

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 529 183**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/14 (2006.01)

A61K 35/16 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2005 E 05790886 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 1848447**

(54) Título: **Agente regenerador de tejido biológico y método para preparar y usar el mismo**

(30) Prioridad:

20.08.2004 US 923237

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

17.02.2015

(73) Titular/es:

**GORROCHATEGUI BARRUETA, ALBERTO
(100.0%)
GENERAL EGUIA, 1, 1
48010 BILBAO, VIZCAYA, ES**

(72) Inventor/es:

**GORROCHATEGUI BARRUETA, ALBERTO;
SIMON ELIZUNDIA, JOSU y
BARBERA-GUILLEM, EMILIO**

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 529 183 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agente regenerador de tejido biológico y método para preparar y usar el mismo

5 Campo técnico

La presente invención se refiere al campo del crecimiento y reparación de tejidos biológicos, particularmente a un agente regenerador que aumenta el crecimiento, reparación y trasplante de tejidos y células, y un método para preparar y usar el mismo.

10 Antecedentes de la invención

La lesión de tejido traumática o patológica produce pérdida de tejido biológico, seguido por intentos naturales en reparar y remodelar el tejido. Debido a fallos correspondientes en la reparación natural, la medicina humana y veterinaria intenta intervenir en el proceso de reparación y remodelado natural a través de un número de modalidades. Esto puede incluir la implantación de células diferenciadas en forma de trasplantes de órganos parciales o totales, sin embargo, esta modalidad está limitada por el suministro de tejidos compatibles, problemas de rechazo, y dificultades técnicas en el trasplante. Más recientemente, se ha llamado la atención sobre las posibilidades de implantar células madre multipotentes o pluripotentes para la regeneración de tejidos. Todas estas modalidades de introducción celular exógena están afectadas por lo que se puede llamar problema de interfase, en que están todas infestadas por problemas de angiogénesis lenta, inflamación, potencial infección, y cuestiones de rechazo inmunitario. Incluso la regeneración de tejido completamente natural es susceptible a algunos de estos problemas, lo que produce tiempo de curación extendido e incluso curación y regeneración tisular menos que óptima.

25 Un estimulante al proceso de regeneración de tejidos tanto natural como exógenamente asistida es el suministro de varios elementos que aceleran o asisten de otra manera en el proceso regenerativo. Al nivel más sencillo, un ejemplo es el suministro de matrices naturales y artificiales, tal como injertos de hueso; o el uso de agentes de unión de tejidos naturales y artificiales, tal como el uso del coágulo de fibrina o varios adhesivos tisulares artificiales. Tales materiales proporcionan una matriz física para que nuevas células crezcan sobre o soporta tejidos en proximidad durante el proceso de curación natural.

30 Alternativamente, se han propuesto varios estimulantes biológicos para el crecimiento celular. Estos incluyen factores angiogénicos tal como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) tanto de preparaciones naturales como de fuentes recombinantes; y factores de crecimiento tisular, tal como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), de nuevo tanto de preparaciones naturales como de fuentes recombinantes. También incluyen moduladores inmunitarios, que pueden incluir, entre otros; factor de crecimiento transformante recombinante (TGF- β); la aplicación de preparaciones de plasma o suero autólogas que incluyen moduladores inmunitarios naturales; o fármacos, tal como ciclosporina A. Crecientemente, se llama la atención sobre los denominados factores sinérgicos, un grupo mal entendido que incluye tales factores como antioxidantes, que se cree que ayudan en la regeneración e integración de nuevos tejidos.

35 Se sabe, o se cree, que todos estos compuestos existen en cantidades considerables en plaquetas. La contribución de varios factores derivados de plaquetas a la reparación de tejidos biológicos es bien conocida. Las plaquetas son los componentes corpusculares más pequeños de la sangre humana (diámetro 2-4 μm), y su número fisiológico varía desde 150.000 a 300.000/mm³ en sangre humana normal. Las plaquetas no son verdaderas células, sino que son esencialmente fragmentos celulares formados sin material nuclear. El origen de las plaquetas es el megacariocito, una célula hematopoyética normalmente residente en la médula ósea. Los megacariocitos son células gigantes generadas tanto por el crecimiento mitótico de una célula progenitora comprometida, y la endoreduplicación de material genético de la célula sin división celular. Esta última modalidad de crecimiento celular produce células con núcleos poliploides y un gran citoplasma, en las que las membranas internas, mediante un proceso de división en parcelas, genera las proplaquetas o territorios de plaquetas. El megacariocito maduro, con el citoplasma segmentado en territorios de plaquetas, emite plaquetas como el producto final de protrusiones de su citoplasma a través de las paredes capilares. Las plaquetas contienen una variedad de orgánulos internos, tal como mitocondrias que suministran energía, cuerpos de golgi, y partículas de glucógeno; y un sistema citoesquelético microtubular y microfibrilar; pero una de sus características más estudiadas es un sistema de gránulos α y cuerpos densos que constituyen los principales compartimentos de almacenamiento de las plaquetas.

40 Mientras que se han usado varias preparaciones de plasma que incluyen plaquetas enteras o fragmentadas para estimular la regeneración de tejidos, la presencia de sitios de histocompatibilidad en las membranas de las plaquetas y las cuestiones de histocompatibilidad resultantes han dirigido la atención a preparaciones de plaquetas purificadas, especialmente las de compuestos liberados de plaquetas intactas durante la activación de las plaquetas.

