

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 513 391**

51 Int. Cl.:

A61K 38/36 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

C07K 1/14 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2009 E 09700993 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.07.2014 EP 2249862**

54 Título: **Procedimiento de producción de un concentrado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas**

30 Prioridad:

07.01.2008 EP 08290011

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

27.10.2014

73 Titular/es:

**ZHENG YANG BIOMEDICAL 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-YOA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 513 391 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).

Procedimiento de producción de un concentrado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas**DESCRIPCIÓN****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere al campo de los derivados de plaquetas y más específicamente al campo de los concentrados de factores de crecimiento que se obtienen a partir de plaquetas. La presente invención también se refiere a procedimientos de preparación de tales concentrados de factores de crecimiento.

10 ANTECEDENTES

Se han estudiado mecanismos y rutas que gobiernan la cicatrización de tejido y regeneración de tejido en gran detalle, que muestran en particular que los acontecimientos celulares y moleculares resultantes después de una lesión traumática son principalmente compartidos por los diferentes tejidos del cuerpo. Así, un mecanismo común incluye fases de inflamación tempranas y tardías, proliferación y migración de célula, angiogénesis, formación de tejido por granulación y finalmente formación y remodelación de matriz.

De forma interesante, esta cascada de acontecimientos se inicia inmediatamente después de la lesión por la formación de un coágulo de sangre caracterizado por fibrina reticulada y mediante una variedad de proteínas tales como vitronectina, fibronectina y trombospondina, que previene adicionalmente la hemorragia, y sirve de matriz para invadir células mientras que proporcionan al mismo tiempo una barrera contra patógenos invasores. Además, este coágulo de partida actúa de depósito de derivados de células que se requieren durante las etapas tardías del proceso de curación.

Se supone en particular que todas las fases del proceso de reparación de tejido están mediadas y controladas por una amplia variedad de factores, citocinas y proteínas que modulan la función celular mediante interacciones físicas directas con dominio extracelular de receptores transmembrana. Los últimos transducen señales secundarias, controlando así diversos aspectos de la biología subcelular. Aunque la función de todos los componentes que participan en la regeneración de tejido se esclarece solo parcialmente, se han demostrado los posibles beneficios de muchos de ellos, especialmente para derivados de plaquetas, y más particularmente para factores de crecimiento derivados de plaquetas. Los factores de crecimiento derivados de plaquetas son particularmente conocidos por presentar propiedades quimiotácticas y mitogénicas y parecen participar directamente en la curación y regeneración de tejido blando y duro tal como quimiotaxia, proliferación celular, angiogénesis, deposición de matriz extracelular y remodelación y en la potenciación de la proliferación celular. Además, los derivados de plaquetas también participan indirectamente en funciones biológicas estrechamente relacionadas tales como la estimulación de la producción de quimiocinas y citocinas por células inocentes tales como fibroblastos, macrófagos, células endoteliales o linfocitos.

Por tanto, las preparaciones enriquecidas en plaquetas, además de geles, pegamentos y concentrados de plaquetas, se usan cada vez más solas o en combinación con biomateriales de injerto, como fuente de derivados de plaquetas o factores de crecimiento de plaquetas para diversas aplicaciones clínicas o terapéuticas.

Se ha encontrado que tales preparaciones que contienen o derivadas de plaquetas son particularmente beneficiosas para tratar defectos de huesos largos, craneoplastias complejas y heridas crónicas, por ejemplo, en cirugía oral y maxilofacial, ortopédica, periodóntica y plástica, además de en el tratamiento de úlceras crónicas, regeneración de hueso y tejido blando en odontología e implantología oral, y en el tratamiento de afecciones musculoesqueléticas.

Además, se mostró que los concentrados de plaquetas eran de particular interés para la expansión *ex vivo* y diferenciación de citoblastos mesenquimatosos, además de para acelerar la proliferación de condrocitos, células endoteliales y fibroblastos, soportando así perspectivas de expansión de beneficios terapéuticos para la regeneración y cicatrización de cartilago.

Las preparaciones tópicas derivadas de plaquetas, tales como geles, pegamentos y concentrados, se preparan normalmente mezclando concentrados de plaquetas con un activador que puede inducir la liberación del contenido de los gránulos de plaquetas e imitar la activación fisiológica de plaquetas. La etapa de activación se realiza generalmente por la adición directa de trombina exógena o mediante el uso de cloruro de calcio (CaCl_2), que contrarrestan los efectos del anticoagulante añadido durante la recogida de sangre o plaquetas, y desencadenan la cascada de coagulación y la liberación de trombina endógena. La trombina endógena y exógena también inducen la polimerización de fibrinógeno y la formación de un biomaterial basado en fibrina (un coágulo), conduciendo así a la posterior liberación de una mezcla polifacética de componentes atrapados en plaquetas, que comprenden, por ejemplo, diversos factores de crecimiento de plaquetas.

Más recientemente se desarrollaron nuevos enfoques que consisten en la producción de factores de crecimiento de plaquetas recombinantes en sistemas de expresión convencionales, tales como Regranex (PDGF-bb humano) (Janssen Cilag Internat.). Sin embargo, el número de factores de crecimiento recombinantes disponibles sigue siendo extremadamente limitado, que es en parte debido a la dificultad para aislar, identificar, clonar y expresar

estos factores de crecimiento. Además, la preparación derivada de plaquetas todavía proporciona un beneficio complementario con respecto al uso de factores recombinantes individuales, ya que puede observarse un efecto sinérgico de la combinación de factores de crecimiento.

Uno de los principales inconvenientes de las preparaciones que contienen plaquetas o derivadas de plaquetas existentes pertenece a la falta de normalización y definición adecuada de tales preparaciones, que ha conducido a variabilidad en las características de productos enriquecidos en plaquetas con efectos terapéuticos variables. De hecho, la simple suposición de que la concentración de plaquetas predice el nivel de factores de crecimiento en derivados de plaquetas no es evidente, ya que las características técnicas de los procedimientos usados para recoger y/o para activar plaquetas afectan el contenido de los factores de crecimiento y los efectos clínicos resultantes. La heterogeneidad de los productos resultantes podría depender, por ejemplo, de parámetros tan diferentes como la concentración de plaquetas, presencia de glóbulos sanguíneos blancos en el material de partida, tipo, edad y condiciones de almacenamiento del material de partida y medios de activación. Así, es bastante obvio que estas variables conducen a importantes diferencias entre productos y, a su vez, a distintas propiedades biológicas y eficacia clínica tal como la capacidad de curación.

Por ejemplo, cuando disoluciones/geles que contienen plaquetas intactas se cargan directamente sobre el sitio de la herida, la activación de plaquetas se asocia a una rápida formación de un coágulo de fibrina, pero, también, a una lisis incompleta de las plaquetas. Así, una cantidad variable de plaquetas intactas sigue atrapada dentro del coágulo de fibrina, dificultando así determinar la cantidad real de factores de crecimiento liberados.

Además, cuando se obtienen geles de plaquetas y/o preparaciones de factores de crecimiento por un proceso de activación de trombina que produce la activación de plaquetas, estos derivados de plaquetas se agotan completamente en fibrinógeno y ya no son coagulables, requiriendo así mezclarse con productos naturales o sintéticos exógenos antes de aplicarse sobre el sitio de la herida.

Además, la mayoría de los derivados de plaquetas tópicos terapéuticos se preparan a partir de fuentes autólogas. Esto significa que los concentrados de plaquetas autólogos se preparan para aplicaciones de diagnóstico de inmediato de sangre donada por el paciente algunas horas o algunos días antes de la cirugía. Así su uso se reserva ampliamente para cirugías planeadas que requieren un volumen limitado de gel de plaquetas y para pacientes suficientemente sanos para donar sangre. Además, la fabricación de preparaciones autólogas en el sitio quirúrgico tiene la desventaja de llevarse a cabo frecuentemente bajo condiciones escasamente controladas que, por tanto, carecen de la normalización necesaria para garantizar la liberación y eficacia clínica de factores de crecimiento reproducibles.

Por tanto, también existe una fuerte necesidad de un procedimiento que permita la preparación anticipada de derivados de plaquetas, y más específicamente de concentrados de factores de crecimiento de plaquetas bajo condiciones normalizadas, haciendo así posible formular una preparación adaptada para cada situación fisiopatológica específica.

Además, otro inconveniente importante de los productos derivados de plaquetas existentes pertenece a la presencia inevitable de glóbulos sanguíneos intactos o de fragmentos de glóbulos sanguíneos importantes, desencadenando así el desarrollo de una respuesta inmunitaria con anticuerpos dirigidos hacia antígenos donantes cuando los productos derivados de plaquetas son de fuente heteróloga. Las respuestas inmunitarias a antígenos alogénos pueden producir graves consecuencias, tales como aquellas observadas con reacciones de transfusión, e incluyen, por ejemplo, aloinmunización y complicaciones hemolíticas en pacientes.

Además, otro inconveniente importante de los productos derivados de plaquetas existentes pertenece a los riesgos infecciosos inevitables asociados al uso de productos biológicos. De hecho, a pesar del alto nivel de seguridad de concentrados de plaquetas alogénas humanas de un único donante que se prueban por tecnologías modernas en países con entorno legislativo altamente desarrollado y servicios de extracción de sangre, y aunque los procedimientos de los bancos de sangre convencionales tales como aféresis o preparación de plaquetas a partir de sangre completa garantizan condiciones de preparación estériles en la medida de lo posible, todavía es susceptible a que se produzcan transmisión viral y bacteriana con el uso de derivados de plaquetas. Así, la inocuidad viral de los derivados de plaquetas y de factores de crecimiento de plaquetas es altamente deseable para garantizar el óptimo margen de seguridad viral de preparaciones de plaquetas alogénas para uso tópico.

Finalmente, el envejecimiento de la población y el aumento del número de enfermedades crónicas plantean un problema sanitario importante y cada vez mayor que tendrá que ser tratado en un futuro cercano. Aunque ya existe una amplia variedad de tratamientos terapéuticos, que incluyen, por ejemplo, cirugía, administración de antibióticos, suplementación nutricional o injertos de tejido, hay una necesidad cada vez mayor de componentes altamente eficaces y económicamente atractivos que van a usarse en la cicatrización de tejido y en la regeneración de tejido.

Los inventores han encontrado ahora sorprendentemente y después de una amplia investigación que estos objetivos pueden alcanzarse con el concentrado coagulable descrito más adelante en el presente documento de factores de crecimiento de plaquetas y con el procedimiento de preparación del mismo.

El procedimiento de la invención permite en particular la fácil, rápida y eficaz preparación de derivados de plaquetas, y más particularmente de concentrado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas, a partir de un concentrado de plaquetas de partida o una mezcla de concentrados de plaquetas. En particular, el procedimiento de la invención aumenta significativamente la recuperación de todos los factores de crecimiento de plaquetas, al menos de los más importantes, y más particularmente de los factores de crecimiento PDGF, TGF- β y EGF, cuando se compara con otros procedimientos desvelados en el estado de la materia.

Además, el procedimiento de la invención permite la disolución de membranas lipídicas, inactivando así los virus envueltos en lípidos, y otros patógenos como, por ejemplo, bacterias y parásitos tales como protozoos, además de la eliminación de lípidos del plasma y de las plaquetas que están presentes en el concentrado de plaquetas de partida.

El procedimiento de la presente invención hace así posible proporcionar concentrados de factores de crecimiento de plaquetas coagulables viralmente inactivados que podrían normalizarse eficazmente para su uso en tratamientos terapéuticos o terapia de células.

Considerando el hecho de que, en parte, debido al riesgo de contaminación bacteriana, las plaquetas tienen una estabilidad en almacén limitada de 5 ó 7 días, cuando se usan clínicamente intravenosamente para la corrección de trombocitopenia cuantitativa o funcional, un alto número de unidades de plaquetas de más de 5 ó 7 días se desechan normalmente cada año. Permitiendo que las reservas de plaquetas caducadas se usen para la preparación de concentrados derivados de plaquetas, el procedimiento de la invención finalmente revela un interés económico extremadamente prometedor.

RESUMEN DE LA INVENCION

LA PRESENTE INVENCION SE DEFINE POR LAS REIVINDICACIONES. La presente solicitud describe un concentrado coagulable viralmente inactivado de factores de crecimiento de plaquetas adecuados para uso terapéutico y/o cosmético que puede obtenerse a partir de una mezcla no activada de concentrados de plaquetas, en la que se han inactivado virus no encapsulados y encapsulados, y que comprende tanto fibrinógeno como factor XIII, estando dicho concentrado libre de plaquetas intactas.

Preferentemente, este concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable comprende los factores de crecimiento PDGF, TGF- β , IGF, EGF, CTGF, bFGF y VEGF.

Preferentemente, dicho concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable no induce reacciones de transfusión relacionadas con las células sanguíneas.

Preferentemente, dicho concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable comprende al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en fibronectina, vitronectina, trombospondina, factor de von Willebrand y los factores de coagulación II, V, VII, VIII, IX, X y XI.

Un objetivo de la presente invención es un procedimiento de preparación de un concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable que contienen tanto fibrinógeno como factor XIII, que comprende las siguientes etapas:

a) poner en contacto un concentrado de plaquetas de partida no activado con un disolvente y/o un detergente, en el que dicho disolvente está seleccionado preferentemente del grupo que consiste en fosfatos de di- o triálquilo, fosfatos de di- o triálquilo con diferentes cadenas de alquilo, y es preferentemente el fosfato de tri-n-butilo (TnBP), en el que dicho detergente está seleccionado preferentemente 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 es más preferentemente Triton X-45, Triton X-100 o Tween 80, y en el que la concentración final de cada uno de dicho disolvente y/o de dicho detergente oscila preferentemente del 0,2 al 5 % en volumen con respecto al volumen del concentrado de plaquetas de partida;

b) incubar dicho concentrado de plaquetas de partida con el disolvente y/o detergente 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, y

c) eliminar el disolvente y/o el detergente por extracción con aceite y/o medios cromatográficos, en el que la extracción con aceite se realiza preferentemente con un aceite de calidad farmacéutica, estando el aceite usado en una cantidad del 2 al 20 % en peso, o del 5 al 15 % en peso o del 5 al 10 % en peso, basado en el peso de la mezcla del concentrado de plaquetas con el disolvente y/o el detergente, y en el que los medios cromatográficos comprenden preferentemente una columna hidrófoba (fase inversa), preferentemente un material de empaquetamiento de sílice C18 o una SDR (eliminación de disolvente-detergente) hyper D, o una columna cromatográfica de adsorción tal como una columna cromatográfica

aniónica y/o catiónica; comprendiendo dicho procedimiento otra etapa de inactivar virus no envueltos, en el que esta etapa se realiza por nanofiltración, preferentemente usando una membrana de filtración de 10 a 75 nm de tamaño de poro.

Un objetivo de la presente invención es un procedimiento de preparación de un concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable según las reivindicaciones y que comprende las etapas de poner en contacto un concentrado de plaquetas con un disolvente y/o un detergente, incubar dicho concentrado de plaquetas con el disolvente y/o detergente 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, preferentemente dentro del intervalo de 25 °C a 45 °C, y eliminar el disolvente y/o el detergente por extracción con aceite y/o medios cromatográficos.

En una realización preferida, el disolvente usado en el procedimiento de la invención está seleccionado del grupo que consiste en fosfatos de di- o trialquilo, fosfatos de di- o trialquilo con diferentes cadenas de alquilo, y es preferentemente el fosfato de tri-n-butilo (TnBP).

En una realización preferida, el detergente usado en el procedimiento de la invención está seleccionado del grupo que consiste en derivados de polioxietileno de ácidos grasos, ésteres parciales de anhídridos de sorbitol, detergentes no iónicos, desoxicolato sódico y sulfobetaínas, 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 final de cada uno de dicho disolvente y/o de dicho detergente usado en el procedimiento de la invención oscila del 0,2 al 5 %, preferentemente del 0,2 al 2 % en volumen con respecto al volumen del concentrado de plaquetas de partida. En una realización preferida del procedimiento de la invención, el concentrado de plaquetas de partida se pone en contacto tanto con el 2 % de TnBP solo, como con el 1 % de TnBP y 1 % de Triton X-45, basado en el volumen del concentrado de plaquetas.

Además, en una realización preferida de la presente invención, la extracción con aceite se realiza con un aceite de calidad farmacéutica, estando el aceite usado en una cantidad del 2 al 20 % en peso, o del 5 al 15 % en peso o del 5 al 10 % en peso, basado en el peso de la mezcla del concentrado de plaquetas con el disolvente y/o el detergente.

En otra realización preferida, medios cromatográficos, tales como aquellos que comprenden material de empacamiento de sílice C18, o SDR (eliminación de disolvente-detergente) Hyper D, se usan para eliminar el disolvente y/o el detergente.

En un caso de la presente divulgación, la nanofiltración similar a una membrana de filtración de 10 a 75 nm de tamaño de poro, se hace usando membranas de eliminación viral.

En otra realización preferida, el procedimiento de la invención comprende además una etapa de ultrafiltración diseñada para concentrar los factores de crecimiento y el fibrinógeno coagulable a los niveles óptimamente adaptados a aplicaciones terapéuticas o terapia con células, usando membranas de ultrafiltración de un valor de corte de 5000 Dalton o menos.

En una realización preferida, el procedimiento de la invención comprende una etapa preliminar que consiste en preparar un concentrado de plaquetas de partida, siendo dicho concentrado de plaquetas de partida preparado por aféresis o por aislamiento de capa leucocitaria de sangre completa, y siendo tanto líquido fresco, caducado como almacenado o congelado caducado y almacenado.

La presente solicitud también describe un procedimiento de formación de un coágulo que consiste en mezclar el concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable de la invención u obtenido mediante el procedimiento de la invención con trombina. Preferentemente, la trombina usada en dicho procedimiento de formación de un coágulo es de origen humano. En una realización particular, 0,1 a 1 volumen de trombina, cuya actividad oscila de 20 UI/ml a 1000 UI/ml, se mezcla con 1 volumen del concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable de la invención u obtenido mediante el procedimiento de la invención.

En otra realización preferida, medios cromatográficos, tales como aquellos del tipo hidrófobo, por ejemplo, que comprenden material de empacamiento de sílice C18, o SDR (eliminación de disolvente-detergente) Hyper D, se usan para eliminar el disolvente y/o el detergente; también puede usarse cromatografía tipo SD y/o DEAE (cromatografía aniónica/catiónica) para eliminar el disolvente y/o el detergente.

