el fabricante. Se añadieron 150 µl de diluyente de ensayo (RD1-53) a cada pocillo, seguido de 50 µl de patrón (890775). Las placas se taparon con tiras adhesivas y se incubaron durante 2 h a 2-8 °C. Los pocillos se lavaron 3 veces y después se incubaron con IGF-1 conjugado con enzima durante 1 h a 2-8 °C. Las mediciones se efectuaron como se ha descrito anteriormente.

50

55

6-Ensayo de p-selectina

La P-selectina se determinó mediante ensayo ELISA usando kits Quantikine (R&D Systems).

7-Ensayos de proteínas y lípidos

5 En el CP de partida se determinó la proteína total, la albúmina, el colesterol total y los triglicéridos (TG), después de la extracción con aceite y después de la adsorción con carbón vegetal mediante un analizador RocheP800. La IgG, IgM e IgA se midieron usando ensayos inmunoturbidimétricos potenciados con látex completamente automatizados en un Cobas Integra 800 (Roche COBAS INTEGRA 800, RocheDiagnostics, Mannheim, Alemania).

8-Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

10 Se realizó SDS-PAGE en condiciones no reducidas y reducidas usando geles de gradiente del 4-12%, reactivos y sistemas electroforéticos de Invitrogen (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, Estados Unidos). La valoración de masa molecular se realizó usando un Patrón de Peso Molecular de Proteína Previamente Teñido con Novex® Sharp (Invitrogen).

9-Determinación de TnBP y Triton X-45

15 La extracción de las muestras para la determinación de TnBP y Triton X-45 residual se realizó como se ha descrito anteriormente (19). La cuantificación de TnBP se realizó mediante cromatografía de gas (GC-17A, SHIMADZU, Tokio, Japón) y detección por ionización en llama y la del Triton X-45 mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (SHIMADZU) usando una columna LiChrospher 100 RP-18 (DI: 4 mm, longitud: 250 mm, P/N: 724964, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), respectivamente.

**10-Cultivos de células**

20 La capacidad del CP-S/D-OC para estimular el crecimiento celular *in vitro* y reemplazar el SBF se evaluó usando las siguientes líneas celulares: (a) osteoblastos humanos MG63 (ATCC CRL 1427, Bioresource Collection and Research Center, BCRC, Hsingchu, Taiwán) y (b) células epiteliales corneales de conejo del StatensSeruminstitute (SIRC) (ATCC CCL-60, BCRC). La conservación de las líneas celulares fue a 37 °C en una atmósfera controlada que contenía CO<sub>2</sub> al 5%. Se cultivaron a una densidad de 2 x 10<sup>3</sup> células por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano (Greiner bio-one, Tokio, Japón) y usando Medio Esencial mínimo (MEM; Gibco, Invitrogen) que contenía 2,2 g de NaHCO<sub>3</sub>, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml y complementado con FBS al 10% (v/v) (Gibco, Invitrogen). Para los experimentos, primero se dejó que las células se adhiriesen durante 18 horas y después se sometieron a ayuno durante 6 horas en un medio aséptico antes de ensayar los diferentes complementos de FG. Después de dos lavados con medio aséptico, las células se cultivaron durante hasta 5 días en el medio complementado con diversas concentraciones (del 1 al 10%) de CP-S/D-OC (correspondientes a un intervalo de concentración final en TGF-β entre 0,31 y 3,1 ng/ml, respectivamente). Como controles, en cada proceso también se realizaron cultivos celulares sin ninguna proteína/complemento de GF o complementados con SBF al 10%.