45 Una plaqueta en circulación posee aproximadamente 35 gránulos α y 5 cuerpos densos como principales compartimentos de almacenamiento. Los gránulos α contienen una serie de mediadores peptídicos; incluyendo las

quimioquinas factor de plaquetas 4 (PF-4), *b*-tromboglobulina (*b*-TG), quimioquinas reguladas tras la activación de células T normales expresadas y secretadas (RANTES), y proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (MIP-1 α).

PF-4 y *b*-TG son mediadores de primera línea en el reclutamiento y activación de leucocitos. PF-4 muestra quimiotaxis para neutrófilos, monocitos, y fibroblastos. Induce la liberación de histamina de basófilos y estimula la adherencia de eosinófilos. Además, PF-4 previene la apoptosis de monocitos e inicia su diferenciación a macrófagos. Los neutrófilos son inducidos por PF-4 para adherirse al endotelio sin estimular y para liberar el contenido de sus gránulos secundarios. Las proteínas *b*-TG, que son productos proteolíticos de precursores inactivos, pueden actuar como agentes estimuladores o inhibidores en la activación de neutrófilos, dependiendo de su procesamiento.

La quimioquina RANTES induce la liberación de histamina de basófilos y la secreción de proteínas catiónicas de eosinófilos. Además, RANTES contribuye al reclutamiento inflamatorio o aterogénico de monocitos desde la circulación ya que se deposita en endotelio microvascular y arterial activado y desencadena parada de monocitos resistente a cizalla. MP-1 α también tiene actividad liberadora de histamina sobre basófilos y muestra quimiotaxis para linfocitos T CD81.

A su vez, las quimioquinas, tal como RANTES y MP-1 α , estimulan a las plaquetas para dar señales Ca2+, para agregarse, y para liberar sus contenidos granulares. Tanto receptores funcionales, es decir, CCR1, CCR3 y CCR4; como de quimioquinas CXC (CXCR4) son detectables en plaquetas humanas.

La demostración de varios factores de crecimiento en los gránulos α ha sido particularmente importante. Las plaquetas almacenan grandes cantidades de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que se libera tras la estimulación por trombina y agregación. VEGF fomenta la extravasación de proteínas de plasma, dirigiendo de esta manera la migración de leucocitos y células endoteliales y produciendo edema. VEGF también apoya la acumulación de líquido en heridas e inicia la angiogénesis en la fase de cicatrización. PDGF es quimiotáctico para neutrófilos y monocitos, y controla el reclutamiento y proliferación de fibroblastos y células de músculo liso. TGF- β influye la cicatrización de una manera bidireccional desde los primeros pasos en la inflamación hasta el depósito final y remodelación de la matriz extracelular (MEC).

TGF- β provoca la rápida quimiotaxis y activación de neutrófilos y monocitos, pero, después en el proceso, suprime la respuesta inflamatoria. Los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) señalizan quimiotaxis y mitogénesis. Reclutan células endoteliales y dirigen su proliferación, desempeñando de esta manera un papel central en la angiogénesis junto con la angiopoyetina, que también se libera de plaquetas estimuladas y estabiliza la proliferación de células endoteliales. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) contribuye al reclutamiento y crecimiento de fibroblastos y células epiteliales en la formación de tejido de granulación.

Las plaquetas desempeñan un papel regulador central en todas las fases de la inflamación y posterior cicatrización mediante la liberación, tras la estimulación, de todos estos factores de sus gránulos α . En contraste con los agentes α granulares, los mediadores liberados de los cuerpos densos ejercen efectos que están más restringidos a la fase inicial de la inflamación. La adenosina difosfato (ADP) aumenta el estallido oxidativo inducido por agonista en neutrófilos. La serotonina aumenta la permeabilidad vascular. La histamina también está implicada en la regulación de la permeabilidad endotelial, y aumenta la producción de superóxidos por los macrófagos. La importancia de la serotonina derivada de cuerpos densos está subrayada por su papel clave en las reacciones de hipersensibilidad de la piel.

Además de su capacidad para liberar mediadores prealmacenados, las plaquetas estimuladas son capaces de generar eicosanoïdes para la regulación de hemostasia e inflamación aguda. Los productos en plaquetas del metabolismo del ácido araquidónico dependiente de cicloxygenasa son tromboxano A2 (TXA2), prostaglandina F2 α (PGF2 α), y PGE2. TXA2 y PGF2 α causan vasoconstricción. PGE2 es un vasodilatador y modulador del dolor. El ácido 12-hidroxieicosatetraenoico (12-HETE), sintetizado por una enzima específica de plaquetas, es quimiotáctico hacia eosinófilos. Estudios recientes indican que las plaquetas pueden sintetizar mediadores peptídicos, tal como IL-1 b , tras la estimulación. La síntesis de proteínas en plaquetas está controlada a través de la translocación mediada por integrina b3 del factor de iniciación eucariota 4E al citoesqueleto. Por tanto, las plaquetas son capaces de responder a la estimulación no solo por síntesis de eicosanoïdes, óxido nítrico y especies de oxígeno reactivo, sino también por síntesis de novo regulada de mediadores peptídicos.

Knighton *et al.*, describieron angiogénesis y factores de crecimiento derivados de plaquetas en "Role of Platelets and Fibrin in the Healing Sequence", Annals of Surgery; 196:379-388 (1982). De interés particular ha sido el papel del PDGF, que se sabe que está compuesto de dos polipéptidos, PDGF-I y PDGF-II, como describen Grotendorst *et al.*, en "Platelet Derived Growth Factor is a Chemoattractant for Vascular Smooth Muscle Cells", Journal of Cellular Physiology; 113:261-66 (1982). En la patente en EE UU No. 4.479.896 ('896) a Antoniades, se describe un método de aislar PDGF de plaquetas lisadas en solución acuosa. Se usa electroforesis en gel para aislar PDGF-I y PDGF-II purificados, que se recuperan por elución. Se describió una recuperación final del 3,7% del PDGF-I y del 2,0% del PDGF-II.