La presente solicitud describe un producto farmacéutico o un andamiaje que comprende el concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención.

Otro objetivo de la presente divulgación es un uso cosmético del concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable de la invención u obtenido mediante el procedimiento de la invención.

Otro objetivo de la presente divulgación es un concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable de la invención u obtenido mediante el procedimiento de la invención para su uso en regenerar hueso, o para curar tejido blanco y duro.

- 5 La presente solicitud también describe el uso del concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención para formar un coágulo, o para la regeneración o cicatrización de hueso, o para el cultivo celular *in vitro* o *ex vivo*.

FIGURAS

10 **Figura 1:** Diseño del estudio: Se dividieron donaciones de plaquetas por aféresis (N=8) en dos sub-mezclas. La sub-mezcla 1 se trató directamente con 1 % de TnBP-1 % de Triton X-45 durante 1 h sin activación por CaCl_2 previa. La sub-mezcla 2 se activó primero por CaCl_2 23 mM y perlas para formar un gel de plaquetas. Después de 1 h de incubación, el coágulo se eliminó y los concentrados se trataron por 1 % de TnBP-1 % de Triton X-45 durante 1 h. Ambas disoluciones tratadas con S/D (disolvente-detergente) se extrajeron por aceite (3 veces) para eliminar el disolvente y detergente. El contenido de los factores de crecimiento se determinó en las plaquetas de partida, después de la activación, y después del tratamiento con S/D-extracciones con aceite.

15 **Figura 2:** Contenido (ng/ml) en (A) PDGF-AB; (B) TGF- β 1; (C) EGF; y (D) IGF en el concentrado de plaquetas de partida (inicial), después del tratamiento con S/D directo (1 % de TnBP-1 % de Triton X-45) (S/D), después de activación por CaCl_2 del concentrado de plaquetas de partida (activado) y tratamiento con S/D (1 % de TnBP-1 % de Triton X-45) de los concentrados de plaquetas activados con CaCl_2 (activados + S/D). El tratamiento con S/D se realizó como se describe en Material y procedimientos e incluyó 3 extracciones con aceite para eliminar los agentes de S/D.

20 **Figura 3:** Contenido (ng/ml) en (A) PDGF-AB; (B) TGF- β 1; y (C) EGF en el concentrado de plaquetas de partida (inicial), después de la activación por CaCl_2 del concentrado de plaquetas de partida (Act) seguido de activación con trombina bovina (Act-T) y tratamiento con S/D (1 % de TnBP-1 % de Triton X-45) (Act T-S/D). El tratamiento con S/D se realizó como se describe en Material y procedimientos e incluyó 3 extracciones con aceite para eliminar los agentes de S/D.

25 **Figura 4:** Comparación de la composición de proteína entre el concentrado de plaquetas de partida (carril 1), el mismo concentrado de plaquetas tratado por el procedimiento de disolvente-detergente según la invención (carril 2) y el mismo concentrado de plaquetas después de la activación por CaCl_2 (carril 3). Las muestras se separaron por SDS-PAGE sobre un gel al 4 %-12 % y las proteínas se colorearon por tinción con Coomassie. El carril M se corresponde con el marcador de proteína (los tamaños en kilodalton se indican a la izquierda del gel).

30 **Figura 5:** Composición comparada en PDGF-AB (Fig. 5a) y EGF (Fig. 5b) de concentrados, respectivamente, obtenidos de plaquetas congeladas caducadas sometidas a: tratamiento con S/D (1 % de TnBP-1 % de Triton X-45) (S/D-PC), a activación por CaCl_2 (Act-PC) u, opcionalmente, a activación por CaCl_2 seguido de tratamiento con S/D (Act-PC + S/D)

35 **Figura 6:** Composición comparada en IGF-1 (Fig. 6a) y TGF- β 1 (Fig. 6b) de un concentrado, respectivamente, obtenido de plaquetas congeladas caducadas sometidas a: tratamiento con S/D (1 % de TnBP-1 % de Triton X-45) (S/D-PC) o a activación por CaCl_2 (Act-PC).

40 **Figura 7:** Contenido de PDGF-AB residual (en ng/ml) en los sobrenadantes después de las pruebas de Adsorción sobre diversos geles cromatográficos (CM, SP y DEAE). Para cada gel, los resultados mostrados se corresponden respectivamente, de izquierda a derecha, con una relación de 3 ml, 6 ml, 9 ml o 10 ml de S/D-PC por 1 ml de gel.

45 **Figura 8:** % de adsorción de VEGF sobre diversos geles cromatográficos (CM, SP y DEAE).

50 **Figura 9:** % de adsorción de TGF- β 1 sobre diversos geles cromatográficos (CM, SP y DEAE).

55 **Figura 10:** % de adsorción de EGF sobre diversos geles cromatográficos (CM, SP y DEAE).

60 **Figura 11:** Representación esquemática de una realización particular del procedimiento de la invención que comprende 1 extracción con aceite seguida de una primera etapa de separación/purificación sobre SP-Sepharose. El eluato de PDGF resultante de SP-Sepharose contiene tanto factores de crecimiento PDGF como VEGF. La fracción de saturación resultante de SP-Sepharose se separa/purifica adicionalmente sobre DEAE-Sepharose, permitiendo así preparar un eluato de TGF- β que contiene tanto factores de crecimiento TGF- β como EGF.

65

Figura 12: Contenido de EGF expresado en ng/ml en PC de partida, PC tratado por disolvente-detergente, PC tratado por disolvente-detergente después de 1 extracción con aceite y centrifugación (SD-PC@), fracción de saturación después de cargar sobre DEAE-Sepharose FF (DEAE-BKT) y eluato recuperado de DEAE-Sepharose FF (DEAE-E1M).

Figura 13: Contenido de EGF total expresado en ng en PC tratado por disolvente-detergente después de 1 extracción con aceite y centrifugación (SD-PC@), fracción de saturación después de cargar sobre DEAE-Sepharose FF (DEAE-BKT) y eluato recuperado de DEAE-Sepharose FF (DEAE-E1M).

Figura 14: Contenido de VEGF total expresado en ng en PC tratado por disolvente-detergente después de 1 extracción con aceite y centrifugación (SD-PC@), fracción de saturación después de cargar sobre DEAE-Sepharose FF (DEAE-BKT) y eluato recuperado de DEAE-Sepharose FF (DEAE-E1M).

Figura 15: Contenido de PDGF-AB total expresado en ng en PC tratado por disolvente-detergente después de 1 extracción con aceite y centrifugación (SD-PC@), fracción de saturación después de cargar sobre DEAE-Sepharose FF (DEAE-BKT) y eluato recuperado de DEAE-Sepharose FF (DEAE-E1M).

Figura 16: Resultados del ensayo de MTS. Células de fibroblasto HEK293A cultivadas en (A) D-MEM complementado con 10 % (v/v) de SBF (10 % de SBF), sin SBF, 10 % (v/v) de concentrado de PC activado (Act PC) y 10 % (v/v) de la mezcla de HPGF después de cromatografía sobre C18 (10 % de C18), tC18 (10 % de tC18) o SDR (10 % de SDR); en (B) D-MEM complementado con 10 % (v/v) de SBF, o con 3, 5, 7,5, 10, 15 ó 20 % (v/v) de mezcla de HPGF después de C18. (C) Células de fibroblasto SIRC cultivadas en D-MEM complementado con 10 % de SBF, sin SBF o con 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15 ó 20 % (v/v) de mezcla de HPGF después de C18. La viabilidad celular se determinó después de 5 días usando el ensayo de proliferación celular de MTS siguiendo las instrucciones del fabricante.

MEMORIA DESCRIPTIVA DETALLADA

La presente solicitud describe un concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable para uso terapéutico y/o cosmético obtenible de una mezcla no activada de concentrados de plaquetas, en la que se han inactivado virus no encapsulados y encapsulados, y que comprende tanto fibrinógeno como factor XIII, estando dicho concentrado libre de plaquetas intactas.

Como se usa en la presente invención, por el término “coagulable” se indica que el concentrado de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención comprende tanto fibrinógeno como factor de coagulación XIII, y es así capaz de generar un coágulo tras mezclarse con un agente de activación adecuado, tal como trombina, si se necesita para aplicación terapéutica.

Preferentemente, la concentración de fibrinógeno en el concentrado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas es preferentemente superior a 1, preferentemente superior a 1,5, preferentemente superior a 2,5 g/l del concentrado, y la concentración de factor XIII es preferentemente superior a 0,5, preferentemente superior a 0,75, preferentemente superior a 1,0 UI/ml del concentrado.

Como se usa en el presente documento, el término “uso cosmético” significa un tratamiento previsto para ponerse en contacto con las diversas partes superficiales del cuerpo humano, en particular la piel, el pelo, las uñas, los labios, los órganos genitales externos o con los dientes y las membranas mucosas orales, de manera que limpien, perfumen, protejan, modifiquen el aspecto de las mismas o mantengan las mismas en buen estado.

Como se usa en la presente invención, por el término “para uso terapéutico” se indica un tratamiento curativo o profiláctico para tratar afecciones en humanos y/o animales, para restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas de los mismos mediante un efecto farmacológico, inmunológico o metabólico.

El concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención es especialmente adecuado para tratar afecciones en humanos y/o animales y/o para poner en contacto partes superficiales del cuerpo de los mismos, ya que está tanto libre de disolvente como de detergente, y es viralmente seguro.

Por el término “libre de disolvente y/o detergente” se indica que el nivel de disolvente y/o detergente en el concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable es extremadamente bajo, y preferentemente indetectable. Es de hecho muy conocido para el experto en la materia que elevadas concentraciones de disolvente y/o detergente están directamente ligadas a toxicidad a largo plazo, y más particularmente a la aparición de afecciones neurológicas (tales como las desveladas en J.P.R. Pelletier, S. Transue, E.L. Snyder. Pathogen inactivation techniques. Best Practice & Research Clinical Haematology Vol. 19, nº 1, pág. 205-242, 2006).

Por tanto, por el término “libre de disolvente” se indica en la presente invención que el nivel de disolvente es inferior

a 100 ppm, preferentemente inferior a 50 ppm, preferentemente inferior a 20 ppm, más preferentemente inferior a 10 ppm, inferior a 5 ppm, e incluso más preferentemente inferior a 1 ppm.

Además, por el término “libre de detergente” se indica en la presente invención que el nivel de detergente es inferior a 500 ppm, preferentemente inferior a 250 ppm, más preferentemente inferior a 100 ppm, más preferentemente inferior a 50 ppm, e incluso más preferentemente inferior a 10 ppm.

Por el término “viralmente seguro” se indica que el concentrado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas está sustancialmente libre de virus infecciosos, y más particularmente de virus que contienen lípidos, 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 occidental (VNO), el virus de TT, el virus del Dengue, el citomegalovirus (CMV), el virus de Epstein Barr (VEB), el virus del herpes humano-8 (VHH-8), el virus espumoso simio, el virus del síndrome respiratorio agudo grave (coronavirus SRAG), además de otros virus de la hepatitis envueltos en lípidos, citomegalovirus, virus de deshidrogenasa láctica, virus del grupo del herpes, rabdovirus, leucovirus, mixovirus, alfavirus, arbovirus, paramixovirus, arenavirus y coronavirus. Por “sustancialmente libre” se indica que el concentrado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas tiene un grado de inactivación de virus al menos superior a $4\log_{10}$ como se requiere para caracterizar etapas de reducción viral robustas, por el Comité de Especialidades Farmacéuticas (CEF) de la Agencia Europea del Medicamento (EMA) en su “Nota para orientación sobre estudios de validación de virus” (Referencia CPMP/BWP/268/95), y preferentemente más de $5\log_{10}$ o incluso $6\log_{10}$ y, es por tanto, poco probable que sea responsable de la transmisión a pacientes de infección transmitida por la sangre debido a virus envueltos en lípidos.

El concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención comprende además los siguientes factores de crecimiento funcionales: el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), tanto como heterodímeros de cadenas A y B como homodímeros de cadenas A-A y/o B-B (PDGF-A, PDGF-AB, PDGF-B), la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF- β), que comprende, entre otros, TGF- β 1 y/o TGF- β 2 y/o proteínas morfogenéticas óseas (BMP), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

En un caso particular, la concentración de PDGF en el concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable es superior a 90, preferentemente superior a 100, preferentemente superior a 120, preferentemente superior a 150, preferentemente superior a 180 y preferentemente superior a 250 ng/ml del concentrado.

En un caso particular, la concentración de TGF- β 1 en el concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable es superior a 100, preferentemente superior a 140, preferentemente superior a 160, preferentemente superior a 180, preferentemente superior a 250 ng/ml del concentrado.

En un caso particular, la concentración de IGF en el concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable es al menos similar a la del concentrado de plaquetas de partida, y preferentemente superior a 65, preferentemente superior a 75, preferentemente superior a 80, preferentemente superior a 100 ng/ml del concentrado.

En un caso particular, la concentración de EGF en el concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable es superior a 0,5, preferentemente superior a 1, preferentemente superior a 1,5, preferentemente superior a 2 y preferentemente superior a 2,5 ng/ml del concentrado.

En un caso particular, la concentración de VEGF en el concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable después del tratamiento con S/D y extracción con aceite es superior a 0,5, preferentemente superior a 0,75, preferentemente superior a 1 y preferentemente superior a 1,5 ng/ml del concentrado.

En un caso particular, el concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención es adecuado para su uso en condiciones que solicitan un bajo contenido de lípidos.

Como se usa en la presente invención, por el término “en condiciones que solicitan un bajo contenido de lípidos” se indica que el concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención está agotado en lípidos, es decir, el nivel de colesterol, triglicéridos, HDL y LDL en el concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable de la invención u obtenido mediante el procedimiento de la invención es significativamente inferior al concentrado de plaquetas de partida o al de un concentrado de factores de crecimiento obtenido por conocidos en la técnica de la activación de plaquetas. Los niveles extremadamente bajos en lípidos, y en particular en colesterol, en triglicéridos y en LDL del concentrado de factores de crecimiento derivados de plaquetas coagulables hacen así este concentrado adecuado

para uso terapéutico específico, tal como, por ejemplo, uso en pacientes que presentan elevados riesgos de complicaciones cardiovasculares, o que padecen afecciones de alto riesgo cardíaco, ya que el nivel de lípidos extremadamente bajo proporcionado al paciente tratado disminuye fuertemente el riesgo de posterior oclusión vascular resultante de la formación de placas en el sistema arterial y venoso.

Preferentemente, el nivel de colesterol en el concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención es inferior a 100, más preferentemente inferior a 50 e incluso más preferentemente inferior a 35 mg/dl del concentrado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas.

Preferentemente, el nivel de triglicéridos en el concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención es inferior a 100, más preferentemente inferior a 50 e incluso más preferentemente inferior a 30 mg/dl del concentrado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas.

Preferentemente, el nivel de HDL en el concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención es inferior a 30, más preferentemente inferior a 15 e incluso más preferentemente inferior a 10 mg/dl del concentrado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas.

Preferentemente, el nivel de LDL en el concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención es inferior a 80, más preferentemente inferior a 50, más preferentemente inferior a 20, e incluso más preferentemente inferior a 5 mg/dl del concentrado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas.

Además, las cantidades muy bajas y/o indetectables de lípidos en el concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención tienen una estabilidad potenciada y son fáciles de procesar cuando se implementa la purificación a gran escala de factores de crecimiento de plaquetas. Esto será especialmente útil cuando se lleven a cabo procedimientos de separación por cromatografía aniónica y/o catiónica.

En un caso particular, el concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención no conduce a reacciones de transfusión relacionadas con las células sanguíneas. Por "reacciones de transfusión relacionadas con las células sanguíneas" se indica que este concentrado de factores de crecimiento coagulables está libre de células vivas intactas (tales como, por ejemplo, glóbulos rojos, plaquetas y glóbulos blancos) y, por tanto, permite evitar una variedad de reacciones de transfusión muy conocidas, que incluyen complicaciones inmunológicas (tales como aloinmunización) y hemolíticas en pacientes (véase, por ejemplo Stroncek y Rebull, "Platelet transfusions", The Lancet, 4 de agosto de 2007; vol. 370: 427-438). De hecho, un receptor que es inmunocompetente frecuentemente presenta una respuesta inmunitaria a los antígenos de las células sanguíneas del donante, produciendo así una variedad de consecuencias clínicas que dependen de los glóbulos sanguíneos y antígenos específicos implicados. Los antígenos que participan comúnmente se seleccionan en las siguientes categorías: (1) HLA clase I, que son compartidos por plaquetas y leucocitos, (2) HLA clase II, que están presentes sobre algunos leucocitos, (3) antígenos específicos de granulocitos, (4) antígenos específicos de plaquetas (tales como, por ejemplo, antígeno plaquetario humano HPA), y (5) antígenos específicos de glóbulos rojos.

Más específicamente, en cuanto al procedimiento de preparación de la invención, los glóbulos sanguíneos vivos (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas) son destruidos/lisados por el tratamiento con disolvente-detergente, reduciendo así, y previniendo preferentemente, el riesgo de exponer el paciente a antígenos extraños y glóbulos sanguíneos intactos. El procedimiento de la invención permite así preparar un concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable tanto de plaquetas obtenidas del propio paciente que va a tratarse como de plaquetas alogénas.

En un caso particular, el concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención comprende además al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en fibronectina, vitronectina, trombospondina, y/o del grupo que consiste en los factores de coagulación II (protrombina), V, VII, VIII, IX, X, XI y factor de von Willebrand.

En un caso particular, la concentración de fibronectina en el concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable es preferentemente superior a 0,2 g/l del concentrado, y preferentemente aproximadamente 0,3 g/l del concentrado.

En un caso particular, la concentración de cada uno de factores de coagulación II, IX, X, VII y/o XI en el concentrado de factores de crecimiento derivados de plaquetas viralmente inactivado coagulable es preferentemente superior a 0,5 UI/ml del concentrado, y preferentemente aproximadamente 1 UI/ml del concentrado.

En un caso particular, la concentración de cada uno del factor de coagulación VIII y/o factor de von Willebrand en el

concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable es preferentemente superior a 0,5, preferentemente superior a 0,9 UI/ml del concentrado, y preferentemente aproximadamente 1 UI/ml del concentrado.

- 5 En otro caso, el concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención comprende además inmunoglobulinas tales como IgG, IgM y/o IgA.