**11-Ensayo con MTS**

35 Las células viables en proliferación se determinaron a los 5 días de cultivo usando el ensayo con MTS sal de tetrazolio[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, en el interior de las instrucciones del fabricante (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, Estados Unidos). Este ensayo utiliza soluciones de MTS y un reactivo de acoplamiento a electrones (metosulfato de fenacina) PMS. El MTS se biorreduce por células en un producto de formazán que es soluble en medio de cultivo tisular. La conversión de MTS en formazán está inducida por enzimas deshidrogenasas presentes en células metabólicamente activas. La absorbancia de formazán a 490 nm se midió a partir de placas de ensayo de 96 pocillos y es directamente proporcional a la cantidad de células vivas en el cultivo. Después de la preparación, las soluciones se conservaron en tubos protegidos de la luz a -20 °C. Los reactivos de detección PMS y MTS se mezclaron, usando una proporción de 20:1 (MTS:PMS), inmediatamente antes de la adición al cultivo celular a una proporción de 1:5 (MTS+PMS/medio).

12-Análisis estadístico

50 Los datos se indicaron como media +/- desviación típica (DT). Las comparaciones estadísticas se realizaron con un ensayo de la t de Student de dos colas para muestras relacionadas. Se usó un valor de p menor de 0,05 para evaluar el significado de las diferencias en los parámetros de ensayo medios. Las diferencias se consideraron significativas si el valor de p era <0,05.

II-Resultados

1-Recuentos celulares

El CP de partida tuvo una media de  $1216 \pm 188,6 \times 10^6$  plaquetas/ml (intervalo:  $896 - 1388 \times 10^6$  /ml). Los recuentos medios de leucocitos y eritrocitos fueron de  $0,32 \pm 0,10$  (intervalo:  $0,20 - 0,4$ )  $\times 10^6$ /ml y de  $0,04 \pm 0,01$  (intervalo:  $0,02 - 0,06$ )  $\times 10^9$ /ml, respectivamente. No pudieron detectarse células sanguíneas en ninguna de las fracciones posteriores al tratamiento con S/D.

5 2-Determinación de la proporción óptima de carbón vegetal

Experimentos preliminares indicaron que el tratamiento con carbón vegetal, a las diversas proporciones ensayadas, eliminó los agentes S/D pero también redujo drásticamente el contenido de PDGF-AB y VEGF. Por lo tanto se realizaron ensayos en los que cantidades en aumento de carbón vegetal (1,5; 3; 3,5; o 4 g) se mezclaron con 20 ml de CP-S/D-O. El TnBP residual fue  $< 2$  ppm en todas las proporciones evaluadas, mientras que el Triton X-45 residual fue de 9, 3, 2 y 1,5 ppm, respectivamente. La Figura 2 muestra un impacto típico del tratamiento con carbón vegetal de una fracción de CP-S/D-O sobre el contenido de PDGF-AB, TGF- $\beta$ 1, EGF, VEGF e IGF-1. La concentración en TGF- $\beta$ 1, EGF e IGF-1 permaneció esencialmente invariable, mientras que el contenido de PDGF-AB y VEGF se redujo drásticamente en todas las proporciones evaluadas. Por lo tanto, para experimentos posteriores, se seleccionó la proporción de 1,5 g de carbón vegetal por 20 ml de CP-S/D-O que permitió reducir el TnBP y el Triton X-45 a un valor menor de 10 ppm.

3-Composición de las diversas fracciones

En la Tabla 1 se muestra el impacto del tratamiento con carbón vegetal (media de 4 experimentos) usando 19,9 g de carbón vegetal para 265 ml de un extracto de CP-S/D-O (correspondiente a la proporción seleccionada de 1,5 g/20 ml) sobre el contenido en GF, p-selectina, proteínas, colesterol y TG. La concentración de TGF- $\beta$ 1, IGF y EGF permaneció esencialmente constante después de la extracción con aceite y adsorción con carbón vegetal (aproximadamente 368, 55, y 2,4 ng/ml, respectivamente). La recuperación global promedio del FG en el CP-S/D-OC, en comparación con el contenido detectado en el CP-S/D-O fue de 81,5, 94 y 83,8% para TGF- $\beta$ 1, EGF e IGF, respectivamente. Por otro lado, la concentración media en PDGF y VEGF disminuyó significativamente ( $p < 0,01$ ) durante el tratamiento con carbón vegetal (aproximadamente 2,31 ng/ml y  $< 0,009$  ng/ml, respectivamente), confirmando las observaciones realizadas durante los experimentos a pequeña escala. El contenido de p-selectina no se vio muy afectado por el tratamiento con carbón vegetal, solo con una menor disminución. La concentración media en albúmina, IgG, IgA, IgM permaneció esencialmente invariable pero se observó una pequeña disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en el contenido en fibrinógeno. La media de colesterol y de contenido en TG permaneció estable. La media de TnBP disminuyó de aproximadamente 738 ppm a 8,7 ppm y la de Triton X-45 de 2628 ppm a 8,8 ppm ( $p < 0,001$ ).