También se sabe bien que la trombina produce la reacción de liberación de plaquetas en suspensiones de plaquetas lavadas. Tollesen *et al.*, "Induction of the Platelet Release Reaction by Phytohemagglutinin", *J. Clin. Invest.*; 53:211-218 (1974). La trombina es un potente agonista que provoca respuestas fisiológicas de plaquetas tal como cambio de forma, secreción del contenido granular, y agregación. La trombina es una serina proteasa multifuncional que actúa como agonista primario para la reacción de liberación de plaquetas. Goldsack, *et al.*, "Molecules in Focus - Thrombin", *Int. J. Bioch. and Cell Biol.*; 30:641-46 (1998). Se piensa que el efecto de la trombina sobre plaquetas humanas está principalmente mediado a través de dos receptores activados por proteasas: PAR1 y PAR4. Ofosu, F, "Protease Activated Receptors 1 and 4 Govern the Responses of Human Platelets to Thrombin", *Transfusion and Apherisis Science* 28:265 (2003).

El corte de PAR1 se produce en Arg41-Ser42 localizado en el exodominio largo del receptor. SFLLRN es un nuevo extremo amino y funciona como un ligando peptídico anclado que se une a otro sitio en el receptor de trombina e induce una cascada de señalización intracelular. Santos, B. *et al.*, "Interaction of Viper Venom Serine Peptidases with Thrombin Receptors on Human Platelets," *Fed. of Eur. Bioch. Soc. Letters* 477:199 (2000). Las respuestas de plaquetas a trombina incluyen citocinesis, agregación, y secreción, así como cambios metabólicos asociados.

Aunque anucleares, las plaquetas son cuerpos muy reactivos que contienen toda la maquinaria exocítica implicada en la secreción celular. La reacción de liberación de plaquetas se parece a otros sucesos de secreción regulados. A diferencia de la lisis de plaquetas, que implica una rotura completa de la membrana de las plaquetas y una liberación de todos los compuestos intraplaquetarios, la liberación de plaquetas es una secreción coordinada y estrechamente regulada que consiste en: 1) movimiento de los gránulos hacia la membrana plasmática debido a proteínas de unión a GTP unidas a gránulos y microtúbulos, 2) acoplamiento, y 3) fusión con la membrana con la consecuente descarga de los constituyentes de los gránulos. Rendu, F. *et al.*, "The Platelet Release Reaction: Granules' Constituents, Secretion and Functions", *Platelets* 12:261-73 (2001). La trombina desempeña un papel vital en la coagulación de la sangre fomentando la agregación plaquetaria y convirtiendo el fibrinógeno para formar el coágulo de fibrina en el paso final de la cascada de coagulación.

Knighton, como se ha indicado anteriormente, enseña un método de usar trombina, adenosina difosfato, o colágeno para desencadenar la reacción de liberación de plaquetas y posterior desgranulación de plaquetas para producir una composición para tratar tejido dañado en la patente en EE UU No. 5.165.938 ('938). En el proceso de Knighton, la sangre se anticoagula con una solución de citrato-fosfato-dextrosa al 20% para unir competitivamente el calcio extracelular y de esta manera prevenir la coagulación. La sangre se centrifuga para dar un plasma rico en plaquetas de preferiblemente al menos 1.000.000 de plaquetas por ml. El plasma sin plaquetas se elimina y descarta y el precipitado de plaquetas, resultante de la centrifugación, se resuspende en un tampón de plaquetas que contiene HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperacín-n-2-etanosulfónico), glucosa, KCl, NaCl y seroalbúmina humana aproximadamente al 0,35%, en un medio muy ácido (pH aproximadamente 6,5).

Las plaquetas resuspendidas se activan con trombina purificada derivada de trombina bovina o de cerdo, y se deja incubar durante aproximadamente 5-10 minutos. La actividad de la trombina coagula el fibrinógeno y activa las plaquetas produciendo que liberen los gránulos a que contienen factor de crecimiento de plaquetas y factor de angiogénesis derivado de plaquetas. La trombina derivada de sangre bovina, tal como la usada en el proceso de Knighton, se usa comúnmente para efectuar hemostasia en cirugías en los Estados Unidos y en el mundo. Desafortunadamente, artículos recientes sugieren que el uso de la trombina bovina puede presentar riesgos previamente no apreciados, tal como el desarrollo de anticuerpos autorreactivos, al menos algunos de los cuales son patogénicos. Por ejemplo, un estudio reciente que utiliza ratones deficientes en galactosa- α 1-3-galactosa no propensos a autoinmunidad tratados con dos preparaciones bovinas actualmente disponibles en los EE UU, encontró que esos ratones desarrollaban una respuesta autoinmune contra la trombina exógena, y algunos desarrollaron autoanticuerpos contra factores de coagulación. Además, una única exposición indujo autoinmunidad con rasgos característicos de lupus eritematoso sistémico. Schoenecker, J. *et al.*, "Exposure of Mice to Topical Bovine Thrombin Induces Systemic Autoimmunity", *Am. J. Pathol.*; 159:1957-1969 (2001). Según esto, evitar la trombina animal en medicina humana, cuando sea posible, puede ser prudente.