En un caso particular, la concentración de inmunoglobulina IgG en el concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable es preferentemente superior a 5 g/l del concentrado, y preferentemente aproximadamente 10 g/l del concentrado.

En otro caso, el concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención comprende además al menos un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en los miembros de la familia CNN, la proteína 3 activante de tejido conjuntivo (CTAP-3), PF4, el factor angiogénico derivado de plaquetas (PDAF), el inhibidor del crecimiento de células endoteliales, el factor temprano del embarazo (EPF), el inhibidor del crecimiento epitelial (EGI), el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), 6 similar a angiopoyetina (ANGPTL6), IGFBP-3, proteínas relacionadas con receptores de estrógenos, el factor de crecimiento de células endoteliales derivadas de fibroblastos (f-ECGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factores liberadores de histamina, inhibidor de colagenasa humana, la proteína 1 microbica de plaquetas (PMP-1), la proteína 1 microbica de plaquetas inducida por trombina (t-PMP), trombocidina 1 (TC1) y trombocidina 2 (TC2).

En otro caso, el concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención comprende además al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en serotonina, catepsina, albúmina, proteína-PBP básica de plaquetas (CXCL7), proteína 2 y 4 activante de neutrófilos (NAP-2;4), somatostatina (SST), RANTES, CTAP-3, proteína 14 placentaria (PP14), SCUBE1, anexina 11, proteína 27 de choque térmico (HSP27) y proteína 60 de choque térmico (HSP60).

En un caso particular, la concentración de albúmina en el concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable es preferentemente superior a 30 g/l del concentrado.

En otro caso, el concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención comprende además al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en colagenasa, superóxido dismutasa (SOD), heparinasa, metaloproteasa MMP-1, -2, -9, -13, ERK autocrina (cinasa reguladora extracelular), proteína C autocrina y paracrina (PC) y enzimas en cantidad traza tales como aldolasa, carboxipeptidasas, fosfatasa ácida, arilsulfatasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, β -glicerolfosfatasa, α/β -glucosidasas, α/β -fucosidasas, α -manosidasa y α -arabinosidasa.

En otro caso, el concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención comprende además histamina, ADAMTS-13, α 1- α 2 antitripsina, α 2-antiplasmina, α 2-macroglobulina, C1-INH, BMP-2, -6, -7 inducible (superfamilia TGF- β), factores de remodelación de ECM (MMP inducida, TNF- α , elastasa, ...), ácido lisofosfatídico autocrino y paracrino (LPA), HMGB1 (anfiregulina), ATP, ADP, GPT, GDP, Ca^{2+} , Mg^{2+} y/o Zn^{2+} .

La presente solicitud también describe un producto farmacéutico que comprende el concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención para su uso en medicina.

Por "producto farmacéutico" se indica un gel de plaquetas, un pegamento de plaquetas, un pegamento y/o sellante de fibrina enriquecido con factores de crecimiento, andamiajes artificiales.

La presente solicitud también describe el uso de los factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivados coagulables obtenidos 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, citoblastos y/o células de trasplantes. La presente solicitud describe un medio de cultivo adecuado para el cultivo *in vitro* o *ex vivo* de fibroblastos, condrocitos, osteoblastos, queratinocitos, citoblastos y/o células de trasplantes, y que contiene los factores de crecimiento de plaquetas coagulables obtenidos mediante el procedimiento de la invención.

Un objetivo de la presente invención es un procedimiento de preparación de un concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable según las reivindicaciones que comprende las etapas de poner en contacto un concentrado de plaquetas de partida no activado con un disolvente y/o un detergente, incubar dicho concentrado de plaquetas de partida con el disolvente y/o detergente 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, preferentemente dentro del intervalo de 25 °C a 45 °C, y eliminar el disolvente y/o detergente por extracción con aceite y/o medios cromatográficos, comprendiendo dicho procedimiento

otra etapa de inactivar virus no envueltos.

En una realización preferida, el periodo de incubación realizado oscila de 2 a 4 horas, a un pH fisiológico, por ejemplo, a pH que oscila de pH 7,0 a pH 7,5 (cuando las plaquetas de partida son plaquetas frescas) o a un pH que oscila de pH 6,8 a 8,2 (cuando las plaquetas de partida son plaquetas caducadas y/o congeladas). Ventajosamente, la temperatura de incubación es aproximadamente 31 °C.

Disolventes adecuados para su uso en el procedimiento de la invención son fosfatos de di- o trialquilo, tales como fosfato de tri-(n-butilo), fosfato de tri-(t-butilo), fosfato de tri-(n-hexilo), fosfato de tri-(2-etilhexilo), fosfato de tri-(n-decilo), fosfato de di-(n-butilo), fosfato de di-(t-butilo), fosfato de di-(n-hexilo), fosfato de di-(2-etilhexilo), fosfato de di-(n-decilo), además de fosfatos de dialquilo con diferentes cadenas de alquilo. Pueden emplearse fosfatos de di- o trialquilo que tienen diferentes cadenas de alquilo, por ejemplo, di-(n-butil)fosfato de etilo. Un fosfato de trialquilo especialmente preferido es fosfato de tri-(n-butilo) (TnBP).

Detergentes adecuados para los presentes inventores en el procedimiento de la invención incluyen derivados de polioxietileno de ácidos grasos, ésteres parciales de anhídridos de sorbitol, por ejemplo, los productos comercializados bajo los nombres "Tween 80" también conocidos como "polisorbato 80", "Tween 20" y detergentes no iónicos, tales como alquilfenol oxietilado comercializado bajo el nombre "Triton X-100" o "Triton X-45". Adicionalmente se contemplan los detergentes desoxicolato sódico y sulfobetainas, tales como sulfonato de N-dodecil-N,N-dimetil-2-amonio-1-etano. Detergentes especialmente preferidos son "Triton X-45", "Triton X-100", "Tween 80" y "Tween 20".

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

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

El disolvente y/o detergente puede extraerse del fluido biológico por extracción con aceite con aceite de calidad farmacéutica, y/o por otros procedimientos tales como cromatografía en columna, de forma que el concentrado restante se agote en disolvente y/o detergente.

El aceite de calidad farmacéutica puede ser un aceite que se produce naturalmente, por ejemplo, extraído de una planta o un animal, o un compuesto sintético de estructura similar. Aceites adecuados que se producen naturalmente incluyen aceite de ricino, soja, aceite de girasol, aceite de semilla de algodón. Un compuesto sintético preferido es un triglicérido sintético. Ejemplos de triglicéridos sintéticos adecuados incluyen trioleína, tristearina, tripalmitina, trimiristina, y combinaciones de los mismos.

La cantidad de aceite de calidad farmacéutica es la cantidad que permite la extracción de al menos el 80 % de productos químicos de procedimiento solubles en lípido, estando el aceite usado en una cantidad del 2 al 20 % en peso, basado en el peso del lisado de concentrado de plaquetas, preferentemente del 5 al 15 % en peso y más preferentemente del 5 al 10 % en peso. La extracción con aceite puede llevarse a cabo una vez, preferentemente dos veces y más preferentemente tres veces, dependiendo en particular de la concentración de aceite.

El disolvente y/o el detergente también pueden eliminarse del lisado de concentrado de plaquetas por cromatografía en columna. La cromatografía en columna también puede llevarse a cabo posteriormente a la extracción con aceite o directamente después del tratamiento con disolvente y/o detergente.

Columnas de cromatografía adecuadas que pueden usarse comprenden matrices de fase inversa (interacción hidrófoba), o matrices de adsorción de proteína tales como matrices de intercambio iónico (aniónico y catiónico) y matrices de afinidad (tales como inunoafinidad o heparina inmovilizada), o matrices de exclusión por tamaño. Las matrices de fase inversa preferidas son un material de empaquetamiento de sílice C18, una SDR (eliminación de disolvente-detergente) Hyper D (Pall Corporation), sorbente de poliestireno (Variant) y Amberlyte (Rohm). También se considera el material de empaquetamiento de sílice tC18, aunque C18 es generalmente preferido para cromatografía a escala industrial. Estos adsorbentes se usan para unir el disolvente y el detergente mientras que los factores de crecimiento eluyen en la fracción de saturación. Matrices de intercambio aniónico preferidas son, dependiendo de los factores de crecimiento que vayan a purificarse, geles de intercambiadores aniónicos tales como DEAE-Sephadex A-50, DEAE-Sepharose FF, Q-Sepharose, DEAE-Toyopearl 650M, DEAE-Hyper D. Matrices de intercambio catiónico preferidas son, dependiendo de los factores de crecimiento que vayan a purificarse, geles de intercambiadores catiónicos tales como SP-Sepharose y CM-Sepharose (estando ambos disponibles bajo una calidad FF), prefiriéndose SP. Estos adsorbentes se usan para unir los factores de crecimiento mientras que el disolvente y el detergente eluyen en la fracción de saturación.

En una realización preferida se realiza una cromatografía aniónica y/o catiónica después de la extracción con aceite. Dependiendo de la cromatografía seleccionada, una etapa de eliminación con disolvente y/o detergente tal también puede potenciar la separación de factores de crecimiento. A este respecto, una cromatografía aniónica (por ejemplo, DEAE) será preferentemente TGF- β 1 y EGF, mientras que una cromatografía catiónica (por ejemplo, SP) se unirá preferentemente a PDGF (AB, AA y BB) y VEGF. Así, el uso sucesivo de una cromatografía aniónica y catiónica permite la preparación de fracciones enriquecidas en GF(s) específico(s). Una realización tal se desvela en la Figura 11.

En un caso, cuando se realiza una cromatografía aniónica y/o catiónica después de la extracción con aceite y/o después de la cromatografía hidrófoba, las condiciones de elución se determinan según el conocimiento general del experto en la materia. Preferentemente, la elución se realiza con una solución salina que comprende NaCl 0,15 M a 2 M. La solución salina usada para eluir también puede comprender una mezcla de NaCl y una sal (tal como, por ejemplo, fosfato o citrato) de un metal alcalino o alcalinotérreo en un intervalo de 0,15 M a 2 M.

Además, cuando se realiza una cromatografía aniónica, el pH se selecciona de manera que sea superior al punto isoeléctrico del (de los) factor(es) de crecimiento de interés. Por el contrario, si se realiza una cromatografía catiónica, el pH se selecciona de manera que sea inferior al punto isoeléctrico del (de los) factor(es) de crecimiento de interés. Preferentemente, se seleccionan condiciones cromatográficas tales como para permitir realizar 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 forma que pudiera evitarse la desnaturalización de los factores de crecimiento.

Alternativamente, cuando se realiza una cromatografía aniónica y/o catiónica después de la extracción con aceite y/o después de la cromatografía hidrófoba, las condiciones de elución se fijan según el conocimiento general del experto en la materia. La elución también puede realizarse con un tampón a un pH diferente del usado para la unión de los factores de crecimiento sobre las resinas, que dependen del pHi de los factores de crecimiento. La disolución usada para eluir puede estar en un intervalo de pH de 4 a 10, preferentemente de 5 a 9, en condiciones que mantienen la estabilidad y función fisiológica de los factores de crecimiento.

En un caso, el nivel de disolvente después de la extracción con aceite y/o cromatografía es inferior a 100 ppm, preferentemente inferior a 50 ppm, preferentemente inferior a 20 ppm, más preferentemente inferior a 10 ppm, inferior a 5 ppm, e incluso más preferentemente inferior a 1 ppm.

En un caso, el nivel de detergente después de la extracción con aceite y/o cromatografía es inferior a 500 ppm, preferentemente inferior a 250 ppm, más preferentemente inferior a 100 ppm, más preferentemente inferior a 50 ppm, e incluso más preferentemente inferior a 10 ppm.

Tras la eliminación del disolvente y/o detergente por extracción con aceite y/o por cromatografía, se añade otra etapa para inactivar o eliminar virus no envueltos, tales como parvovirus B19 o, posiblemente, virus de la hepatitis A (VHA) por nanofiltración, y más particularmente por nanofiltración usando membrana de filtración de 75 nm, 35 nm, 20 nm, 15 nm o 10 nm de tamaño de poro.

En un caso se realiza una etapa de centrifugación después de la extracción con aceite y/o cromatografía para eliminar residuos de células. Ventajosamente, la etapa de centrifugación se realiza a 800 a 20000 x g durante 10 a 30 minutos, y preferentemente a 10000 x g durante 15 minutos.

En otro caso preferido se realiza una etapa de clarificación por filtración después de la extracción con aceite y/o cromatografía para eliminar residuos de células. Ventajosamente, la etapa de filtración se realiza sobre filtros que tienen una gradación de 1 μ m a 0,2 μ m, permitiendo así también la eliminación de bacterias.

En una realización particular, el concentrado de plaquetas usado como material de partida en el procedimiento de la invención se corresponde con concentrados de plaquetas convencionales individuales o mezclados, por ejemplo, concentrados de plaquetas que se prepararon para transfusión. El concentrado de plaquetas puede también originarse a partir del aislamiento de la capa leucocitaria de sangre completa. Una unidad de concentrado de plaquetas derivado de capa leucocitaria generalmente se corresponde con 30 a 50 ml. Las plaquetas derivadas de capa leucocitaria pueden usarse como material de partida bien como una única unidad o bien como una mezcla de unidades individuales, por ejemplo, bajo la forma de una unidad terapéutica, correspondiente a una mezcla de 4 a 6 unidades individuales (como se desvela en la Guía para la preparación, utilización y garantía de calidad de los componentes sanguíneos – 13ª edición (2007), editada por el Consejo de Europa).

El concentrado de plaquetas también puede obtenerse por procedimientos de aféresis, citaféresis o plaquetaféresis convencionales (véase, por ejemplo, la Guía para la preparación, utilización y garantía de calidad de los componentes sanguíneos, 13ª edición (2007), editada por el Consejo de Europa), y puede obtenerse usando MCS+ (Haemonetics), Trima Accell o COBE Spectra (Gambro) o Amicus (Baxter). Un procedimiento de aféresis generalmente da un mayor volumen por donante (correspondiente a un concentrado de plaquetas de 300 ml), cuando se compara con el obtenido mediante procedimientos de aislamiento de capa leucocitaria.

En una realización preferida, el procedimiento de la invención comprende una etapa preliminar que consiste en preparar un concentrado de plaquetas de partida antes de la etapa A) en el que dicha etapa es aféresis o aislamiento de capa leucocitaria de sangre completa, en un caso procedimientos de diagnóstico inmediato, tales como aquellos usando recuperadores/separadores de células sanguíneas o se usan dispositivos de mesa.

El concentrado de plaquetas usado como material de partida en el procedimiento de la invención puede ser fresco, es decir, inferior a 5 ó 7 días después de la extracción, caducado, es decir, superior a 5 ó 7 días después de la extracción, o caducado y congelado durante varias semanas a -20 °C o más frío.

En un caso, el concentrado de plaquetas usado como material de partida para el procedimiento de la invención puede comprender además glóbulos blancos y/o glóbulos rojos. El concentrado de plaquetas de partida puede, por tanto, comprender varios leucocitos diferenciados y no activados tales como linfocitos, granulocitos neutrófilos y monocitos. Los neutrófilos y monocitos, en particular, están enriquecidos en gránulos que contienen mieloperoxidasa, que cataliza la oxidación de cloruro para generar ácido hipocloroso y otros derivados de oxígeno reactivo que actúan de potentes oxidantes bactericidas tóxicos para microorganismos y hongos.

Por tanto, si el concentrado de plaquetas de partida comprende varios leucocitos diferenciados y no activados, el concentrado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención comprende además componentes antimicrobianos que se originan a partir de los leucocitos.

En un caso, los leucocitos son eliminados del concentrado de plaquetas usado como material de partida, preferentemente por leucorreducción, de forma que se evitan los efectos proinflamatorios de las proteasas e hidrolasas ácidas contenidas en los glóbulos blancos. La leucorreducción también permite reducir el riesgo de una posible contaminación por priones.

Una cifra de plaquetas normal en una persona sana está generalmente comprendida entre 150000 y 400000 plaquetas por mm³ de sangre, es decir, 150 a 400 x 10⁹ plaquetas/l. Esta cifra de plaquetas "normal" se encuentra en aproximadamente el 95 % de las personas sanas, mientras que el 5 % restante pueden tener una cifra de plaquetas estadísticamente anormal (tanto muy baja como muy alta).

Cuando las plaquetas se recogen por aféresis, la cifra de plaquetas es generalmente superior a 1,2 x 10⁹ plaquetas por ml para una bolsa de 250 ml, correspondiente así a una cifra de plaquetas superior a aproximadamente 3 x 10¹¹ plaquetas por bolsa (unidad).

En una realización preferida, el número de plaquetas en el concentrado de plaquetas de partida es 3 a 10 veces superior al normalmente encontrado en sangre.

La presente solicitud también describe un procedimiento de formación de un coágulo, que consiste en mezclar el concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención con trombina. La presente solicitud también describe un procedimiento de formación de un coágulo, que consiste en mezclar el concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable de la invención u obtenido mediante el procedimiento de la invención con un activador de la cascada de coagulación tal como FVII activado, o tromboplastina bovina o humana.

Antes de formar un coágulo con el concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención, un agente antifibrinolítico puede añadirse al concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento según la invención para inhibir o ralentizar la degradación del coágulo de fibrina por enzimas proteolíticas que se producen naturalmente (por ejemplo, plasmina) del sistema fibrinolítico.

En un caso, el agente antifibrinolítico es aprotinina, pero también podrían usarse ácido tranexámico o ácido épsilon-aminocaproico a una concentración de >10 mg/ml como compuestos alternativos a la aprotinina. La aprotinina se proporciona normalmente a una concentración de 3000 KIU o menos en la forma líquida. La concentración final de aprotinina es generalmente la mitad de la disolución de partida después de mezclar el concentrado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas y componentes de trombina.

El concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención puede mezclarse adicionalmente con andamiajes artificiales, tales como aquellos hechos, por ejemplo, de colágeno, quitosano, cerámicas o con pegamentos de fibrina o sellantes de fibrina derivados de plasma.

También pueden añadirse compuestos adicionales al concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable, antes de mezclar con trombina. Tales componentes adicionales comprenden especialmente, pero no se limitan a, agentes quimioterapéuticos, antibióticos y/u hormonas.

El mezclado del concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención junto con trombina reproduce la última etapa de la cascada de coagulación y conduce a la polimerización gradual de fibrinógeno para formar coágulos o fibrina insoluble.