Tabla 1. Composición de concentrado plaquetario tratado con S/D después de extracción con aceite (CP-S/D-O) y después tratamiento con carbón vegetal (CP-S/D-OC) (N = 4)

Parámetro	CP-S/D-O	CP-S/D-OC
<b>Factores de crecimiento, ng/ml</b>		
PDGF-AB	59,9 $\pm$ 2,9	2,3 $\pm$ 0,52**
TGF- $\beta$ 1	452,0 $\pm$ 17,69	368,4 $\pm$ 24,6
EGF	2,56 $\pm$ 0,1	2,41 $\pm$ 0,1
IGF	64,5 $\pm$ 1,1	54,7 $\pm$ 4,1
VEGF	0,21 $\pm$ 0,03	< 0,009
<b>P-selectina</b>	273,9 $\pm$ 5,0	262,5 $\pm$ 4,3*
<b>Proteínas, mg/ml</b>		
Proteína total	60,3 $\pm$ 0,5	60,0 $\pm$ 0,08
Albúmina	38,7 $\pm$ 0,38	40,0 $\pm$ 0,08
IgG	8,2 $\pm$ 0,4	8,5 $\pm$ 0,04
IgM	0,79 $\pm$ 0,05	0,87 $\pm$ 0,02
IgA	1,49 $\pm$ 0,11	1,67 $\pm$ 0,1
Fibrinógeno	4,5 $\pm$ 0,3	2,65 $\pm$ 0,7
<b>Componentes lipídicos, mg/ml</b>		
Colesterol	15,0 $\pm$ 2,0	15,75 $\pm$ 2,6
TG	20,7 $\pm$ 3,5	20,7 $\pm$ 3,3

(continuación)

Parámetro	CP-S/D-O	CP-S/D-OC
<b>Agentes S/D, ppm</b>		
TnBP	738,3 ± 226,4	8,7 ± 3,5***
Triton X-45	2628 ± 75	8,8 ± 1,3***
* p < 0,05; ** p<0,01; *** p < 0,001		

## 4-SDS-PAGE

5 El análisis de SDS-PAGE (Figura 3) en condiciones reducidas (A) y no reducidas (B) no reveló cambios detectables en el perfil de las proteínas en el CP de partida (1), CP-S/D-O (2) y CP-S/D-OC (3), poniéndose de manifiesto bandas de proteína principales correspondientes a la masa molecular de fibrinógeno no reducido (a), IgG no reducida (b) y albúmina (c).

## 5-Cultivos celulares

10 Los resultados de los ensayos con MTS (N=3) se muestran en la Figura 4A (MG63) y B (SIRC). El crecimiento celular fue alto cuando las dos líneas celulares se cultivaron en el medio complementado con SBF al 10% (v/v) (a) pero se redujo significativamente (p<0,05) en el control sin SBF (b). El crecimiento también fue significativamente mayor (p<0,05) que en el control cuando para ambas líneas celulares el medio se complementó con del 1 al 10% de CP-S/D-OC. Los valores MTS de las células MG63 en presencia de CP-S/D-OC al 1% fueron menores que los de en presencia de SBF al 10% pero similares a concentraciones entre el 3 y el 10%. El crecimiento de las células SIRC no fue significativamente diferente en presencia del CP-S/D-OC al 1% y SBF al 10% pero fue significativamente mayor (p<0,05) cuando se usaba una cantidad en aumento de CP-S/D-OC del 3 al 10%. La morfología de las células de ambas líneas celulares fue normal cuando se cultivaron en presencia de SBF al 10% o CP-S/D-OC al 1-10%.