Además, la presente invención proporciona un aumento tanto en la cantidad como en los tipos de proteínas liberadas de las plaquetas. La función de la plaqueta es hemostasia primaria - la formación de un tapón de plaquetas. Esto se inicia por adhesión de las plaquetas a un área de lesión. Las plaquetas se adhieren al sitio de la lesión, en respuesta al contacto con colágeno y factor de von Willebrand en el tejido subyacente, se activan, y liberan los contenidos de los gránulos alfa. Estas plaquetas activadas se agregan, y se atraen entre sí, pegándose para formar una masa blanda. Después de la adhesión, se produce la metamorfosis viscosa y las membranas celulares se disuelven, según se forma un tapón como de gelatina frágil. Se sabe bien que los productos de la lisis de plaquetas se diferencian de los de la reacción de liberación de plaquetas, debido a la liberación adicional de componentes citosólicos en la lisis. Marcus, K. *et al.*, "Identification of Platelet Proteins Separated by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Analyzed by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry and Detection of Tyrosine-Phosphorylated Proteins", *Electrophoresis* 21(13):2622-36 (2000).

Cuando las células experimentan la reacción de liberación de plaquetas, se descargan compuestos directamente de gránulos específicos, tal como los gránulos densos, gránulos α , y lisosomas, en las células; pero la membrana de las

- plaquetas permanece intacta y los gránulos mismos no se descargan. Kinlough-Rathbone, R. et al., "Conditions Influencing Platelet Lysis", Lab. Invest. 32:3 352-358 (1975). Kinlough et al., mostraron dos puntos principales con respecto a la lisis de plaquetas: 1) el tratamiento con trombina solo no produjo lisis en plaquetas humanas, medida por LDH (lactato deshidrogenasa), un marcador para una enzima citoplásmica que solo se libera tras la lisis; y 2) el calcio en el medio de resuspensión de plaquetas es necesario para la autolisis de las plaquetas en conejo. Por tanto se esperaría, y la presente invención muestra, que la lisis de plaquetas mediada por calcio produzca una serie y concentración diferentes de compuestos fisiológicos que la reacción de liberación de plaquetas mediada por trombina. Igualmente importante, evitar una reacción de liberación de plaquetas, y suministrar alfa-2 macroglobulina en el suero de la presente invención, suprime la activación de TGF-β, comparado con la serie de compuestos producidos por la reacción de liberación de plaquetas descrita anteriormente. La composición que comprende un extracto de suero de plaquetas divulgada en el documento WO 95/15763 tiene TGF-β en una forma activa y los documentos US 2004/151709 y US 2003/007957 divultan una composición que comprende un extracto de plaquetas en ausencia de suero que contiene alfa-2 macroglobulina. De forma interesante, cuando las plaquetas participan en la formación de tapones y trombos hemostáticos *in vivo*, la evidencia de microscopía electrónica indica que algunas de las plaquetas no solo liberan los contenidos de sus gránulos sino que también experimentan lisis. *Id.* Este descubrimiento sugiere que la lisis de las plaquetas es un aspecto importante en la formación del coágulo *in vivo*.
- Es posible capturar el complemento entero de plaquetas de factores regeneradores, y evitar la activación de TGF-β, cuando experimentan lisis. Estos factores incluyen enzimas citoplásmicas y otros constituyente citoplásmicos. *Id.* Los componentes que se han identificado como que están contenidos en el citosol de plaquetas incluyen: metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2), fosfolipasa A2, fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol, calmodulina, pp60-src (activa el factor activador de plaquetas (PAF)), fosfodiesterasa de nucleótidos cílicos, fosfodiesterasa de nucleótidos cílicos estimulada por GMP, c21KG, la mayoría de las enzimas de la glucolisis, enzimas de la desviación de la hexosa monofosfato, fosfoglucosa isomerasa, glutatión reductasa, aproximadamente la mitad del total de la adenosina trifosfato y adenosina difosfato de plaquetas, la mayoría de los intermedios glucolíticos (es decir, fructosa 1,6-difosfato), glucógeno, fenol sulfotransferasa, sulfotransferasa, inositol fosfato 4-fosfatasa, fosfatidilinositol 3-quinasa, fosfoinositido 3-quinasas que responden a Gbetagamma, fosfoinositido 3-quinasa dependiente de Rho, fosfoinositido 3-quinasa que responde a la subunidad beta gamma de proteínas G, proteína de unión a GTP (proteína G), y ácido araquidónico (AA) libre. Se ha descrito la lisis de plaquetas con un número de técnicas *in vivo*, incluyendo sonicación, exponerlas a ciclos repetidos de congelación-descongelación, y mediante el uso de detergente. Kamath, S. et al., "Platelet P-Selectin Levels in Relation to Plasma Soluble P-Selectin and β-Thromboglobulin Levels in Atrial Fibrillation", Stroke 33:1237-1242 (2002). Las plaquetas también se pueden lisar aumentando, *in vitro*, el calcio extracelular para inducir la metamorfosis viscosa seguida por lisis. La lisis inducida por calcio se puede distinguir fácilmente de la reacción de liberación de plaquetas observada por microscopía óptica. Las plaquetas en reposo son discos biconvexos con un diámetro grande de aproximadamente 3 μm. En respuesta a un estímulo de activación tal como trombina, las plaquetas pierden su forma discoidal y desarrollan pseudópodos largos en unos pocos segundos. Este cambio de forma está acompañado por la secreción de una abundancia de sustancias adhesivas y proinflamatorias - la denominada reacción de liberación. Klinger, M, "Platelets and Inflammation", Anat. Embryol. 196:1-11 (1997). En contraste, cuando se coloca plasma rico en plaquetas en una solución con calcio alto, se inicia un proceso conocido como metamorfosis viscosa en las plaquetas. Durante este proceso los polímeros de tubulina se reducen a monómeros, las redes de actina y miosina se desorganizan y la célula cambia de discoide a una forma de esfera hinchada. Finalmente el proceso termina en lisis y los constituyentes granulares y citoplásmicos se liberan en el medio circundante. La presente invención buscar tomar ventaja de la abundancia de compuestos que no se liberan, o se liberan incompletamente, a través de la reacción de liberación de plaquetas como se ve en procesos tal como el método '938.
- Además de los efectos sobre la curación y crecimiento de tejidos efectuada por los compuestos relacionados con plaquetas, se sabe que el plasma contiene componentes que también son importantes para la cicatrización. El plasma, un líquido amarillo, está compuesto principalmente de agua ligeramente salada. Sus propiedades fisiológicas son notablemente constantes especialmente su pH, que se mantiene fisiológicamente a pH 7,42, y la concentración de varios elementos inorgánicos. Además de ser un medio para el flujo de las células sanguíneas, el plasma es el líquido de color paja en el que están suspendidas las células sanguíneas y tiene una composición aproximada de: agua~92%, proteínas 6-8%, sales 0,8%, lípidos 0,6%, y glucosa 0,1%. El plasma transporta materiales necesitados por las células y materiales que se deben eliminar de las células. Estos incluyen: a) varios iones, tales como, Na^+ , Ca^{2+} , y HCO_3^- ; b) glucosa y vestigios de otros azúcares; c) aminoácidos; d) otros ácidos orgánicos; e) colesterol y otros lípidos; f) hormonas y factores de crecimiento; g) urea y otros residuos, y numerosos otros compuestos.
- La mayoría de estos materiales están en tránsito de un lugar donde se añaden a la sangre (una "fuente"); a lugares ("sumideros") donde se eliminarán de la sangre, incluyendo órganos de intercambio tales como el intestino o el riñón, y depósitos de materiales tal como el hígado. Las proteínas del plasma representan el 6-8% del plasma. Investigadores han identificado más de 4.000 proteínas distintivas en el plasma de sangre humana.
- Después de extraer sangre de una vena y dejarla coagular, el coágulo se encoge lentamente. Según lo hace, se extrae un líquido transparente llamado suero. Por tanto, el suero es plasma sanguíneo sin fibrinógeno y otros