El término “trombina”, como se usa en la invención, se refiere a trombina que puede obtenerse de cualquier origen, y se refiere preferentemente a trombina que se origina de origen bovino, más preferentemente de origen humano si se usa para aplicación terapéutica en seres humanos. También puede usarse plasma humano activado por CaCl_2 o batroxobina (otra proteasa coagulante de fibrinógeno derivada del veneno de la serpiente *bothrops atrox moogendi*), FVII activado, o tromboplastina humana o bovina como compuestos alternativos a la trombina.

En un caso, 0,1 a 1 volumen de trombina se añade a 1 volumen del concentrado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas de la invención u obtenido mediante el procedimiento de la invención.

En otro caso, la concentración de trombina oscila de 20 UI/ml a 1000 UI/ml. Más preferentemente, la concentración final de trombina es tanto aproximadamente 500 UI/ml para garantizar la polimerización secuencial y rápida del fibrinógeno en fibrina soluble y luego en estable (insoluble) como inferior (aproximadamente aproximadamente 4 a 25 UI/ml cuando la polimerización lenta es preferible en situaciones quirúrgicas específicas.

En otro caso, la trombina se obtiene por auto-activación del concentrado de factores de crecimiento enriquecido en fibrinógeno usando CaCl_2 10-50 mM en presencia de activadores superficiales tales como metal o perlas de vidrio.

Los dos componentes, es decir, el concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención y la trombina, pueden aplicarse secuencialmente o simultáneamente al sitio de reparación por un sistema de jeringa dual, con o sin la ayuda de un dispositivo de administración endoscópica, pulverizando o por esponjas absorbibles (procedimientos de aplicación descritos en Radosisvich y col., “Fibrin sealant: Scientific Rationale, Production Methods, Properties, and Current clinical use”, Vox Sanguinis, 1997, 72:133-143 y en Marx G, “Evolution of fibrin glue applicators”, Transfus Med Rev, 2003;17(4):287-98 se incorporan por este documento por referencia).

La presente solicitud describe el uso del concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención en aplicación terapéutica, además de para formar un coágulo, o para el cultivo de células *in vitro* o *ex vivo*. Cuando se usa para el cultivo de células *in vitro* o *ex vivo*, el concentrado viralmente inactivado coagulable de factores de crecimiento de plaquetas 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 %, y más preferentemente del 3 % al 10 % con respecto al volumen del medio de cultivo.

Las principales aplicaciones terapéuticas de la mezcla de concentrado/trombina comprenden, pero no se limitan a: cirugía dental, implantología, cirugía ortopédica y bucal, cirugía plástica, curación y reconstrucción de tejido blando y duro, cirugía cardiovascular, torácica o gastrointestinal, neurocirugía, cirugía/traumatología general, oftalmología, otorrinolaringología, urología y cirugía en pacientes anticoagulados o en pacientes con defectos de la coagulación.

Los objetivos, características y ventajas anteriores y otros de la presente invención serán más evidentes de la siguiente descripción, haciéndose referencia a las figuras adjuntas.

EJEMPLOS

I-MATERIAL Y PROCEDIMIENTOS

I.1- Extracción de plaquetas por aféresis

Se extrajeron concentrados de plaquetas de partida (PC) de donantes voluntarios después del consentimiento informado usando un sistema de múltiples componentes MCS+ (Haemonetics, Braintree, EE.UU.). Se extrajo sangre completa mediante un catéter venoso usando un flujo intermitente y anticoagulante (1 ml de disolución de dextrosa con citrato anticoagulante - A por 10 ml de sangre). El plasma rico en plaquetas (PRP) se separó automáticamente de otros componentes de la sangre por centrifugación y se recogió en una bolsa desechable de un solo uso estéril, y los eritrocitos y plasma se devolvieron al donante. El ciclo se repitió hasta que se obtuvo un volumen predefinido de PRP (aproximadamente 300 ml). Los concentrados de plaquetas de partida se procesaron como se describe más adelante en el plazo de 24 horas después de la extracción.

1.2-Cifras de células sanguíneas

Se determinaron cifras de plaquetas, glóbulos blancos (WBC) y glóbulos rojos usando un contador de células (ABC Vet Automatic Blood Counter, ABX Diagnostics, Francia).

I.3-Procesamiento de concentrados de plaquetas de partida

a-Diseño del estudio:

Se procesaron concentrados de plaquetas de partida según el diseño del estudio en la Figura 1. Brevemente, los concentrados de plaquetas de partida del mismo donante (300 ml) se mezclaron suavemente y se separaron en dos

sub-mezclas de igual volumen (150 ml). Las sub-mezclas 1 se sometieron directamente al tratamiento por tratamiento con S/D sin activación previa. Las sub-mezclas 2 se activaron en presencia de CaCl_2 23 mM y perlas en condiciones que condujeron a la formación de un gel de plaquetas como se describe más adelante; los concentrados resultantes se recubrieron cuidadosamente por pipeteado (correspondiente a un volumen medio de 120 ml debido a la pérdida de 30 ml en el gel de plaquetas) y luego se sometieron a tratamiento con S/D seguido de extracciones con aceite. Se tomaron muestras sobre los concentrados de plaquetas de partida, después del tratamiento con S/D de las sub-mezclas 1 de plaquetas no activadas, después de la activación de las sub-mezclas 2 de plaquetas y después del tratamiento con S/D de las sub-mezclas 2 activadas.

10 *b-Activación de plaquetas:*

Los concentrados de plaquetas (sub-mezclas 2) se activaron añadiendo CaCl_2 1 M (Sigma; lote 056k0688) a una concentración final de 23 mM, en presencia de perlas. La mezcla se puso bajo mezcla por rotación suave hasta la formación de un coágulo, que normalmente se produjo en el plazo de 5 a 8 minutos. La mezcla se dejó activar durante un periodo adicional de 60 min que, bajo estas condiciones experimentales, es la duración encontrada que favorece la liberación óptima de factores de crecimiento derivados de plaquetas. El sobrenadante se separó por decantación de las perlas/coágulo de fibrina que se había formado. El volumen medio de sobrenadante recuperado fue aproximadamente el 80 % del concentrado de plaquetas de partida. El sobrenadante se procesó adicionalmente para tratamiento con S/D.

20 *c-Tratamiento con S/D:*

Por comodidad, el tratamiento con S/D de las sub-mezclas 1 no activadas y las sub-mezclas 2 activadas se realizó en bolsas como se describe en el documento EP 1 685 852. Brevemente, se añadió un 50 % /50 % de mezcla de TnBP (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y Triton X-45 (Sigma, Missouri, EE.UU.) a las submezclas respectivas durante 15 min, con mezcla constante, para lograr una concentración final (v/v) de 1 % de TnBP y 1 % de Triton X-45. Después de completarse la adición, las mezclas de sub-mezclas de plaquetas S/D se agitaron vigorosamente durante 1 min. Entonces, las bolsas de procesamiento se sumergieron completamente en un baño de agua para calentar la mezcla de plaquetas S/D a $25 \pm 0,5$ °C y luego se trataron durante 1 h bajo agitación suave constante. Al completarse el tratamiento con S/D, se añadió aceite de soja (Sigma, Missouri, EE.UU.) a una concentración final del 10 % (v/v) a las sub-mezclas de plaquetas S/D. La bolsa se agitó vigorosamente durante 1 min y luego se puso sobre un agitador rotatorio durante 15 min. Las sub-mezclas de plaquetas (capa inferior) se extrajeron del aceite (capa superior) por decantación (20 min) y se transfirieron por gravedad a una segunda bolsa para repetir tres veces la extracción con aceite. Este procedimiento de extracción con aceite permitió la reducción de TnBP y Triton X-45 a menos de 10 y 100 ppm, respectivamente.

I.4-Impacto de la centrifugación y del tipo de agentes de lisado

Con el fin de estudiar el impacto del contenido de plaquetas y el tipo de reactivos de S/D sobre los concentrados de factores de crecimiento derivados de plaquetas, se llevó a cabo un experimento del siguiente modo: un concentrado de plaquetas (300 ml) se sub-dividió en dos sub-mezclas de 150 ml.

Una sub-mezcla se centrifugó a alta velocidad (10000 x g) con el fin de sedimentar las plaquetas y el sobrenadante se trató por 1 % de TnBP-1 % de Triton X-45. La otra sub-mezcla, que no se centrifugó, se dividió en dos sub-mezclas adicionales de 75 ml, siendo una sometida a tratamiento con 1 % de TnBP-1 % de Triton X-45, la otra a 2 % de TnBP. Los tratamientos con S/D (incubación y extracciones con aceite) se realizaron como se ha descrito anteriormente.

50 I.5-Experimentos de activación de trombina bovina

Para descartar la hipótesis de que la activación por CaCl_2 no activó las plaquetas completamente, se activaron dos concentrados de plaquetas (14 ml) en presencia de CaCl_2 0,23 M y perlas como se ha descrito anteriormente. Después de 60 min de mezcla por rotación suave a temperatura ambiente, se recuperaron 10 ml del concentrado de plaquetas y se añadieron 0,5 ml de 1000 unidades internacionales (UI)/ml de trombina bovina tópica (Thrombin-JMI, 52604-7102-1, Jones Pharma, Saint-Louis, MO), para obtener una concentración final de aproximadamente 48 UI/ml. La mezcla se puso 60 min a temperatura ambiente bajo mezcla con rotación suave. Entonces se sometió a un tratamiento con 1 % de TnBP-1 % de Triton X-45 y extracción con aceite. En experimentos paralelos, dos muestras de concentrado de plaquetas (10 ml) también se sometieron para dirigir la activación por 0,5 ml de la misma trombina bovina, seguido de 60 min de mezcla por agitación suave después de la formación del gel, que se produjo en el plazo de segundos. Se tomaron muestras en diversas etapas del procedimiento experimental, se centrifugaron a 10.000 x g y se congelaron a -80 °C hasta el análisis de factores de crecimiento derivados de plaquetas.

I.6-Ensayos de factores de crecimiento

Se tomaron muestras de 1 ml en cada etapa de los procedimientos. Se centrifugaron a 10000 x g durante 15 min (Microfuge® 22R, Beckman Coulter, Fullerton, CA) para sedimentar las plaquetas y/o residuos celulares y obtener

sobrenadantes libres de células para mediciones de factores de crecimiento derivados de plaquetas. También se realizaron experimentos paralelos usando una fuerza de centrifugación de 800 x g durante 15 min. Entonces, los sobrenadantes se congelaron inmediatamente a -80 °C.

- 5 Las muestras se descongelaron a 37 °C y se analizaron en el plazo de 1 h por inmunoensayos comercialmente disponibles sensibles y específicos. Se ensayaron patrones y muestras por duplicado, y se calcularon valores medios. Los resultados se multiplicaron por el factor de dilución aplicado a las muestras.

a-PDGF-AB

- 10 Se ensayó PDGF-AB usando el kit de ELISA Quantikine (n° DHD00B, R&D Systems, Mineápolis, MN). Se diluyeron muestras 100 veces en Calibrator Diluent (RD6-11). Las placas se incubaron durante 2 h, se lavaron y se incubaron con anticuerpos conjugados con enzima para PDGF-AB durante 3 h adicionales a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron usando el tampón de lavado, luego se añadió la disolución de sustrato durante 20-30 min a temperatura ambiente. Los pocillos se protegieron de la luz. Se añadió disolución de parada a cada pocillo, y las absorciones a 450 nm se determinaron usando un lector de placas de microtitulación. La dosis detectable mínima fue 1,7 pg/ml.

b-TGF-β1

- 20 Se determinó TGF-β1 usando el kit de ELISA Quantikine (DB100B, R&D Systems). Se diluyeron muestras 100 veces en Calibrator Diluent (RD5-26). Se preparó una serie de dilución de patrones de TGF-β1 (890207) en volúmenes de 100 µl en placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con receptor II de TGF-β. Antes del análisis de TGF-β1 se realizó la activación y neutralización con ácido para activar TGF-β1 latente a la forma inmunorreactiva. Para este fin, muestras de 0,5 ml se mezclaron con 0,1 ml de HCl 1 N, se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min, se neutralizaron por una adición de 0,1 ml de NaOH 1,2 N / HEPES 0,5 M (ácido N-[2-hidroxietil]piperazin-N'-[2-etanosulfónico]) de Sigma (H-7523) y se centrifugaron. Entonces, la fracción de sobrenadante se ensayó para el contenido de TGF-β1 total. Se aplicaron alícuotas (50 µl) por duplicado a la placa de microtitulación, que luego se cubrió y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Entonces, los pocillos se lavaron, se añadió anticuerpo policlonal conjugado con enzima a TGF-β1 y la incubación continuó durante 1,5 h a temperatura ambiente. Las mediciones se completaron como se ha descrito anteriormente. El límite de detección de TGF-β1 fue 4,61 pg/ml.

c-EGF

- 35 Se ensayó EGF usando el kit de ELISA Quantikine (n° DEG00, R&D Systems, Mineápolis, MN). Se diluyeron muestras 20 veces en Calibrator Diluent (RD6N). Se añadieron 200 µl de patrón, control o muestra en los pocillos. Las placas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Cada pocillo se aspiró y se lavó llenando con tampón de lavado. Se añadió conjugado de EGF a cada pocillo, y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron usando el tampón de lavado y se añadió disolución de sustrato (200 µl) a cada pocillo. La mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y se protegió de la luz. Se añadió disolución de parada (50 µl) a cada pocillo. La densidad óptica de cada pocillo se determinó en el plazo de 30 minutos, usando un lector de microplacas (lector de microplacas VersaMax™, Molecular Devices, EE.UU.) fijado a 450 nm. La dosis detectable mínima fue 0,7 pg/ml.

d-IGF-1

- 45 Se cuantificó IGF-1 usando un kit de ELISA Quantikine (DG100, de R&D Systems). Se diluyeron muestras 100 veces en Calibrator Diluent (RD5-22). La dosis detectable mínima osciló de 0,007 a 0,056 ng/ml y la MDD media fue 0,026 ng/ml, como se informa por 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 cubrieron con tiras adhesivas y se incubaron durante 2 h a 2-8 °C. Los pocillos se lavaron 3 veces y luego se incubaron con IGF-1 conjugada con enzima durante 1 h a 2-8 °C. Las mediciones se completaron como se ha descrito anteriormente.

I.7-Análisis estadístico

- 55 Los datos para todas las series de experimentos se informan como media, desviación estándar y valores mínimos y máximos. Se hicieron comparaciones estadísticas con una prueba de la t de Student para datos emparejados bilateral. Se usó un valor de p inferior a 0,05 para evaluar la significancia de las diferencias en la concentración de PGF media entre las preparaciones de plaquetas en diferentes etapas del procedimiento. Los valores se presentan como no significativos (NS; <0,05), < 0,01, o <0,001. Se indican valores de p precisos cuando son próximos a 0,05.

I.8-Preparación y separación de muestras para comparación de PC, S/D-PC y Act-PC

- 65 Se separaron muestras respectivamente correspondientes al concentrado de plaquetas de partida (PC), el concentrado de plaquetas de partida tratado por disolvente/detergente (1 % de TnBP y 1 % de Triton X-45) (S/D-PC) y el concentrado de plaquetas de partida activado por CaCl₂ (Act-PC) por SDS-PAGE con el fin de comparar el

contenido de proteínas.

Se mezclaron 20 µg de cada muestra con 5 µl de tampón de muestra LDS de NuPAGE (4X) (Invitrogen), 2 µl de agente reductor de NuPAGE (10X) (Invitrogen) y agua desionizada para obtener un volumen final de 20 µl (21 µl para la muestra correspondiente al concentrado de plaquetas activado). La mezcla resultante se calentó entonces durante 10 minutos a 70 °C y se sometió a SDS-PAGE usando un gel en gradiente de poliacrilamida del 4-12 % (Bis-Tris de NuPAGE, Invitrogen).

La separación de las proteínas se realizó a un voltaje constante de 200 V, durante 35 minutos, con una corriente esperada de 150 mA/gel. Los geles resultantes se tiñeron con azul de Coomassie R-250.

Se usó el marcador de proteína el patrón sin tñir Mark 12 (Invitrogen) para determinar el peso molecular de las proteínas contenidas en las muestras. El marcador Mark 12 se cargó sobre un gel de Bis-Tris al 4-12 % Novex de NuPAGE con MES (Invitrogen) y se tiñó con azul de Coomassie R-250 después de la separación. Resultados correspondientes se desvelan en la Figura 4.

El perfil de proteínas del concentrado de plaquetas de partida tratado por el procedimiento con disolvente/detergente parece no poseer diferencia importante con el del concentrado de plaquetas de partida no tratado, mientras que el perfil de proteínas del concentrado de plaquetas activado se diferencia significativamente, como se demuestra por la ausencia de bandas en las regiones de 40 a 70 kDa, bandas que se corresponden respectivamente con las subunidades alfa, beta y gamma de 63,5, 56 y 47 kDa del fibrinógeno.

I.9-Ensayo de actividad de factores de crecimiento

Con el fin de determinar si los factores de crecimiento resultantes del tratamiento con S/D de plaquetas mantuvieron o no su actividad (1 % de TnBP -1 % de Triton X-45), se realizaron estudios de cultivo celular *in vitro* usando la línea celular MG-63 similar a osteoblastos humanos. Así, la respuesta celular de células MG-63 sometidas a concentrados de factores de crecimiento resultantes tanto de S/D-PC como de Act-PC se evaluó investigando la morfología y viabilidad celular.

Se cultivaron 10^5 a 10^6 células en placas de Petri de 35 mm usando 90 % de medio esencial mínimo (MEM) de Eagle con glutamina 2 mM, BSS de Eagle (disolución salina equilibrada) ajustada a 1,5 g/l de bicarbonato sódico, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato de sodio 1,0 mM, 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor y opcionalmente con 5 % de los concentrados de factores de crecimiento S/D-PC o de Act-PC. Después de la incubación en una atmósfera humidificada que comprendía 5 % de CO₂ y 95 % de aire a 37 °C, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Gibco, RU), luego se desprendieron con una disolución de tripsina-EDTA (0,25 % de tripsina) a 37 °C durante 5 min, se centrifugaron y se suspendieron para la posterior prueba de células.

Se usó el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) para detectar células vivas/muertas (ensayo de viabilidad). También se realizaron observaciones de microscopía electrónica para investigar la morfología de las células.

Se usó ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) para monitorizar la proliferación celular. Brevemente, se añadieron 500 µl de MTS (Celliter 96 Promega Corp., EE.UU.) a cada muestra. Después de la incubación a 37 °C durante 60 min, la absorbancia a 490 nm se midió usando un lector de microplacas.