15

**REIVINDICACIONES**

1. Un lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento empobrecido en PDGF y VEGF.
2. El lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende los factores de crecimiento TGF- $\beta$ , IGF y EGF.
- 5 3. El lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que:
  - el nivel de PDGF-AB es menor que 3 ng/ml de dicho lisado; y/o
  - el nivel de VEGF es menor que 0,01 ng/ml de dicho lisado; y/o
  - 10 - el nivel de TGF- $\beta$  es mayor que 50, más preferentemente mayor que 100, más preferentemente mayor que 150, más preferentemente mayor que 200, más preferentemente mayor que 250 ng/ml de dicho lisado; y/o
  - el nivel de EGF es mayor que 0,5, más preferentemente mayor que 1, más preferentemente mayor que 1,5, más preferentemente mayor que 2, más preferentemente mayor que 2,5 ng/ml de dicho lisado; y/o
  - el nivel de IGF es mayor que 20, más preferentemente mayor que 50, más preferentemente mayor que 100 ng/ml de dicho lisado.
- 15 4. Un procedimiento para preparar un lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento empobrecido en PDGF y VEGF que comprende las siguientes etapas:
  - a) poner en contacto un concentrado plaquetario de partida con un disolvente y/o un detergente,
  - b) incubar dicho concentrado plaquetario de partida con el disolvente y/o detergente
    - 20 - durante un periodo de al menos 5 minutos a 6 horas,
    - a un pH mantenido en un intervalo de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,0, y
    - a una temperatura dentro del intervalo de 2 °C a 50 °C,
  - c) retirar opcionalmente el disolvente y/o el detergente mediante extracción con aceite y obtener una fase de proteína acuosa; e
  - 25 d) incubar con carbón vegetal el concentrado plaquetario tratado con el disolvente y/o el detergente de la etapa b) o la fase de proteína acuosa de la etapa c).
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicho disolvente está seleccionado en el grupo que consiste en di- o trialquilfosfatos, di o trialquilfosfatos con diferentes cadenas alquilo y es preferentemente el tri-n-butilfosfato (TnBP).
- 30 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en el que dicho detergente está seleccionado del grupo que consiste en derivados de polioxietileno de ácidos grasos, ésteres parciales de anhídridos de sorbitol, detergente no iónicos, desoxicolato sódico y sulfobetaínas y es preferentemente Triton X-45<sup>®</sup>, Triton X-100<sup>®</sup> o Tween 80<sup>®</sup>.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la concentración de cada uno de dicho disolvente y/o dicho detergente en la etapa b) varía del 0,2 al 5% en volumen con respecto al volumen del concentrado plaquetario de partida.
- 35 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que la extracción con aceite se realiza con un aceite de calidad farmacéutica, usándose el aceite en una cantidad del 2 al 20% en peso o del 5 al 15% en peso o del 5 al 10% en peso, en base al peso de la mezcla del concentrado plaquetario con el disolvente y/o el detergente.
- 40 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que
  - cuando la extracción con aceite de la etapa c) se realiza, la extracción con carbón vegetal se realiza sobre la fase de proteína acuosa de la etapa c), con carbón vegetal en una cantidad que varía de 50 a 250 g/l, preferentemente de 55 a 200 g/l, o de 60 a 150 g/l, o de 65 a 100 g/l de dicha fase proteína acuosa; y
  - 45 - cuando no se realiza la extracción con aceite, la extracción con carbón vegetal se realiza sobre el concentrado plaquetario tratado con el disolvente y/o el detergente de la etapa b), con carbón vegetal en una cantidad que varía de 250 a 1250 g/l, preferentemente de 275 a 1000 g/l, o de 300 a 750g/l, o de 325 a 500 g/l de dicha fase de proteína acuosa.
- 50 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en el que el carbón vegetal activado adsorbe el azul de metileno en el intervalo de 100 a 550, y preferentemente de 300 a 500 g/m<sup>2</sup> o de 100 a 300 g/m<sup>2</sup> de carbón vegetal activado.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, que adicionalmente comprende al menos una etapa de centrifugación después de la etapa de extracción con aceite c) y/o después de la incubación con carbón vegetal de la etapa d).