factores de coagulación; con proteínas, diferentes de fibrinógeno, que permanecen en el suero. Están aproximadamente divididas igualmente entre seroalbúmina y una gran variedad de seroglobulinas.

Las proteínas del suero se pueden separar generalmente en seroalbúmina y seroglobulinas. La seroalbúmina, que se produce en el hígado, se une a muchas moléculas pequeñas para el transporte a través de la sangre y ayuda a mantener la presión osmótica de la sangre. Las seroglobulinas se subdividen en alfa-globulinas; beta-globulinas; y gamma-globulinas en base a sus movilidades electroforéticas. Las alfa globulinas incluyen, por ejemplo, las proteínas que transportan tiroxina y retinol (vitamina A). Se sabe que la alfa-2 macroglobulina, como se discutirá posteriormente, se une, y por tanto se mantiene en forma inactiva, a TGF- β .

Las beta globulinas incluyen la proteína transportadora de hierro transferrina. Las gamma globulinas contienen la mayoría de los anticuerpos. Las seroglobulinas también incluyen el sistema del complemento, que contiene los componentes principales de las actividades del sistema inmunitario, así como otras proteínas funcionales y péptidos activos. El suero también contiene lípidos séricos, incluyendo tales componentes básicos como colesterol (total), colesterol de LDL, colesterol de HDL, y triglicéridos.

Los factores de coagulación contenidos en el plasma son críticos para la curación eficaz y son componentes esenciales de la ruta de coagulación extrínseca. Estos factores funcionan en armonía con factores en las plaquetas para formar eficazmente el tapón hemostático y fomentar la regeneración. Además de las proteínas de plasma y suero, se está dirigiendo atención creciente sobre otros componentes del plasma que desempeñan papeles cruciales en la coagulación, tal como iones Mg²⁺. Sekiya, F. et al., "Magnesium(II) is a Crucial Constituent of the Blood Coagulation Cascade", J. Biol. Chem. 271(15):8541-8544 (1996).

La ruta de coagulación sanguínea extrínseca se inicia en el sitio de la lesión en respuesta a la liberación de factor tisular (factor III). El factor tisular es un cofactor en la activación catalizada por el factor VIIa del factor X. El factor VIIa, una serina proteasa que contiene un residuo de *gla*, corta el factor X al factor Xa de una manera idéntica a la del factor IXa de la ruta intrínseca. La activación del factor VII se produce mediante la acción de trombina o factor Xa. La capacidad del factor Xa de activar el factor VII crea un enlace entre las rutas intrínseca y extrínseca. Existe un enlace adicional entre las dos rutas mediante la capacidad del factor tisular y el factor VIIa de activar el factor IX. Se cree que la formación de un complejo entre el factor VIIa y el factor tisular es un paso principal en la cascada de coagulación global.

A la luz de estos y otros informes, sería ventajoso tener un sistema, y la presente invención proporciona uno, para activar plaquetas, son la necesidad de agonistas exógenos como trombina bovina, y que también proporcione la gama completa de compuestos útiles derivados de la lisis de plaquetas, pero ausentes ciertos compuestos derivados de una reacción de liberación de plaquetas, así como conservar, en tal sistema, los factores regeneradores encontrados en el plasma.