I.10-Ensayo de inactivación de virus

Se realizaron estudios de validación viral del tratamiento con disolvente y/o detergente usado para la lisis del concentrado de plaquetas de partida realizando experimento de reducción de escala siguiendo pautas internacionales tales como aquellas de EMEA y las recomendaciones de la OMS. 50 ml de un concentrado de plaquetas de partida se enriquecieron independientemente con suspensión madre de un virus relevante (VIH; virus de la inmunodeficiencia humana) y tres virus modelo, virus de la diarrea viral bovina (VDVB), que es un modelo para virus de la hepatitis C, virus de la pseudorabia (VPR), que se usa algunas veces como modelo para VHB en ausencia de otro virus modelo *in vitro* conveniente y virus de la estomatitis vesicular (VEV). Se introdujeron suspensiones madre de alto título de estos virus en el concentrado de plaquetas de partida y se añadió una mezcla de 1 % de TnBP y 1 % de Triton X-45. La infectividad viral se evaluó antes y en diferentes momentos de tiempo durante el tratamiento con disolvente-detergente para determinar la cinética de inactivación viral. Se realizaron cultivos celulares *in vitro* para determinar la infectividad y los datos se expresaron en valores de TCID₅₀/ml. Los datos obtenidos revelaron que el tratamiento con S/D produjo inactivación completa de los 4 virus en el plazo de 5 minutos desde el tratamiento (el primer punto de tiempo evaluado), ya que no se encontró infectividad viral residual. Los factores de reducción obtenidos fueron >5,6 log₁₀ para VIH, >6,6 log₁₀ para VDVB, >6,4 log₁₀ para VPR y >7,0 log₁₀ para VEV. Por tanto, el tratamiento de lisis con disolvente y/o detergente garantiza la robusta inactivación viral de virus envueltos en lípidos potencialmente presentes en el lisado del concentrado de plaquetas de partida.

I.11-Composición de factores de crecimiento de plaquetas congeladas caducadas

Se transfirieron concentrados de plaquetas caducadas (más de 5 días después de la extracción) a un congelador a -20 °C y se almacenaron durante un mes. Entonces se descongelaron a 35 °C en un baño de agua y se realizaron experimentos idénticos a los descritos con plaquetas frescas. Se midió el contenido de factores de crecimiento en las diversas preparaciones. Se desvelan resultados correspondientes en las Figuras 5 y 6.

I.12-Ensayo de formación de coágulos

El concentrado de factores de crecimiento resultante del concentrado de plaquetas de partida tratado por S/D se recuperó después de eliminar el disolvente y detergente por extracción con aceite. Se introdujeron 5 ml del concentrado de factores de crecimiento resultante en una jeringa de 5 ml. Se introdujeron 5 ml de trombina bovina a 500 UI/ml en otra jeringa de 5 ml. Ambas jeringas se posicionaron sobre un aplicador de jeringa doble conectado a una única boquilla. Los dos componentes fueron obligados a pasar a través de ella. Se formó un gel de plaquetas en el plazo de 5 segundos.

II-RESULTADOS

II.1-Cifras de células

Se estudiaron diez concentrados de plaquetaféresis de diez donantes diferentes. El concentrado de plaquetas resultante de la plaquetaféresis tuvo una media de $1064 \pm 235,2 \times 10^6$ plaquetas/ml (intervalo: 782 - 1358×10^6 plaquetas/ml), un cifra de WBC media de $0,1125 \pm 0,025 \times 10^6$ /ml (intervalo: 0-0-1-5) y un contenido de RBC medio de $0,0212 \pm 0,025 \times 10^6$ /ml.

II.2-Contenido de factores de crecimiento

La concentración media +/- desviación estándar (DE), mínimo y máximo en PDGF-AB, TGF-β1, EGF y IGF-1 en las diversas preparaciones de plaquetas, y valores de p se indican en la Tabla 1. Pueden observarse puntos de datos individuales para cada serie de experimentos en la Fig. 2.

Tabla 1: Concentración media de factores de crecimiento (ng/ml) en las plaquetas de partida (A), después del tratamiento con 1 % de TnBP-1 % de Triton X-45 (B) y después de la activación por CaCl₂ (C) seguido de tratamiento con 1 % de TnBP-1 % de Triton X-45 del concentrado (D) - NS: diferencia no significativa

		PDGF-AB (N=10)	TGF-β1 (N=10)	EGF (N=8)	IGF (N=6)
A	m	13.8	16.6	<0.0007	83.4
	SD	14.3	14.3	-	32.8
	Min	2.2	1.1	-	60.1
	Max	49.5	36.0	-	162.7
B	m	184.4	192.2	2.2	88.4
	SD	80.2	37.4	1.6	33.5
	Min	107.7	140.4	0.7	68.8
	Max	392.6	272.6	5.0	170.1
C	m	84.6	63.8	0.9	117.2
	SD	35.5	14.1	0.6	34.9
	Min	52.8	48.6	0.2	82.3
	Max	209.5	88.5	1.6	195.3
D	m	88.3	68.6	1.40	112.4
	SD	45.9	27.2	1.0	39.7
	Min	52.0	38.3	0.5	73.0
	Max	209.5	132.1	3.0	202.1
p value	B vs A	<0.001	<0.001	<0.05	0.025
	C vs A	<0.001	<0.001	<0.05	<0.001
	B vs C	<0.001	<0.001	0.044	<0.001
	B vs D	<0.001	<0.001	0.087	<0.01
	C vs D	NS	NS	NS	NS

El contenido de PDGF-AB medio en el concentrado de plaquetas de partida fue 13,8 +/- 14,3 ng/ml (N=10). Después del tratamiento con S/D directo por TnBP-Triton X-45, el contenido aumentó significativamente ($p < 0,001$) a 184,4 +/- 80,2 ng/ml, correspondiente a aproximadamente un aumento de 13 veces cuando se comparó con el concentrado de plaquetas de partida. Si los concentrados de plaquetas de partida se activaron primero por CaCl_2 , el contenido también aumentó significativamente (84,6 +/- 35,5; $p < 0,001$) pero menos (aumento de aproximadamente 6 veces), y siguió esencialmente sin cambiar (88,3 +/- 45,9; NS) durante el posterior tratamiento con S/D. El contenido de PGDF-AB fue significativamente mayor en plaquetas tratadas con S/D no activadas que en plaquetas activadas y en plaquetas activadas/tratadas con S/D ($p < 0,001$).

Se encontraron datos similares para TGF- β 1. El contenido de TGF- β 1 medio en el concentrado de plaquetas de partida fue 16,6 +/- 14,3 ng/ml (N=10). Después del tratamiento directo con S/D, el contenido de TGF- β 1 aumentó casi 12 veces en comparación con el PC de partida a 192,2 +/- 37,4 ng/ml ($p < 0,001$). Si los concentrados de plaquetas de partida se activaron primero por CaCl_2 , el contenido aumentó aproximadamente 4 veces (63,8 +/- 14,1 ng/ml) ($p < 0,001$) y siguió siendo no significativamente diferente durante el posterior tratamiento con S/D (68,6 +/- 27,2 ng/ml). De nuevo, el contenido medio de TGF- β 1 fue significativamente mayor ($p < 0,001$) en plaquetas tratadas con S/D que en plaquetas activadas y activadas/tratadas con S/D.

El EGF fue indetectable ($< 0,7$ pg/ml) en el concentrado de plaquetas de partida, pero se volvió detectable después del tratamiento con S/D con un contenido de EGF medio (2,2 +/- 1,6 ng/ml; N=6) que fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que el obtenido después de la activación por CaCl_2 (0,9 +/- 0,6 ng/ml) ($p < 0,05$), o después de la activación por CaCl_2 seguido del posterior tratamiento con S/D (1,4 +/- 1,0 ng/ml).

El contenido de IGF-1 medio fue 83,4 +/- 32,8 ng/ml en el concentrado de plaquetas de partida (N=8). A diferencia de los otros factores de crecimiento derivados de plaquetas, no pareció aumentar significativamente después del tratamiento con S/D (88,4 +/- 33,5; $p = 0,025$). El contenido medio fue incluso ligeramente ($p < 0,001$) mayor en las preparaciones de plaquetas después de la activación por CaCl_2 (117,2 +/- 34,9 ng/ml) y siguió siendo estable después del posterior tratamiento con S/D (112,4 +/- 39,7 ng/ml).

La cantidad total de PDGF-AB, TGF- β 1, EGF y IGF-1 recuperada de 150 ml de concentrado de plaquetas fue 28213, 29406, 336 y 13525 ng después del tratamiento con S/D directo (153 ml) y 10152, 7156, 108 y 14064 ng después de la activación por CaCl_2 , respectivamente, teniendo en cuenta el 20 % de pérdida media de volumen debido a la formación de gel de plaquetas (120 ml). Esto confirma la mayor eficiencia del tratamiento con S/D para liberar PDGF-AB, TGF- β 1 y EGF cuando se compara con la activación por CaCl_2 .

La Tabla 2 compara el contenido en factores de crecimiento derivados de plaquetas en un concentrado de plaquetas fresco de partida (A), después de la centrifugación (para sedimentar y eliminar las plaquetas) seguido de tratamiento con TnBP-Triton X-45 del sobrenadante (B) y después del tratamiento con S/D del concentrado de plaquetas de partida por 1 % de TnBP-1 % de Triton X-45 (C) o 2 % de TnBP (D). El contenido de PDGF-AB, TGF- β 1, EGF y IGF-1 en el concentrado de plaquetas sin procesar (A) estuvo de acuerdo con datos previos (Tabla 1). Cuando el sobrenadante libre de plaquetas (B) se sometió a TnBP-Triton X-45 (B), el contenido en PDGF-AB, TGF- β 1 o EGF siguió siendo bajo o indetectable (3,9; 1,1; $p < 0,001$), mientras que el contenido de IGF-1 fue alto, pero similar a la del concentrado de plaquetas de partida (75,4 frente a 72,2 ng/ml). Por tanto, la liberación de PDGF-AB, TGF- β 1 y EGF durante el tratamiento con S/D fue debido a la presencia de plaquetas. El aumento en el contenido de factores de crecimiento derivados de plaquetas en el lisado de plaquetas tratado con 1 % de TnBP-1 % de Triton X-45 o 2 % de TnBP fue similar. Además, los concentrados de plaquetas sometidos a un tratamiento con tanto 1 % de Triton X-45 como 1 % de Triton X-100, siendo el detergente posteriormente eliminado por adsorción a tC18 en el lote (SP1T45tC18 y SP1T100tC18) sin extracción con aceite, mostró que la liberación de factores de crecimiento PDGF-AB, TGF- β 1, IGF y EGF disminuyó dentro del intervalo observado después del tratamiento con 2 % de TnBP solo o con 1 % de TnBP y 1 % de Triton X-45, indicando así que el grado de lisis de plaquetas parece ser esencialmente el mismo usando tanto esta combinación de disolvente y detergente como el disolvente o el detergente solo.

Finalmente, los datos (no mostrados) indicaron que la centrifugación de las muestras a 10000 x g o a 800 x g no tuvieron un impacto sobre la cantidad de factores de crecimiento derivados de plaquetas medidos en los ensayos.

Tabla 2: Concentración en diversos factores de crecimiento (ng/ml) del concentrado de plaquetas de partida (A), después de tratamiento con TnBP-Triton X-45 del sobrenadante libre de plaquetas centrifugado (B), después de tratamientos con TnBP-Triton X-45 (C) o 2 % de TnBP (D) del concentrado de plaquetas de partida.

	PDGF-AB	TGF- β 1	EGF	IGF-1
A	2.9	1.1	<0.0007	72.2
B	3.9	1.1	<0.0007	75.4
C	128.7	207.9	0.8	79.9
D	133.7	185.6	1.2	89.8

Además, la concentración de fibrinógeno, fibronectina, albúmina, inmunoglobulina IgG, además de los factores de coagulación II, VII, VIII, IX, X, XI, XIII y de factor de von Willebrand, se midieron en los concentrados de factores de crecimiento resultantes tanto del tratamiento con S/D del concentrado de plaquetas de partida como en el concentrado de plaquetas activado por CaCl_2 . Estos resultados se desvelan en la Tabla 3.

Tabla 3: Concentraciones comparadas en diversas proteínas de los concentrados de factores de crecimiento resultantes tanto del tratamiento del concentrado de plaquetas de partida con 1 % de TnBP-1 % de Triton X-45 según la invención (S/D-PC) como de la activación del concentrado de plaquetas de partida con CaCl_2 (Act-PC).

Proteínas	S/D-PC	Act-PC
Fibrinógeno (g/L)	2.6	0.2
Fibronectina (g/L)	0.33	0.12
Factor VIII (iu/ml)	0.92	<0.1
Factor II (iu/ml)	1.2	<0.1
Factor IX (iu/ml)	1.02	<0.1
Factor X (iu/ml)	1.15	<0.1
Factor VII (iu/ml)	1.08	<0.1
Factor XIII (iu/ml)	0.87	<0.1
Factor XI (iu/ml)	1.35	<0.1
Von Willebrand factor (iu/ml)	0.95	<0.1
Albúmina (g/L)	33.8	32.5
IgG (g/L)	11.5	11.2

Por tanto, parece que el concentrado de plaquetas activado está casi completamente agotado en fibrinógeno y en factores de coagulación.

II.3-Experimentos de activación de trombina bovina

Para descartar la hipótesis de que el tratamiento con CaCl_2 /perlas condujo solo a la activación parcial de las plaquetas, explicando así potencialmente el menor contenido de PDGF-AB, TGF- β 1 y EGF en los concentrados en comparación con los lisados de S/D, el contenido de estos factores de crecimiento derivados de plaquetas se determinó (Figura 3) en los concentrados de plaquetas que se activaron primero por CaCl_2 y luego se sometieron adicionalmente a tratamiento por trombina bovina (Act-T) y trombina con tratamiento con S/D adicional (Act-T-S/D). La Figura 3 muestra el contenido de PDGFAB (A), TGF- β 1 (B) y EGF (C) en el concentrado de plaquetas de partida (inicial), después de la activación por CaCl_2 (Act), seguido de la activación con trombina bovina (Act-T) y tratamiento con S/D (Act-T-S/D). Puede observarse que la activación adicional con trombina bovina no aumenta la liberación de PDGF-AB (A), TGF- β 1 (B) y EGF (C) cuando se compara con la activación por CaCl_2 .

Se demuestra por primera vez que la liberación de factores de crecimiento de plaquetas, y en particular PDGF-AB, TGF- β 1 y EGF, es significativamente mayor cuando el tratamiento con S/D se realiza sobre plaquetas que cuando las plaquetas se activaron por calcio y/o trombina. El tratamiento con S/D supuestamente induce una lisis de las membranas de plaquetas ricas en lípidos, conduciendo a la liberación de factores de crecimiento derivados de plaquetas de los alfa-gránulos intracelulares. El hecho de que la liberación de aquellos factores de crecimiento derivados de plaquetas sea inferior cuando la activación de trombina se aplica primero resulta probablemente del hecho de que las plaquetas agregadas y parte de los factores de crecimiento derivados de plaquetas liberados están atrapados en la red de fibrina (conocida como gel de plaquetas) formada por la polimerización inducida por trombina del fibrinógeno presente en el concentrado de plaquetas de partida. De hecho, la posibilidad de que CaCl_2 produjera solo activación parcial y formación de coágulos incompletos de trombina endógena se descarta por el hecho de que la posterior adición de aproximadamente 48 unidades NIH de trombina bovina/ml a los concentrados de plaquetas activados no condujo a una elevada liberación de factores de crecimiento derivados de plaquetas. La completa activación de plaquetas también se confirma por las concentraciones extremadamente bajas (o indetectables) de fibrinógeno y de factores de coagulación como se ha desvelado anteriormente en la Tabla 3.

Similarmemente (no mostrado), los presentes inventores encontraron que el contenido de factores de crecimiento de plaquetas en los concentrados fue similar cuando se realizó una activación del concentrado de plaquetas con trombina bovina. Los presentes inventores también encontraron que el contenido de IGF-1 sigue esencialmente igual después del tratamiento con S/D, y solo aumentó ligeramente después de la activación con calcio/trombina. Este

resultado probablemente refleja el hecho de que la mayoría del IGF está presente en una forma circulante libre en plasma y que solo una proporción mínima está presente en plaquetas.

Los datos de los presentes inventores muestran que la lisis de plaqueta por tratamiento con S/D parece ser un medio más eficaz para liberar factores de crecimiento de plaquetas de gránulos de plaqueta intracelulares en los exudados en comparación con otros procedimientos usados tales como activación de trombina, ciclos de congelación-descongelación y/o liofilización. Estudios previos han encontrado que los niveles de PDGF medios en suero de sangre humana completa es 17,5 ng/ml y 0,06 ng por 10^6 plaquetas. Esto se corresponde con aproximadamente 60 ng/ml en el concentrado de plaquetas por aféresis usado en el estudio de los presentes inventores mientras que los presentes inventores encontraron una media aproximadamente tres veces mayor en el concentrado de plaquetas tratado por S/D. Los datos de los presentes inventores muestran adicionalmente que la liberación potenciada de PDGF-AB, TGF- β 1 y EGF de plaquetas se obtiene si el tratamiento con S/D se realizó o no usando tanto la combinación del 1 % de TnBP-1 % de Triton X-45, 2 % de TnBP como 1 % de Triton X-45 o Triton X-100, y que el tratamiento de extracción con aceite implementado para la eliminación de los agentes S/D no reduce el contenido de los 4 factores de crecimiento de plaquetas evaluados en los lisados de plaquetas.

II.4-Contenidos de lípidos comparados de concentrados de factores de crecimiento

Se midieron y se compararon los contenidos de lípidos del concentrado de factores de crecimiento de plaquetas resultantes tanto del tratamiento con S/D como de la activación por CaCl_2 del concentrado de plaquetas de partida con aquellos del concentrado de plaquetas de partida, como se desvela en la Tabla 4.

Tabla 4: Contenidos de lípidos comparados de concentrados de factores de crecimiento preparados a partir del mismo concentrado de plaquetas de partida, usando 0,5 % de Triton X-100 (Trit-PC), por tratamiento con S/D según la invención seguido de una extracción con aceite (S/D-PC 1), por tratamiento con S/D según la invención seguido de tres extracciones con aceite (S/D-PC 3), o por la activación por CaCl_2 de plaquetas.