12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, que adicionalmente comprende una etapa (e) de purificación cromatográfica y/o de ultrafiltración y/o de nanofiltración.
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 12, que adicionalmente comprende una etapa preliminar de preparación de un concentrado plaquetario de partida antes de dicha etapa a), preferentemente por aféresis o por aislamiento de la capa leucocitoplaquetaria de sangre completa.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13, en el que el concentrado plaquetario de partida de la etapa a) se obtiene a partir de un conjunto de concentrados plaquetarios.
15. Un lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento empobrecido en PDGF y VEGF que puede obtenerse mediante el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 14.
16. El lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento empobrecido en PDGF y VEGF obtenido mediante el procedimiento de una cualquiera de las 4 a 15 o el lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento empobrecidos en PDGF y VEGF de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en cosmética, para su uso para promover la regeneración o la reconstitución ósea, o para su uso en el tratamiento de un hueso fracturado.
17. El lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento empobrecido en PDGF y VEGF que puede obtenerse mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 14 o el lisado plaquetario viralmente inactivado que contiene factores de crecimiento empobrecidos en PDGF y VEGF de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el cultivo celular *in vitro* o *ex vivo* y preferentemente para promover la diferenciación de células madre hacia un linaje osteoblástico y/o condrocítico.

20

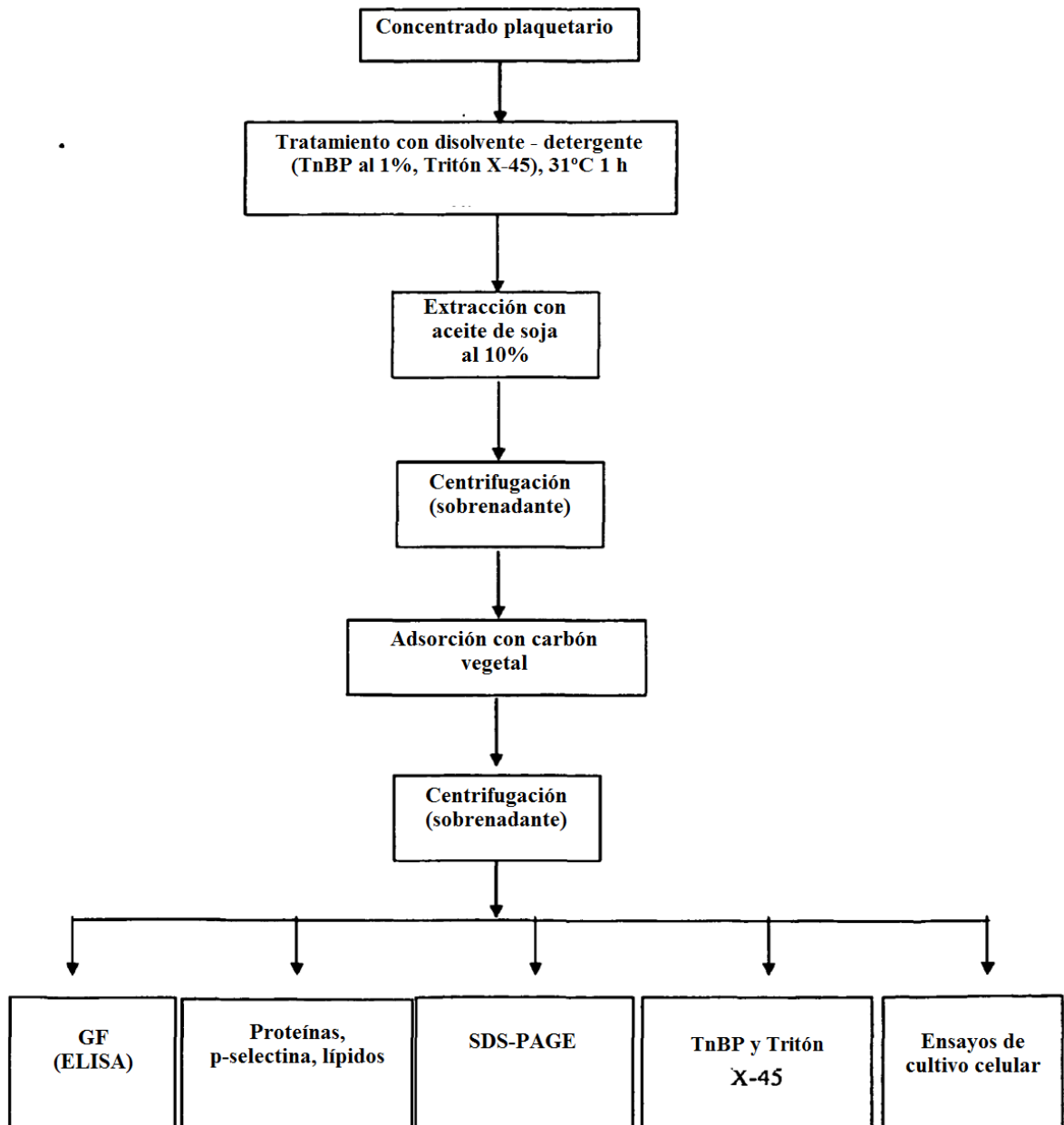


Figura 1



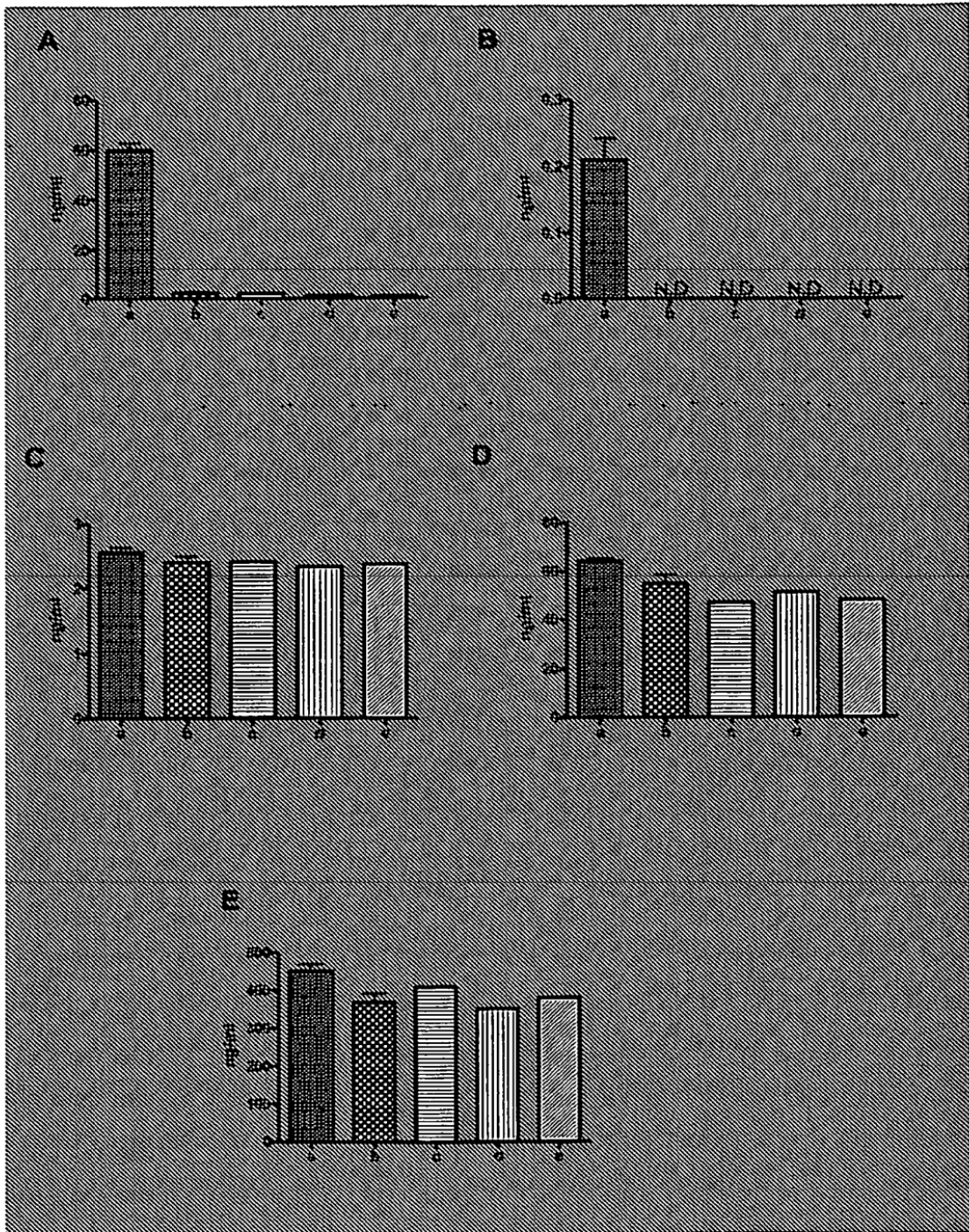


Figura 2



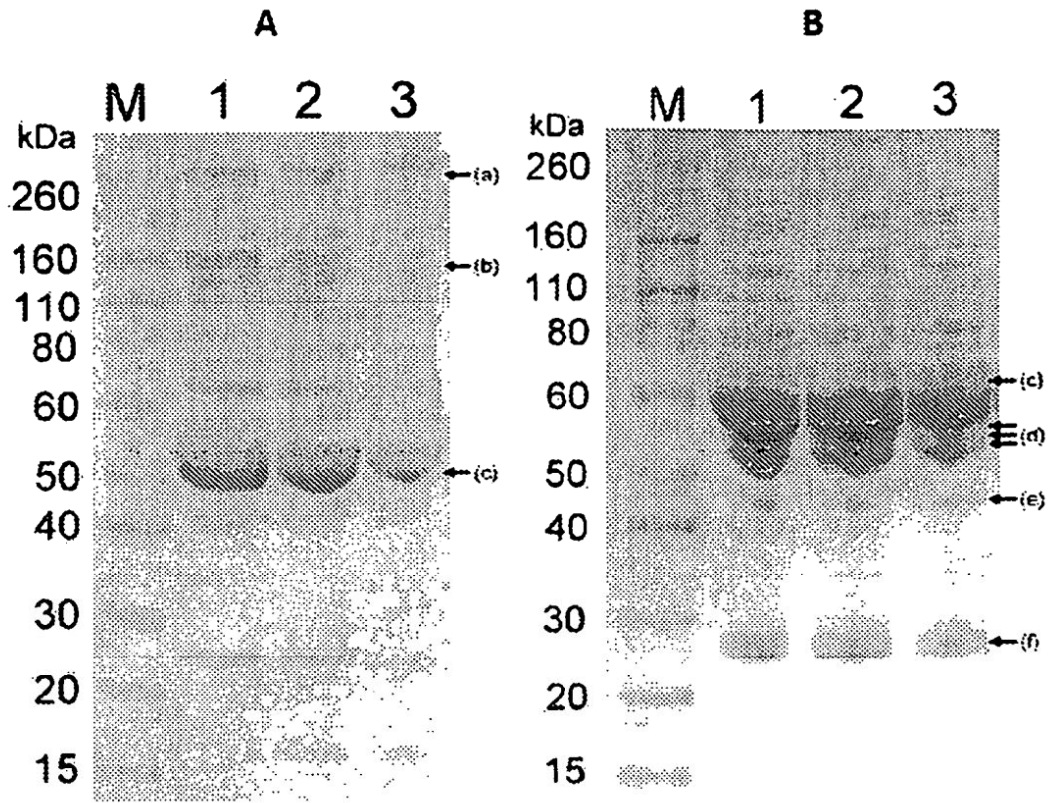


Figura 3



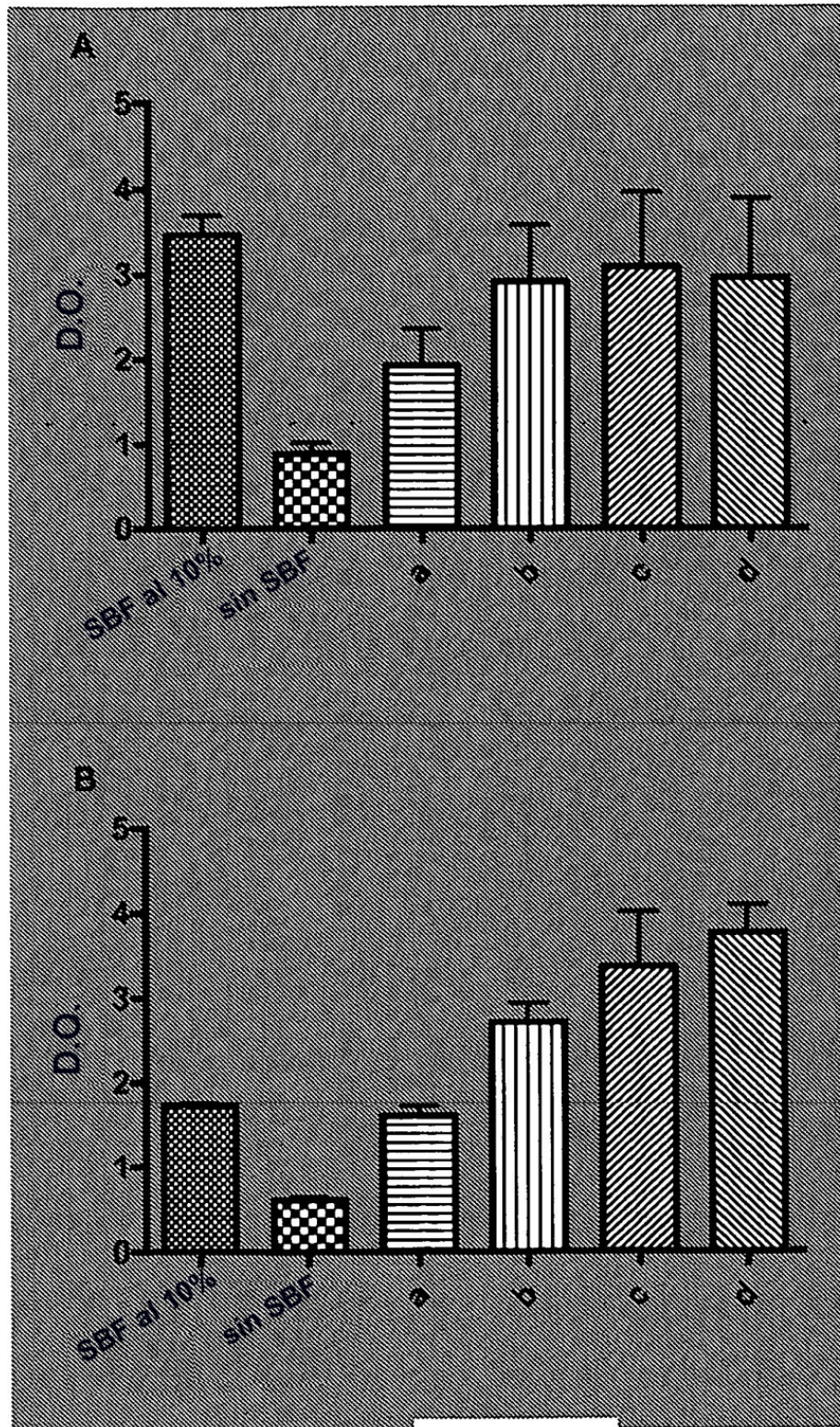


Figura 4