Compendio de la invención

En su configuración más general, la presente invención avanza el estado de la técnica con una variedad de nuevas capacidades y supera muchas de las deficiencias de dispositivos anteriores en formas nuevas y novedosas. En su sentido más general, la presente invención supera las deficiencias y limitaciones del estado de la técnica en cualquiera de un número de configuraciones generalmente eficaces.

En una configuración, la presente invención se refiere a un método para la producción de una pequeña cantidad de agente regenerador adecuada para un único uso. En un ejemplar de esta divulgación, se recoge una muestra de sangre de 10 ml de un individuo, se deja coagular, y el suero se separa por métodos bien conocidos en la técnica. Este suero se reserva para su uso posterior en la preparación del agente regenerador. Se coloca una segunda muestra de sangre de 4,5 ml en un tubo que contiene citrato de calcio tamponado. La muestra que contiene el citrato de calcio se centrifuga a 3.000 g durante 30 minutos. Los dos tercios superiores del sobrenadante, que contiene el plasma y las plaquetas, o plasma rico en plaquetas (PRP), se retiran y el precipitado que contiene glóbulos rojos y leucocitos se descarta. El PRP se combina después con cloruro de calcio (CaCl₂) y una parte del suero reservado de la primera muestra de sangre. El cloruro de calcio induce lisis de plaquetas masiva, liberando los compuestos granulares y otros internamente secuestrados y los componentes citosólicos de las plaquetas, y produce la formación de una masa coagulada de fragmentos de plaquetas, preferiblemente después de incubación a 37°C durante 10 minutos. En el presente documento se divulga que para la producción a gran escala adecuada para el almacenamiento y uso durante un periodo de tiempo prolongado, se obtienen unidades de plaquetas de aproximadamente 60 ml de concentrado de plaquetas por métodos de procesamiento de sangre estándar, como sabría el experto en la materia. Se añade cloruro de calcio a cada unidad. El concentrado de plaquetas con el cloruro de calcio añadido se mezcla suavemente y se incuba, preferiblemente a 37°C durante 24 horas. Tanto en los métodos a pequeña escala como a gran escala, detallados anteriormente, después de la incubación, una masa blanca sólida retirada se deja suspendida libre en una fase líquida en el recipiente. La masa se elimina después y la fase líquida se transfiere a un nuevo recipiente. Para eliminar los fragmentos de membranas de plaquetas que permanecen, en una forma de realización, la fase líquida se filtra a través de una membrana de poro de 0,4 µm. También se divulga en el presente documento que la fase líquida se centrifuga a 3.000 g durante 1 hora.

El producto final se puede después congelar o liofilizar para su uso futuro. El agente final se puede mezclar con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable y se puede usar en forma de una crema, aerosol o en cualquier otra forma como sería obvio para el experto en la materia.

5 La investigación ha mostrado que el proceso y compuesto de la presente invención, que se basa en la lisis de plaquetas en un medio de suero, da un perfil de composición muy diferente que la activación de plaquetas en un medio acuoso, como ilustra la técnica de Knighton ('938). La electroforesis en geles bidimensionales del agente preparado según la presente invención muestra un perfil de proteínas marcadamente diferente comparado con los productos de la activación de plaquetas con trombina en un medio acuoso. Las diferencias en la expresión de proteínas sobre el estado de la técnica también se indican por los resultados de análisis de matrices de genes.

10 Además, la presente invención es una mejora marcada sobre el estado de la técnica en su minimización de cuestiones inmunológicas. Las barreras principales al uso de productos que contienen plaquetas o derivados de plaquetas han sido cuestiones inmunológicas. Se sabe bien que las plaquetas tienen antígenos HLA en su superficie. Las preparaciones de plaquetas, incluso las contienen plaquetas fragmentadas, portan estos antígenos en los donantes. Esto puede ser particularmente problemático con la exposición repetida a plaquetas aleatorias, lo que produce crisis de compatibilidad graves tras posteriores tratamientos.

15 Otro avance principal de la presente invención es que la lisis de plaquetas, seguida por centrifugación y ultrafiltración, elimina esencialmente todas las membranas de plaquetas, incluyendo fragmentos pequeños, y deja detrás proteínas de plaquetas no inmunógenas. La evaluación experimental de la presente invención comparada con las preparaciones del método del estado de la técnica ('938) mostró que esta eliminación de fragmentos potencialmente inmunógenos se lograba con alta eficacia. En pruebas cutáneas con voluntarios humanos cribados para inmunocompetencia, el agente de la presente invención no mostró actividad inmunógena, comparado con niveles de reacción de entre el 6% y el 10% para compuestos preparados según el estado de la técnica.

20 En un modelo de ratón, el agente según la presente invención mostró mejoras en elasticidad y resistencia de la piel, después de lesión; y proliferación celular, cuando se comparó con compuestos preparados según el estado de la técnica.

25 30 Es crítico diferenciar la pluralidad de productos normalmente encontrados secuestrados en estructuras de plaquetas en la presente invención de los productos que se liberan en las reacciones de liberación de plaquetas, tipificados por el proceso de Knighton detallado anteriormente. Esta diferenciación se centra alrededor de la supresión de TGF- β activo en la presente invención, comparada con la gran cantidad de TGF- β activo producido en el proceso de Knighton. La supresión de TGF- β activo en un auxiliar de cicatrización tal como el de la presente invención tenderá a fomentar un proceso de curación con menos cicatrices que uno que contiene TGF- β .