	Colesterol (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)
Partiendo de PC	164	170	33	99
Trit-PC	160	162	101	62
S/D-PC 1	32	20	11	0
S/D-PC 3	33	43	2	0
Act-PC	150	156	31	97

El contenido de lípido se probó por un máquina de tecnología clínica Hitachi. Cada muestra probada se preparó a partir del mismo concentrado de plaquetas de partida que tenía un valor de pH de pH 7,2 y que contenía 886×10^3 plaquetas/ μl , $0,1 \times 10^3$ glóbulos blancos (WBC)/ μl y $0,08 \times 10^6$ glóbulos rojos (RBC)/ μl .

Como se ha desvelado en la Tabla 4, la cantidad de LDL (lipoproteínas de baja densidad), HDL (lipoproteínas de alta densidad), triglicéridos y colesterol es significativamente menor en el concentrado de factores de crecimiento S/D-PC preparado por tratamiento con S/D seguido de extracción con aceite, cuando se comparó con plaquetas tratadas con Triton o con plaquetas activadas. Además, no se observó diferencia significativa cuando las plaquetas lisadas por tratamiento con S/D se extrajeron por una o tres extracciones con aceite.

El agotamiento del concentrado de factores de crecimiento de la invención en colesterol, triglicéridos y LDL es de gran interés para uso clínico y terapéutico, ya que la función de los triglicéridos, además de la de la combinación LDL-colesterol, es muy conocida en el desarrollo de aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares mediante la formación de placas en el sistema arterial y venoso, conduciendo así a infartos de miocardio, accidentes cerebrovasculares y enfermedades vasculares periféricas.

El agotamiento en lípidos también será de gran interés para las técnicas de fraccionamiento cromatográfico aniónico y/o catiónico adicionales que pueden llevarse a cabo sobre el concentrado agotado en lípidos.

II.5-Actividad de factores de crecimiento

Los análisis microscópicos demostraron cambios en la forma, tamaño y número de células: se observaron en particular numerosas células fusiformes cuando las células se incubaron con el concentrado de factores de crecimiento derivados de plaquetas resultante de tratamiento con S/D o de la activación por CaCl_2 del concentrado de plaquetas de partida. Además, la cifra de células mostró un aumento significativo en el número de osteoblastos MG-63 en un modo dependiente del tiempo y la dosis cuando las células se incubaron con el concentrado de factores de crecimiento S/D-PC, cuando se comparó con Act-PC o con células que no se incubaron con concentrados de factores de crecimiento. El análisis de MTT también mostró un aumento en la actividad celular para

células incubadas en presencia del concentrado de factores de crecimiento S/D-PC cuando se comparó con células tratadas con Act-PC. Ni los concentrados de factores de crecimiento S/D-PC ni Act-PC mostraron un efecto citotóxico sobre los osteoblastos MG-63.

Por tanto, este estudio demuestra que los factores de crecimiento resultantes de tanto plaquetas tratadas con S/D como plaquetas activadas siguen siendo activos después del procedimiento de extracción seleccionado. Sin embargo, los experimentos de los presentes inventores mostraron un aumento significativo en las respuestas de células cuando las células se incubaron con el concentrado de factores de crecimiento obtenido por tratamiento con S/D. Este efecto mejorado del concentrado obtenido mediante el procedimiento de la invención sobre células MG-63 puede tanto resultar del elevado contenido en factores de crecimiento, y particularmente en PDGF, TGF- β 1 y EGF (siendo la importancia de estos factores conocida en la cicatrización y regeneración de tejido), como de una elevada cantidad de sustancias biológicamente activas adicionales que están ausentes o infrarrepresentadas en el concentrado de plaquetas activadas.

La capacidad de la mezcla de HPGF viralmente inactivada para estimular el crecimiento celular también se evaluó usando fibroblasto de riñón embrionario humano (HEK293A; Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, EE.UU.) y fibroblasto de córnea de conejo de Statens Serum Institute (SIRC) (ATCC CCL-60, Bioresource Collection and Research Center, Hsing-chu, Taiwán). Las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera controlada que contenía 5 por ciento de CO₂. Las células se cultivaron a una densidad de 2×10^3 células por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano (Greiner bio-one, Tokio, Japón) en un medio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) complementado con 10 % de SBF, aminoácidos no esenciales 0,1 mM y piruvato de sodio 1 mM. Se dejó que las células se adhirieran durante 18 horas, y luego se dejaron morir durante 6 horas en un medio sin suero. Después de dos lavados con medio sin suero, las células se cultivaron durante hasta 5 días en medio D-MEM complementado con 10 % de SBF (Gibco, Invitrogen), concentrado de plaquetas activadas o HPGF (preparado a partir de PC con tratamiento con S/D, extracción con aceite y cromatografía hidrófoba). Los cultivos celulares también se realizaron usando diversas concentraciones de la fracción de HPGF para detectar cualquier posible signo de toxicidad celular y para evaluar la dosis óptima para promover el crecimiento celular en ausencia de SBF. El crecimiento celular se determinó usando el compuesto de tetrazolio MTS de Promega Corporation (Madison, Wisconsin, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los resultados de los ensayos de MTS obtenidos con células HEK293A se muestran en la Fig. 16. Se encontró buena viabilidad cuando las células se cultivaron en D-MEM complementado por 10 % (v/v) de SBF. No hubo crecimiento celular en ausencia de SBF (B). La viabilidad celular también fue buena cuando se cultivaron en presencia de 10 % (v/v) de mezclas de PC y HPGF activadas después de tC18, C18 o SDR, respectivamente, sugiriendo tanto estimulación del crecimiento celular, además de ausencia de toxicidad. La Fig. 16 muestra que MTS mejoró de un modo dependiente de la dosis cuando la concentración de HPGF aumentó del 3 al 20 %. Incluso a una concentración del 20 %, la mezcla de HPGF no presentó toxicidad para las células. Los datos de MTS obtenidos con células SIRC están en la Fig. 16. HPGF pudo estimular la proliferación de SIRC. De forma interesante, toda la concentración de HPGF probada (hasta el 20 %) estimuló el crecimiento celular, pero se encontró proliferación óptima, comparable a la obtenida con 10 % de SBF, si se usa 0,1 al 0,5 % de HPGF.

HPGF soportó el crecimiento celular y mantuvo la viabilidad celular. HPGF al 10 % (v/v) en medio D-MEM estimuló la proliferación de la línea celular de fibroblastos HEK293A humanos. El crecimiento celular fue similar al observado usando 10 % de concentrado de PC activado o 10 % de SBF. Esto indicó que (a) la actividad fisiológica del HPGF no fue alterada durante la inactivación viral y el procedimiento de eliminación de S/D y que la preparación final no presentó toxicidad celular. Los valores de MTS aumentaron con mayores concentraciones de HPGF del 3 % al 20 % de (v/v). HPGF también soportó el crecimiento de la línea celular SIRC de conejo de un modo comparable a SBF. De forma interesante, las concentraciones de HPGF más eficaces en el día 5 fueron de tan solo del 0,3 al 0,5 %. El crecimiento y la morfología celular normal demostraron que el HPGF no indujo toxicidad. Además, este ensayo confirma que enriquecer el medio de crecimiento con lisados plaquetarios soporta el crecimiento celular y mantiene las viabilidades celulares, permite la expansión *in vitro* de MSC humanas, potencia su potencial de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica, disminuye el tiempo requerido para alcanzar la confluencia y aumenta el tamaño de los fibroblastos de las unidades formadoras de colonias, en comparación con SBF.

Estos resultados también confirman el importante potencial del concentrado de factores de crecimiento de la invención u obtenido mediante el procedimiento de la invención en tratamientos terapéuticos, además de para preparar medios de cultivo de células mejoradas. De hecho, el concentrado de factores de crecimiento de la invención mantiene la actividad de estimulación del crecimiento celular de concentrados de plaquetas sin generar toxicidad. Por tanto, puede considerarse como candidato para sustituir SBF y concentrados de plaquetas activados en terapia con células y medicina regenerativa.

II.6 - Preparación de un concentrado de GF agotado en fibrinógeno

a. Preparación de la mezcla de GF

Se procesó PC (aproximadamente 300 ml) en el plazo de 24 horas después de la extracción. Primero se sometió a

un tratamiento con disolvente/detergente (S/D) en la bolsa usando una combinación de 1 % de fosfato de tri-n-butilo (TnBP; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y 1 % de Triton X-45 (Sigma, Missouri, EE.UU.) (total = 6 ml). La mezcla de S/D-PC se agitó vigorosamente durante 1 min para garantizar la mezcla completa y luego se sumergió en un baño de agua a 31 °C durante al menos 1 h bajo agitación suave constante. Al completarse el tratamiento con S/D, la mezcla de S/D-PC se sometió a una extracción con 30 ml (equivalente al 10 % de v/v) de aceite de soja (Sigma, Missouri, EE.UU.). Después de la adición del aceite, la bolsa se agitó vigorosamente durante 1 min y luego se puso sobre un agitador giratorio durante 20 min. La mezcla se dejó decantar durante 30 min para separar la fase aceitosa de la fase de PC. El PC (capa inferior; aproximadamente 280 ml) se recuperó por gravedad. Tras completarse la extracción con aceite, S/D-PC se centrifugó a 10.500 rpm (10.400 x g) durante 15 min a temperatura ambiente (20-25 °C).

Se procesaron 30 ml del sobrenadante sin dilución por columna de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando un material de empaquetamiento de octadecilo (C18; lote WAT020594, polvo seco; porosidad de 125 Å; 55-105 µm de tamaño de partícula) de Waters Corporation (Guyancourt, Francia). El material cromatográfico se envasó en una columna y se lavó con 5 volúmenes de cloruro sódico 1 M y 20 % de etanol, luego se equilibró con 5 volúmenes de tampón citrato 20 mM, pH 7,4. El S/D-PC se inyectó a una relación de 7 ml por ml de sorbente HIC y una velocidad de flujo lineal de 22,6 cm/h. El efluente de C18 (C18-GF) se recuperó tan pronto como la absorción a 280 nm aumentó y hasta que la absorción volvió al nivel inicial. Bajo el contexto experimental usado, el volumen de la fracción de saturación fue 60-80 ml, correspondiente a un factor de dilución de 2 a 3 en comparación con el volumen de S/D-PC inyectado.

También se evaluaron otros dos sorbentes de HIC durante el transcurso del estudio, usando las mismas condiciones experimentales que se han descrito anteriormente: un sorbente tC18 (lote WAT036810; polvo seco; porosidad de 125 Å; tamaño de partícula de 36,1-54,2 µm; Waters Corporation) y un sorbente SDR HyperD (lote 20033-0223, 40-100 µm de tamaño de partícula; Pall-BioSeptra, Cergy Saint Christophe, Francia). Se obtuvieron resultados similares.

b. Eliminación de fibrinógeno por activación con trombina

Se eliminó fibrinógeno (y otros factores de coagulación) por activación de 10 ml de la mezcla de factores de crecimiento obtenida después de cromatografía en C18 añadiendo tanto (a) 0,3 ml de CaCl₂ 1 M (concentración final de 23 mM) como perlas de vidrio (para generar trombina humana endógena) o (b) 1000 UI de trombina bovina para alcanzar una concentración final de aproximadamente 50 UI/ml. La mezcla se puso bajo mezcla de rotación suave (60 rpm) hasta la formación del coágulo de fibrina. El sobrenadante se recuperó, se separó en alícuotas y se evaluó.

c. Medición de fibrinógeno

Tabla 4

Fracción	Fibrinógeno (mg/ml)
Factor de crecimiento de la mezcla después de cromatografía C18	0.9
Después de activación CaCl ₂	No detectable
Después de adición de 50IU/ml de trombina	No detectable

Los datos revelan que el fibrinógeno se eliminó completamente después de la activación usando CaCl₂ o usando trombina exógena.

d. Medición de factores de crecimiento

Tabla 5

Fracción	PFGF-AB	TGF-β1	VEGF
Factor de crecimiento de la mezcla después de cromatografía C18	15.5	75.2	0.46
Después de activación CaCl ₂	12.8	65.8	0.35
Después de adición de 50IU/ml de trombina	14.5	70.3	0.41

Los datos muestran que los factores de crecimiento están todavía presentes en el sobrenadante después de eliminar el fibrinógeno.

Por tanto, la mezcla de factores de crecimiento viralmente inactivada delecionada de fibrinógeno (mediante el procedimiento descrito anteriormente) puede usarse posiblemente como suplemento para cultivos celulares, y en particular para cultivos de citoblastos.

5 II.7-Inactivación viral

Además, hay amplias pruebas de que las condiciones de tratamiento con S/D usadas aquí inactivan eficazmente los virus de la envuelta transmitidos por la sangre, en particular VIH, VHB y VHC.

10 Como se ha desvelado anteriormente en el material y procedimiento, la combinación de 1 % de TnBP-1 % de Triton X-45 a 31 °C garantiza la reducción de factores de $> 5,6$, $> 6,6$ y $> 6,4 \log_{10}$ para VIH, VDVB y VPR en el plazo de 5 min desde el tratamiento, y también inactiva rápidamente $\geq 7,0 \log_{10}$ de VEV y virus modelo de Sindbis. Virus no envueltos, tales como VHA y parvovirus B 19, no se inactivarían por el tratamiento con S/D, pero solo son patógenos en algunos pacientes con funciones inmunitarias alteradas. La ausencia de mezcla reduciría fuertemente los riesgos
15 estáticos de contaminación de una preparación de factores de crecimiento derivados de plaquetas alógenos de un solo donante, pero adicionalmente también puede implementarse nanofiltración para reducir el riesgo de contaminación por virus no envueltos. Obviamente, las preparaciones de factores de crecimiento derivados de plaquetas, como se describen aquí, tendrían que producirse en el futuro en condiciones de buenas prácticas de fabricación (GMP), por ejemplo, por establecimientos de sangre (Guidelines on viral inactivation and removal
20 procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products. www.WHO.int. Ginebra, 2003:1-72). Tal tratamiento con S/D de preparaciones de plaquetas puede ofrecer varias ventajas prácticas para aplicaciones tópicas. Primero, la seguridad viral de donaciones alógenas mejoraría, permitiendo un potencial clínico más amplio de tales productos. Segundo, el mayor título de factores de crecimiento derivados de plaquetas liberado por el tratamiento con S/D podría posiblemente mejorar la rentabilidad de procedimientos usando concentrados de
25 plaquetas. Tercero, el procedimiento de inactivación viral podría facilitar el uso de factores de crecimiento derivados de plaquetas alógenos en aplicaciones en las que el uso de factores de crecimiento derivados de plaquetas recombinantes no está autorizado, o si está autorizado (como para el tratamiento de algunas úlceras diabéticas de las extremidades inferiores) cuando una combinación de factores de crecimiento derivados de plaquetas naturales pueda proporcionar desenlace sinérgico beneficioso. Finalmente, los factores de crecimiento derivados de plaquetas viralmente inactivados bien caracterizados también podrían usarse para la incorporación en andamiajes basados en
30 fibrina o artificiales para aplicaciones tópicas para apurar el proceso de curación, como una sustitución para suero bovino fetal o factores de crecimiento derivados de plaquetas recombinantes para estudios de manipulación de células, o para la expansión *ex vivo* de citoblastos mesenquimatosos y su diferenciación en células óseas, o condrocitos.

35 III. Separación de factores de crecimiento: Experimentos de cromatografía de intercambio iónico para eliminar S/D y separar fracciones de factores de crecimiento

40 1. Etapas de adsorción de lotes preliminares para seleccionar soporte cromatográfico apropiado y determinar la capacidad de unión para diversos factores de crecimiento

a. Prueba de adsorción de PDGF-AB

45 Se obtuvo S/D-PC como se ha descrito previamente. Se hizo 1 extracción con aceite para reducir el nivel de contaminación en TnBP y Triton X-45. Se lavaron 5 ml de gel SP-Sepharose FF, CM-Sepharose FF, DEAE-Sepharose FF en una columna para equilibrar los geles con citrato de sodio 20 mM, tampón NaCl 0,05 M a pH 7,5. Cuando los geles se equilibraron (= el pH y la conductividad del efluente son los mismos que el tampón de partida), las columnas se desempaquetaron y los geles se recuperaron en un vaso de precipitados. El pH de S/D-PC se
50 ajustó a 7,5 usando NaOH diluido. 1 g de cada gel se vertió en tubos separados y se eliminó el tampón adicional. Entonces se añadieron diversas cantidades de S/D-PC a los diversos geles. Girar los tubos lentamente durante 30 min. Dejar que el gel sedimente durante aproximadamente 5-10 min. Retirar 1 g de gel. A diferencia, se encontró sobrenadantes y tomar una muestra para medir el contenido en factores de crecimiento.

55 S/D-PC de partida contuvo 280 ng/ml de PDGF-AB. Los datos muestran muy claramente que la máxima adsorción de PDGF-AB se obtuvo si se usan los geles de intercambio catiónico SP-Sepharose FF y CM-Sepharose FF a relación variable de 3 a 10 ml de S/D-PC por 1 ml de gel. Se obtiene una adsorción particularmente alta usando SP-Sepharose FF como se revela por el hecho de que hay una baja cantidad de PDGF-AB en el sobrenadante después del contacto con SP-Sepharose FF a una relación de 10 ml de S/D-PC durante 1 g de gel. A diferencia, se encontró una gran cantidad de PDGF-AB en los sobrenadantes obtenidos después de la adsorción de S/D-PC sobre DEAE-Sepharose FF (aproximadamente 250 ng/g).
60 Estos datos se muestran en la Figura 7.

b. Pruebas de adsorción de VEGF

65 Se obtuvo S/D-PC como se ha descrito previamente. Se hizo 1 extracción con aceite para reducir el nivel de contaminación en TnBP y Triton X-45. Se lavaron 5 ml de gel SP-Sepharose FF, CM-Sepharose FF, DEAE-

Sepharose FF en una columna para equilibrar los geles con citrato de sodio 20 mM, tampón NaCl 0,05 M a pH 7,5. Cuando los geles se equilibraron (= el pH y la conductividad del efluente son los mismos que el tampón de partida), las columnas se desempaquetaron y los geles se recuperaron en un vaso de precipitados. El pH de S/D-PC se ajustó a 7,5 usando NaOH diluido. 1 g de cada gel se vertió en tubos separados y se eliminó el tampón adicional. Entonces se añadieron diversas cantidades de S/D-PC a los diversos geles. Girar los tubos lentamente durante 30 min. Dejar que el gel sedimente durante aproximadamente 5-10 min. Retirar en la medida de lo posible de los sobrenadantes y tomar una muestra para medir el contenido en factores de crecimiento.