35 40 Cuando se coagulan plaquetas con trombina en la reacción de liberación de plaquetas, como el proceso de Knighton, el proceso de coagulación produce la activación del pro-TGF- β . Esto es particularmente pronunciado cuando la reacción de coagulación de plaquetas se produce en el medio extremadamente ácido (pH = 6,5) propuesto por Knighton. Como resultado, los materiales liberados por las plaquetas en la reacción de liberación de plaquetas por Knighton incluyen la totalidad de esos compuestos liberados por las plaquetas en la reacción de liberación de plaquetas, sin ningún procesamiento u otro tratamiento que afectaría a la bioactividad de la multitud de factores contenidos en las mismas, es decir, con altos niveles de TGF- β activo.

45 50 55 Al contrario, se tiene cuidado en la presente invención específicamente para evitar la reacción de liberación de plaquetas y para excluir un cierto componente de la reacción de liberación de plaquetas como describe Knighton, es decir, para suprimir la activación de TGF- β . Esto se logra en un número de modos novedosos, como se detallará posteriormente, incluyendo la lisis de plaquetas con calcio y la adición a la composición de suero que contiene alfa-2 macroglobulina. En formas de realización alternativas, la composición se puede tratar además añadiendo compuestos que bloquean los efectos fisiológicos del TGF- β ; que puede, a modo de ejemplo solo, ser decorina; o se puede tratar extrayendo activamente el TGF- β de la composición, a modo de ejemplo y no de limitación, por medio de pasar la composición a través de una columna de afinidad apropiada.

60 65 70 Por tanto, en suma, la composición de la presente invención específicamente se produce y trata para comprender los compuestos contenidos en los gránulos α , cuerpos densos, y citosol de plaquetas; pero para ser deficiente en al menos uno de los materiales liberados por las plaquetas durante la reacción de liberación de plaquetas: TGF- β activo.

75 La composición de la presente invención, que normalmente se mantiene a un pH aproximadamente fisiológico, puede tener el TGF- β inactivo activado, por ejemplo, exponiéndolo a un proceso a acidificación. Esto crearía una composición con efectos que recuerdan más a los de composiciones que contienen materiales liberados por plaquetas durante la reacción de liberación que plaquetas, pero con los beneficios adicionales de proporcionar compuestos contenidos en los gránulos α , cuerpos densos, y citosol de plaquetas.

En suma, la presente invención produce un agente terapéutico que, comparado con un compuesto formado por un proceso que implica sencillamente la activación y reacción de liberación de plaquetas, da una diferencia en la cantidad y estructura de productos regeneradores, incluyendo la supresión de TGF- β activo. La presente invención también proporciona una cantidad muy aumentada de proteínas comparadas con las de la reacción de liberación de plaquetas, y evita la trombina no homóloga en el producto final.

5

Breve descripción de las figuras

Sin limitar el ámbito de la presente invención como se reivindica posteriormente y refiriéndose ahora a los dibujos y
10 figuras:

La figura 1 muestra una electroforesis en gel bidimensional de un producto de reacción de liberación de plaquetas según el estado de la técnica;

15 La figura 2 muestra una electroforesis en gel bidimensional de una preparación de la presente invención.

La figura 3 muestra un análisis de micromatriz de genes de genes/rutas aumentados y disminuidos en células de piel que compara la presente invención con el estado de la técnica;

20 La figura 4 muestra un análisis de micromatriz de genes de genes/rutas aumentados y disminuidos en células endoteliales que compara la presente invención con el estado de la técnica;

25 La figura 5 muestra un análisis de micromatriz de genes de genes/rutas aumentados y disminuidos en fibroblastos que compara la presente invención con el estado de la técnica;

25 La figura 6 muestra un análisis de micromatriz de genes de genes/rutas aumentados y disminuidos en macrófagos que compara la presente invención con el estado de la técnica;

30 La figura 7 muestra un estudio de elasticidad de la piel, después de traumatismo quirúrgico, en ratón, que compara el agente de la presente invención con un producto control;

La figura 8 muestra un estudio de resistencia de la piel, después de traumatismo quirúrgico, en ratón, que compara el agente de la presente invención con un producto control; y

35 La figura 9 muestra una comparación de fotomicrografías de crecimiento de células de piel de ratón en preparaciones aisladas, que compara el crecimiento visto con medio esencial mínimo suplementado con suero al 10% (A) en contraste con el crecimiento visto con medio esencial mínimo suplementado con una concentración del 10% del agente de la presente invención (B).

40 La figura 10 muestra una representación esquemática de la reacción de liberación de plaquetas y la activación de TGF- β en el estado de la técnica, en contraste con el mantenimiento de TGF- β inactivo en la presente invención.

45 La figura 11 muestra una representación esquemática del mantenimiento de TGF- β inactivo en la presente invención, tanto por el mecanismo de lisis de plaquetas como la inactivación de TGF- β por unión con alfa-2 macroglobulina.

La figura 12 muestra una representación esquemática de una forma de realización alternativa de la presente divulgación en la que el TGF- β se puede activar, por ejemplo solo, exponiéndolo a un proceso de acidificación.

50 **Descripción detallada de la invención**

El método y los materiales de la reparación de tejidos biológicos de la presente invención permiten un avance significativo en el estado de la técnica. Las formas de realización preferidas del método y los materiales logran esto mediante organizaciones nuevas y novedosas de elementos y métodos que se configuran de formas únicas y novedosas y que demuestran capacidades previamente no disponibles pero preferidas y deseables.

60 La descripción detallada explicada a continuación en relación con las figuras se pretende meramente como una descripción de las formas de realización actualmente preferidas de la invención, y no se pretende que represente la única forma en la que la presente invención se puede construir o utilizar. La descripción explica los diseños, funciones, medios, y métodos de implementar la invención en relación con las formas de realización ilustradas. Se debe entender, sin embargo, que las mismas o equivalentes funciones y características se pueden lograr mediante diferentes formas de realización que también se pretende que estén abarcadas en el espíritu y ámbito de la invención.