La Figura 8 muestra el % de adsorción de VEGF sobre las diversas resinas basándose en la relación de S/D-PC con respecto al gel. Los datos muestran que hay adsorción limitada de VEGF si se usa el intercambiador aniónico DEAE-Sepharose FF especialmente a relaciones de 10 ml de S/D-PC por 1 g de gel, ya que esencialmente no se adsorbió VEGF. A diferencia, una mayor proporción (aproximadamente del 60 %) de VEGF se adsorbió por SP-Sepharose FF y CM-Sepharose FF.

c. Pruebas de adsorción de TGF- β 1

Se obtuvo S/D-PC como se ha descrito previamente. Se hizo 1 extracción con aceite para reducir el nivel de contaminación en TnBP y Triton X-45. Se lavaron 5 ml de gel SP-Sepharose FF, CM-Sepharose FF, DEAE-Sepharose FF en una columna para equilibrar los geles con citrato de sodio 20 mM, tampón NaCl 0,05 M a pH 7,5. Cuando los geles se equilibraron (= el pH y la conductividad del efluente son los mismos que el tampón de partida), las columnas se desempaquetaron y los geles se recuperaron en un vaso de precipitados. El pH de S/D-PC se ajustó a 7,5 usando NaOH diluido. 1 g de cada gel se vertió en tubos separados y se eliminó el tampón adicional. Entonces se añadieron diversas cantidades de S/D-PC a los diversos geles. Girar los tubos lentamente durante 30 min. Dejar que el gel sedimente durante aproximadamente 5-10 min. Retirar en la medida de lo posible de los sobrenadantes y tomar una muestra para medir el contenido en factores de crecimiento.

La Figura 9 muestra el % de adsorción de TGF- β 1 sobre las diversas resinas basándose en la relación de S/D-PC con respecto al gel. Los datos muestran que se obtuvo la máxima adsorción de TGF- β 1 si se usa el intercambiador aniónico DEAE-Sepharose FF a una relación de 3 ml de S/D-PC por 1 ml de gel, ya que se adsorbió más del 70 % de TGF- β 1. A diferencia, una pequeña proporción (aproximadamente 20 % o menos) de TGF- β 1 se adsorbió por CM-Sepharose FF, SP-Sepharose FF.

d. Pruebas de adsorción de EGF

Se obtuvo S/D-PC como se ha descrito previamente. Se hizo 1 extracción con aceite para reducir el nivel de contaminación en TnBP y Triton X-45. Se lavaron 5 ml de gel SP-Sepharose FF, CM-Sepharose FF, DEAE-Sepharose FF en una columna para equilibrar los geles con citrato de sodio 20 mM, tampón NaCl 0,05 M a pH 7,5. Cuando los geles se equilibraron (= el pH y la conductividad del efluente son los mismos que el tampón de partida), las columnas se desempaquetaron y los geles se recuperaron en un vaso de precipitados. El pH de S/D-PC se ajustó a 7,5 usando NaOH diluido. 1 g de cada gel se vertió en tubos separados y se eliminó el tampón adicional. Entonces se añadieron diversas cantidades de S/D-PC a los diversos geles. Girar los tubos lentamente durante 30 min. Dejar que el gel sedimente durante aproximadamente 5-10 min. Retirar en la medida de lo posible de los sobrenadantes y tomar una muestra para medir el contenido en factores de crecimiento.

La Figura 10 muestra el % de adsorción de EGF sobre las diversas resinas basándose en la relación de S/D-PC con respecto al gel. Los datos muestran que se obtuvo la máxima adsorción de EGF si se usa el intercambiador aniónico DEAE-Sepharose FF a una relación de 3 ml de S/D-PC por g de gel, ya que se adsorbió más del 70 % de EGF. A diferencia, una proporción más pequeña (15 al 30 %) se adsorbió por SP-Sepharose FF, e incluso menos (5 al 20 %) si se usa CM-Sepharose FF.

e. Conclusión

Se encontró que el intercambiador catiónico SP-Sepharose FF y CM-Sepharose FF se adaptaba a la adsorción de PDGF-AB y VEGF, mientras que DEAE-Sepharose FF dio datos satisfactorios para adsorber TGF- β 1 y EGF.

2. Experimentos de cromatografía en columna de SP-Sepharose FF

Se realizaron experimentos adicionales para confirmar la eliminación de S/D si se usan intercambiadores iónicos, del siguiente modo:

a. Preparación de S/D-PC

En este experimento, S/D-PC se sometió a una extracción con aceite. La cantidad de SP-Sepharose FF usada fue 10 ml (aproximadamente 10 g) para 100 ml de SP-PC sometido a 1 extracción con aceite, como se ha determinado por los experimentos de adsorción de lotes.

b. Equilibrado de columna

Se empaquetó SP-Sepharose FF en una columna (GE Healthcare). Después de empaquetar la columna, SP-Sepharose FF se equilibró en citrato 20 mM, tampón NaCl 0,05 M a pH 7,5. Este tampón de equilibrio migró a través de la columna a una velocidad de flujo lineal de 50 cm/h hasta que el pH y la conductividad del efluente fueron idénticos a los del tampón de equilibrio. Se registró la absorción del efluente a 280 nm.

c. Inyección de S/D-PC y recogida de saturación

El pH de S/D-PC se ajustó a 7,5 usando NaOH diluido y luego se inyectó sobre la columna a una velocidad de flujo lineal de 50 cm/h. El efluente se recogió tan pronto como empezó a aumentar la A280 nm.

d. Vuelta al nivel inicial y elución de factores de crecimiento

Cuando se inyectaron todos los S/D-PC, la columna se lavó con el tampón de equilibrio hasta que la A280 nm vuelve al nivel de referencia inicial.

Entonces se lavó SP-Sepharose FF por citrato 20 mM, tampón NaCl 1 M a pH 7,5 a 50 cm/h. El eluato se recogió tan pronto como empezó a aumentar la A280 nm y hasta la vuelta al nivel de A280 nm inicial.

e. Regeneración y almacenamiento de la columna

Entonces, la columna se regeneró por 2 volúmenes de columna de cloruro sódico 2 M, seguido de 2 volúmenes de columna de NaOH 0,5 N.

f. Resultados

La Tabla 6 da el contenido de factores de crecimiento en el eluato de la columna y la Tabla 7 proporciona el contenido en el disolvente-detergente final.

Tabla 6: Contenido de factores de crecimiento (ng/ml)

	PDGF-AB	VEGF	PDGF-AA	PDGF-BB
SD-PC	101.8 ± 41.43	1.211 ± 0.5113	9.342 ± 1.477	35.25 ± 12.34
SP-eluido	238.3 ± 87.09	1.18 ± 0.7244	3.488 ± 0.755	136.7 ± 44.22
SP-efluente	2.278 ± 1.055	0.3624 ± 0.1414	1.140 ± 0.5626	4.823 ± 0.0

La Tabla 6 muestra que el eluato de SP está enriquecido en PDGF-AB y PDGF-BB y permite separar tanto PDGF-AA como VEGF mientras que TnBP y Triton X-45 se encuentran en la fracción de saturación (efluente) (véase la Tabla 7). El eluato de PDGF-AB/VEGF 1 M tiene contaminación no detectable en estos agentes de inactivación viral.

Tabla 7: Contenido de disolvente y detergente

	TnBP ppm	Tritón X-45 ppm
SD-PC	850	1500
SP-eluido	< 2	< 2
SP-efluente	600	1180

3. Experimentos de cromatografía en columna de DEAE-Sepharose FF**a. Preparación de S/D-PC**

Se procesó PC (aproximadamente 300 ml) en el plazo de 24 horas después de la extracción. Primero se sometió a un tratamiento con disolvente/detergente (S/D) en la bolsa usando una combinación de 1 % de fosfato de tri-n-butilo (TnBP; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y 1 % de Triton X-45 (Sigma, Missouri, EE.UU.) (total = 6 ml). La mezcla de S/D-PC se agitó vigorosamente durante 1 min para garantizar la mezcla completa y luego se sumergió en un baño de agua a 31 °C durante al menos 1 h bajo agitación suave constante. Al completarse el tratamiento con S/D, la mezcla de S/D-PC se sometió a una extracción con 30 ml (equivalente al 10 % de v/v) de aceite de soja (Sigma, Missouri, EE.UU.). Después de la adición del aceite, la bolsa se agitó vigorosamente durante 1 min y luego se puso sobre un agitador giratorio durante 20 min. La mezcla se dejó decantar durante 30 min para separar la fase aceitosa

de la fase de PC. El PC (capa inferior; aproximadamente 280 ml) se recuperó por gravedad. Tras completarse la extracción con aceite, S/D-PC se centrifugó a 10.500 rpm (10.600 x g) durante 15 min a temperatura ambiente (20-25 °C).

5 b. DEAE-Sepharose FF Hi-Trap™

Se procesaron 20 ml de sobrenadante sin dilución por cromatografía de intercambio aniónico usando columna lista para usar previamente empaquetada. La cantidad de DEAE-Sepharose FF HiTrap™ usada fue 5 ml para 20 ml de muestra de S/D-PC. La columna se equilibró con 5 volúmenes de citrato 20 mM, tampón NaCl 0,05 M a pH 7,5. Se
10 inyectó S/D-PC (20 ml) a una velocidad de flujo de 50 cm/h seguido de tampón de equilibrio. La fracción de saturación (DEAE-BKT) se recuperó tan pronto como aumentó la absorción a 280 nm y hasta la vuelta de la absorción al nivel inicial. El volumen de la fracción de saturación fue 49,7 ml. Entonces, la columna se lavó adicionalmente con 5 volúmenes de equilibrado para eliminar completamente por lavado S/D en la fracción de saturación, entonces la columna se eluyó con citrato 20 mM, tampón NaCl 1 M a pH 7,5 y una velocidad de flujo
15 lineal de 50 cm/h. Este eluato se recogió tan pronto como aumentó la absorción a 280 nm y hasta la vuelta de la absorción al nivel inicial (volumen: 10 ml).

Las Figuras 12 y 13 muestran el contenido de EGF expresado en ng/ml y ng totales durante el procedimiento de preparación. El eluato correspondiente se recogió tan pronto como aumentó la absorción a 280 nm y hasta la vuelta de la absorción al nivel inicial. El volumen recogido fue 17,9 ml. La saturación y el eluato se sometieron a medidas de los agentes S/D y los factores de crecimiento (véase la Tabla 8).

Tabla 8: Contenido en TnBP y Triton X-45

25		TnBP, ppm	Triton X-45, ppm
	SD-PC después de un aceite	686	2245
	DEAE-Saturación	459	1580
30	DEAE Eluido	< 2	< 2

Los datos muestran que la etapa cromatográfica de DEAE eliminó los agentes de S/D que estaban presentes en S/D-PC después de una extracción con aceite. Los agentes de S/D se recogieron en la saturación y se encontró que
35 el eluato de NaCl 1 M no contenía cantidad detectable de estos agentes de S/D.

c. Contenido en factores de crecimiento VEGF y PDGF-AB

La saturación y el eluato se analizaron para su contenido en factores de crecimiento VEGF y PDGF-AB. Las Figuras
40 14 y 15 muestran el contenido en factores de crecimiento expresado en ng totales.

Los datos muestran que no se encontraron PDGF-AB y VEGF sobre la matriz de DEAE-Sepharose y estaban presentes en la saturación (en el contexto de la presente solicitud, los términos gel y matriz tienen el mismo significado). A diferencia, EGF se adsorbió sobre el gel y se eluyó, libre de los agentes de S/D, de la columna.

45 Los procedimientos cromatográficos aniónicos y/o catiónicos anteriormente mencionados pueden llevarse a cabo sobre S/D-PC extraído con aceite, como se ha ejemplificado anteriormente, pero también puede aplicarse directamente a S/D-PC sin extracción con aceite. Se prefiere llevar a cabo una extracción con aceite, ya que reduce el nivel de contaminación en TnBP y Triton X-45, reduciendo así el volumen de tampón necesario para lavar la columna, permitiendo una vuelta más rápida al nivel inicial. La extracción con aceite también reduce el contenido de lípidos, que favorecería la coagulación del material cromatográfico, reduciendo así la eficiencia de la técnica de separación. Sin embargo, puede omitirse la extracción con aceite.

50 Por tanto, los procedimientos cromatográficos aniónicos y/o catiónicos anteriormente mencionados pueden llevarse a cabo directamente después del tratamiento con S/D, pero preferentemente después de la extracción con aceite o en la saturación de la columna hidrófoba si se usa una después del tratamiento con S/D o después de la extracción con aceite.

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de un concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable que contiene tanto fibrinógeno como factor XIII, que comprende las siguientes etapas:

- a) poner en contacto un concentrado de plaquetas de partida no activado con un disolvente y/o un detergente, en el que dicho disolvente está seleccionado preferentemente del grupo que consiste en fosfatos de di- o trialquilo, fosfatos de di- o trialquilo con diferentes cadenas de alquilo, y es preferentemente el fosfato de tri-n-butilo (TnBP), en el que dicho detergente está seleccionado preferentemente 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 es más preferentemente Triton® x-45, Triton® X-100 o Tween® 80, y en el que la concentración final de cada uno de dicho disolvente y/o de dicho detergente oscila preferentemente del 0,2 al 5 % en volumen con respecto al volumen del concentrado de plaquetas de partida;
- b) incubar dicho concentrado de plaquetas de partida con el disolvente y/o detergente 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, y
- c) eliminar el disolvente y/o el detergente por extracción con aceite y/o medios cromatográficos, en el que la extracción con aceite se realiza preferentemente con un aceite de calidad farmacéutica, estando el aceite usado en una cantidad del 2 al 20 % en peso, o del 5 al 15 % en peso o del 5 al 10 % en peso, basado en el peso de la mezcla del concentrado de plaquetas con el disolvente y/o el detergente, y en el que los medios cromatográficos comprenden preferentemente una columna hidrófoba (fase inversa), preferentemente un material de empaquetamiento de sílice C18 o una SDR (eliminación de disolvente-detergente) Hyper D, o una columna cromatográfica de adsorción tal como una columna cromatográfica aniónica y/o catiónica; comprendiendo dicho procedimiento otra etapa de inactivar virus no envueltos por nanofiltración.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el concentrado de plaquetas de partida se pone en contacto tanto con 2 % de TnBP solo como con 1 % de TnBP y 1 % de Triton X-45, basado en el volumen del concentrado de plaquetas de partida.

3. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende además otra etapa (c1) en el que la etapa (c1) comprende al menos una separación por cromatografía aniónica y/o catiónica, en el que dicha cromatografía catiónica es preferentemente una cromatografía catiónica fuerte y/o la cromatografía aniónica es preferentemente una cromatografía aniónica débil.

4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa (c) comprende al menos una extracción con aceite, seguido de una cromatografía sobre intercambiador catiónico fuerte, y una cromatografía sobre intercambiador aniónico débil, siendo preferentemente dicho intercambiador catiónico fuerte SP-Sepharose y siendo preferentemente dicho intercambiador aniónico débil DEAE-Sepharose.

5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende otra etapa d) de concentración por ultrafiltración preferentemente sobre membranas con un valor de corte de 5000 Dalton o menos.

6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa adicional de inactivar virus no envueltos se realiza por nanofiltración usando una membrana de filtración de 10 a 75 nm de tamaño de poro.

7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende además una etapa preliminar que consiste en preparar un concentrado de plaquetas de partida antes de dicha etapa a), en el que el concentrado de plaquetas de partida se prepara por aféresis o por aislamiento de capa leucocitaria de sangre completa, y en el que dicho concentrado de plaquetas de partida es fresco, caducado o caducado y congelado.

8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende otra etapa e) de eliminar fibrinógeno de la mezcla de factores de crecimiento, preferentemente añadiendo CaCl_2 o trombina.

9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la preparación de un concentrado de factores de crecimiento de plaquetas viralmente inactivado coagulable adecuado para uso terapéutico y/o cosmético.

FIGURA 1

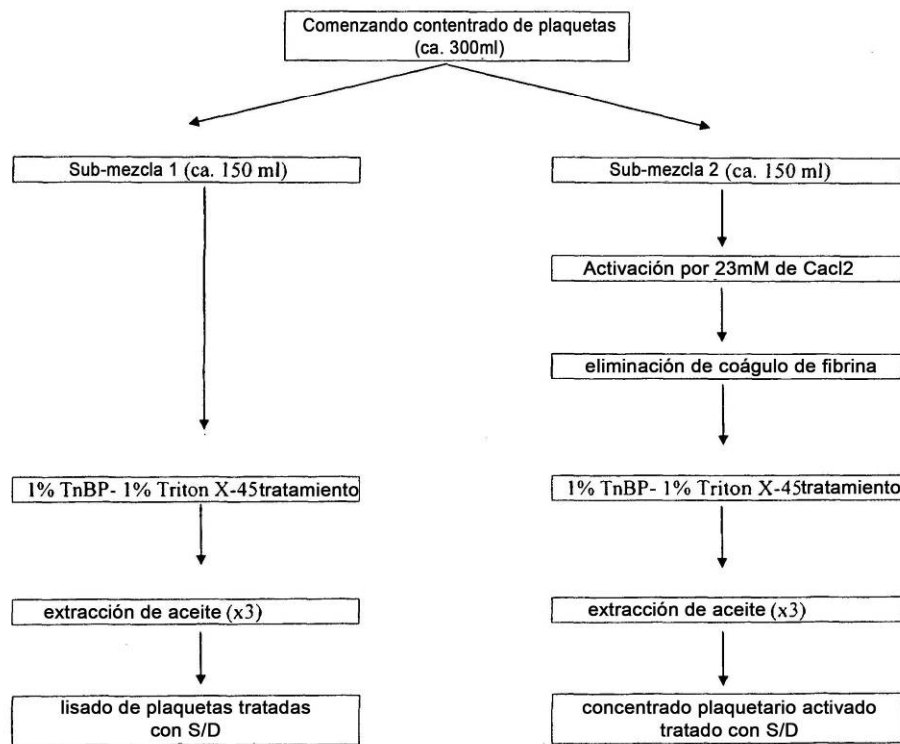


Figura 2

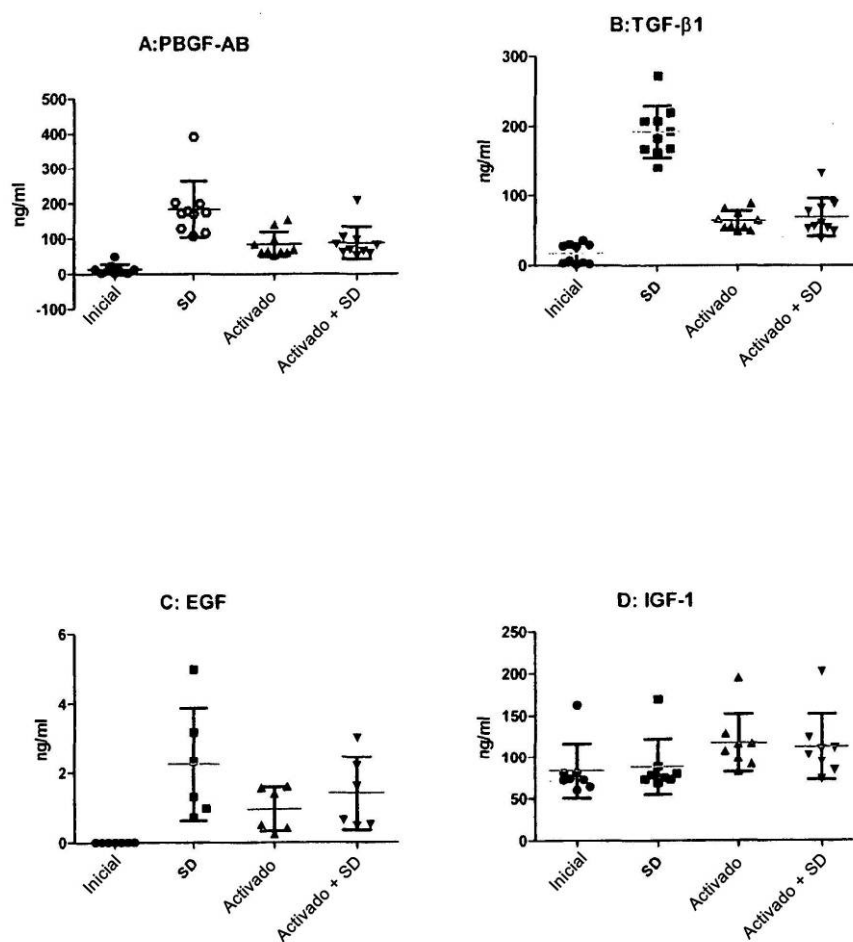


Figura 3

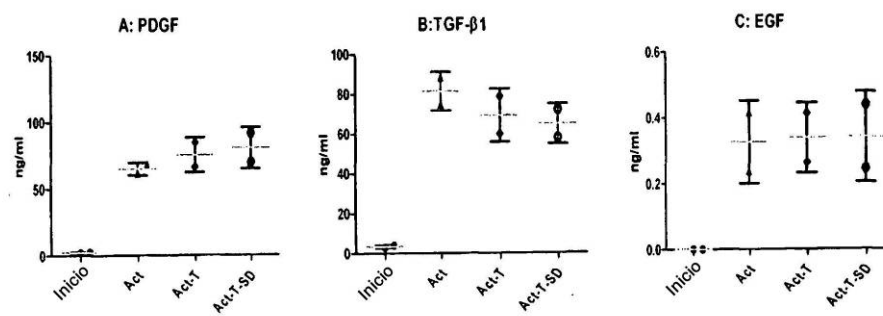


Figura 4

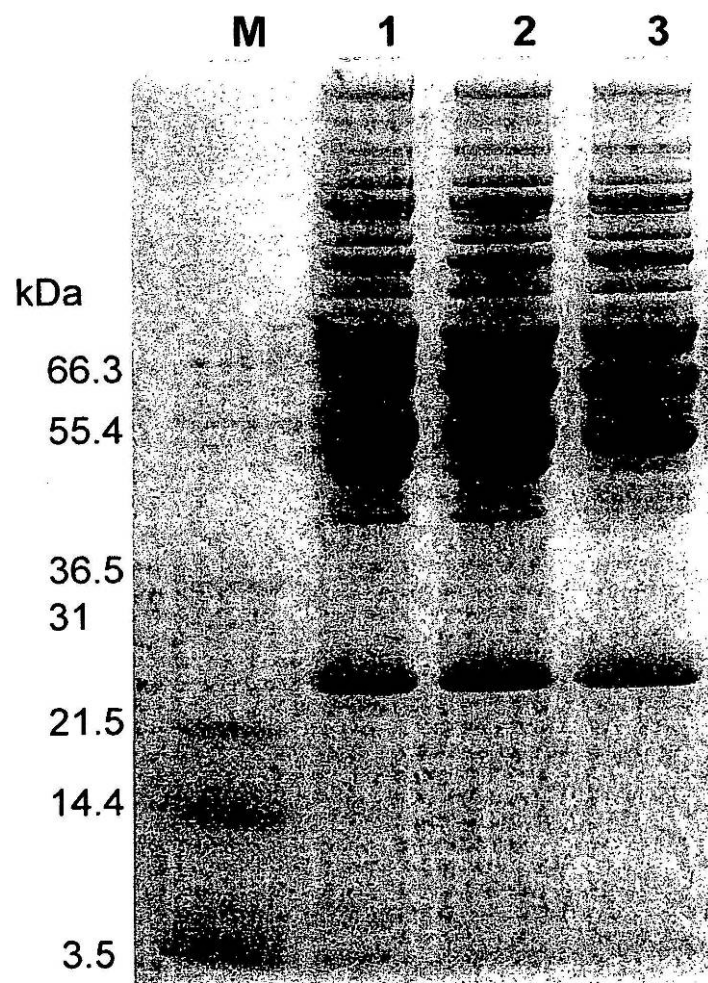


Figura 5

Figura 5 a) PDGF-AB

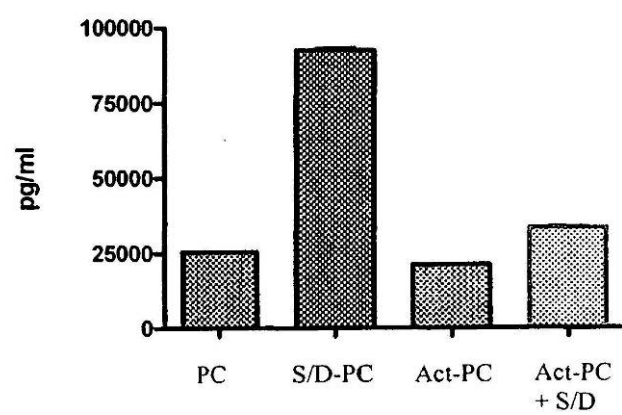


Figura 5 b) EGF

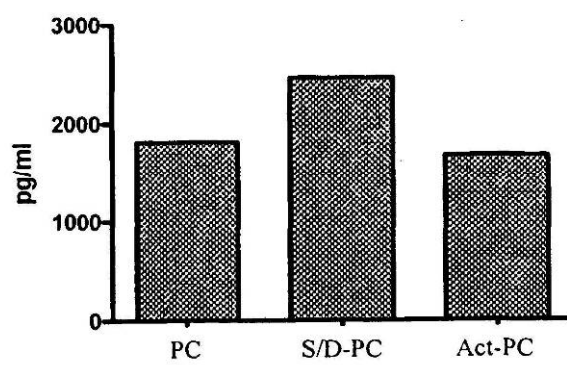


Figura 6

Figura 6 a) IGF-1

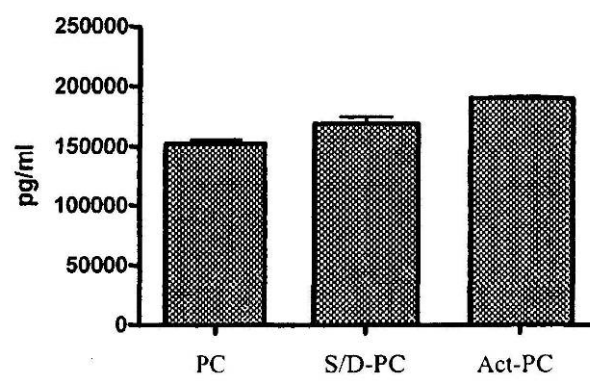


Figura 6 b) TGF- β 1

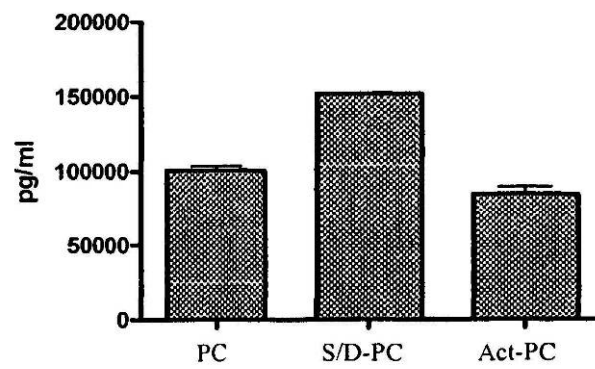


Figura 7

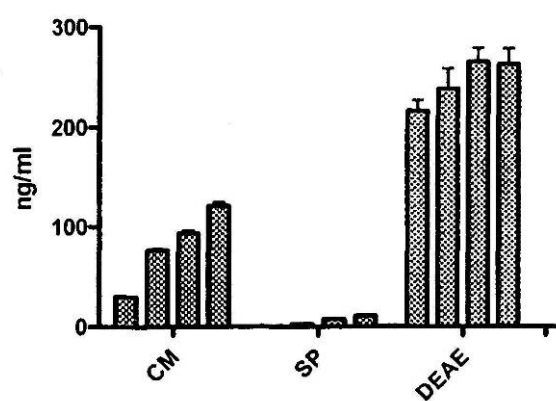


Figura 8

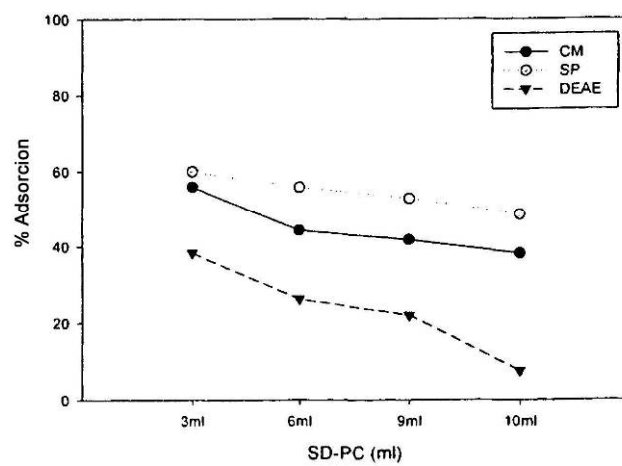


Figura 9

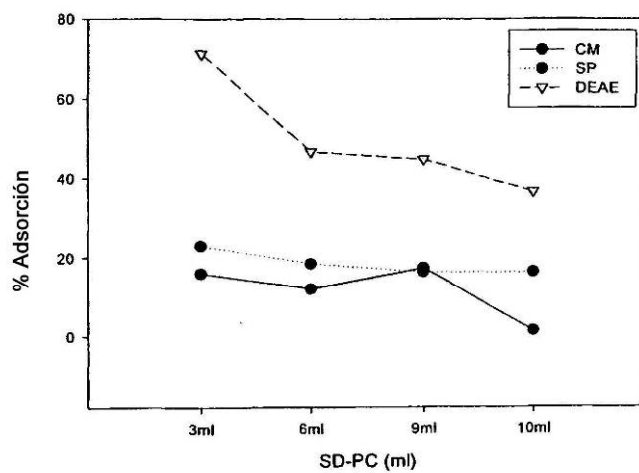


Figura 10

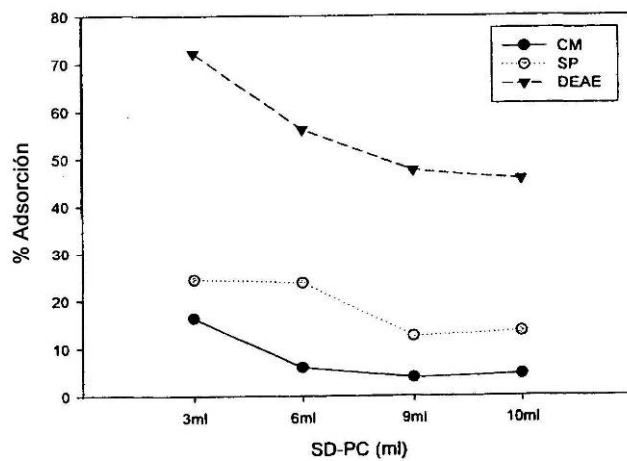


Figura 11

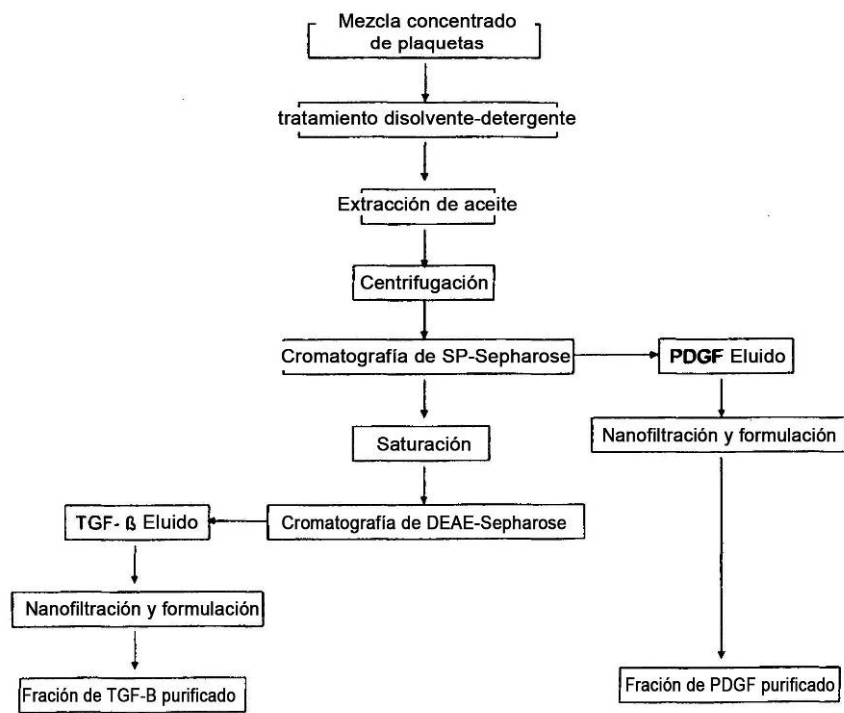


Figura 12

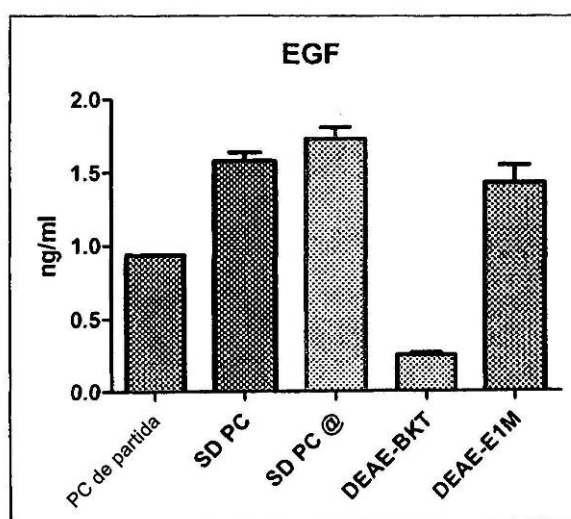


Figura 13

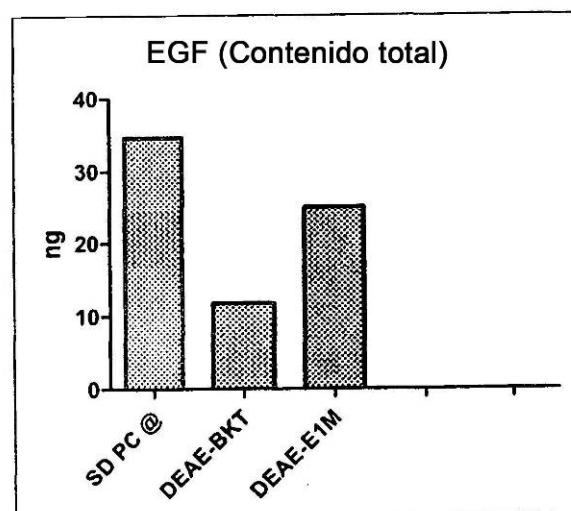


Figura 14

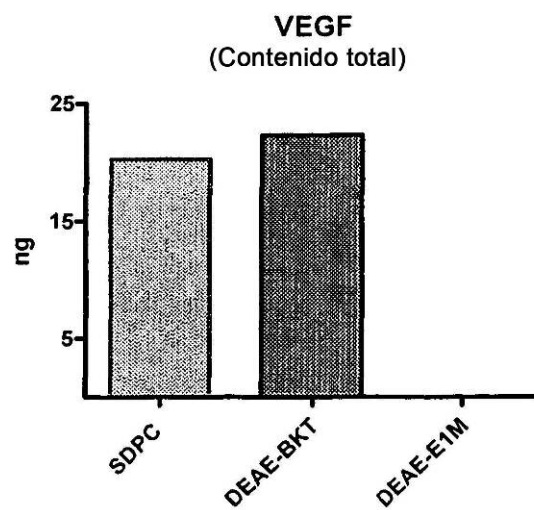


Figura 15

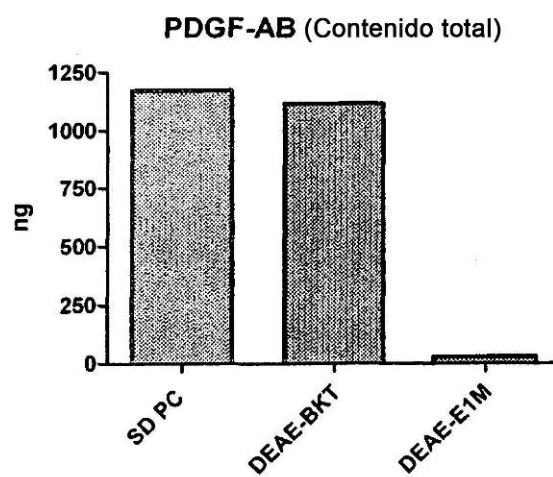


Figura 16