65 Se divulga que para la producción de una pequeña cantidad de agente regenerador adecuado para un único uso, se recoge una muestra de sangre de 10 ml de un individuo, se deja coagular y se separa el suero por métodos bien

- conocidos en la técnica. Este suero se reserva para uso posterior en la preparación del agente regenerador. Una segunda muestra de sangre de 4,5 ml se coloca en un tubo que contiene citrato de calcio tamponado 0,129 M (3,8%). Las muestras se pueden obtener simultáneamente, a modo de ejemplo y no limitación, por medio de extracciones secuenciales de sangre a través de una única aguja, como se ve con el sistema de extracción de sangre VACUTAINER® (Becton-Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ). La muestra que contiene citrato de calcio se centrifuga a 3.000 g durante 30 minutos. Los dos tercios superiores del sobrenadante, que contiene el plasma y las plaquetas, o plasma rico en plaquetas (PRP), se retiran y el precipitado que contiene glóbulos rojos y leucocitos se desecha. El PRP se combina después con 100 µl de cloruro de calcio (CaCl_2) al 10% y 100 µl del suero reservado de la primera muestra de sangre. El cloruro de calcio induce lisis de plaquetas masiva, liberando los compuestos granulares y otros internamente secuestrados y los componentes citosólicos de las plaquetas, lo que produce la formación de una masa coagulada de fragmentos de plaquetas, preferiblemente después de incubación a 37°C durante 10 minutos. También se divulga que para la producción a gran escala adecuada para el almacenamiento y uso durante un periodo de tiempo prolongado, se obtienen unidades de plaquetas de aproximadamente 60 ml de concentrado de plaquetas por métodos de procesamiento de sangre estándar, como sabría el experto en la materia. Se añaden aproximadamente 2,5 ml de una solución de cloruro de calcio al 10% a cada unidad. El concentrado de plaquetas con el cloruro de calcio añadido se mezcla después suavemente y preferiblemente se incuba a 37°C durante 24 horas. Se sigue una técnica similar que con las formulaciones de menor escala.
- Tanto en los métodos a pequeña escala como a gran escala detallados anteriormente, después de la incubación, una masa blanca sólida retirada se deja suspendida libre en una fase líquida en el recipiente. La masa se elimina después y la fase líquida se transfiere a un nuevo recipiente. Para eliminar los fragmentos de membranas de plaquetas que pueden permanecer, en una forma de realización, la fase líquida se filtra a través de una membrana de poro de 0,4 µm. También se divulga que tales fragmentos se eliminan centrifugando la fase líquida a 4.000 g durante 1 hora. Este procesamiento hace el agente, en una forma de realización, no inmunógeno mediante ensayo cutáneo. También se divulga que el agente incluye además menos del 0,1% p/p de fragmentos de membrana celular después del procesamiento.
- El agente se puede después congelar o liofilizar para uso futuro, se puede combinar con al menos un excipiente farmacéuticamente aprobado, y se puede aplicar en forma de un líquido, crema, aerosol, o en cualquier otra forma como sabría el experto en la materia.
- La investigación ha mostrado que el proceso y compuesto de la presente invención, que se basa en un agente de los compuestos liberados por la lisis de plaquetas, en un medio de plasma, da un perfil de composición muy diferente que la activación de plaquetas en un medio acuoso, como ilustra la técnica de Knighton ('938).
- Por ejemplo, la electroforesis en geles bidimensionales de la presente invención comparada con los compuestos liberados de plaquetas derivados del método de Knighton ('938) muestra marcadas diferencias en la composición de proteínas, con una mayor serie de proteínas en la presente invención, comparado con el estado de la técnica. La figura 1 muestra la electroforesis en gel bidimensional de concentrado de plaquetas lavado, activado con trombina, y preparado según el estado de la técnica ('938). En la figura 2, se ve la electroforesis en gel bidimensional del compuesto de la presente invención. Los geles de ambas preparaciones se hicieron y analizaron de una manera idéntica, como sigue a continuación.
- Las preparaciones de prueba se centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos. A continuación, se añadió 1/10 de volumen de una solución que contenía Tris-HCl pH 8,0 (0,3 M), KCl (1,4 M) y MgCl_2 (30 mM) al sobrenadante y se ultracentrifugó a 54000 g durante 2 horas. El sobrenadante se diluyó con 3 volúmenes de agua destilada para disminuir la concentración de sal y después se concentró a 30 µl en un concentrador centrífugo de marca MICROSEP® (Filtron, Northborough, MA). La muestra de proteína concentrada se mezcló y solubilizó con 70 µl de una solución que contiene urea (8 M), CHAPS (4% p/v), Tris (40 mM), DTE (65 mM) y una cantidad pequeña de azul de bromofenol. La muestra diluida final se cargó en la primera separación dimensional.
- Se usó un gradiente de pH inmovilizado no lineal (3,5-10,0 NL IPG 18 cm) como la primera dimensión. Ofrecía alta resolución, excelente reproducibilidad y permitía altas cargas de proteína. Basado en esas especificaciones, las tiras de gradiente de pH no lineal fueron preparadas por Pharmacia-Hoeffer Biotechnology AB y están comercialmente disponibles. Las tiras tenían 3 mm de anchura y 180 mm de longitud. La diferencia de potencial se aumentó linealmente desde 300 a 3500 V durante 3 horas, seguido por 3 horas adicionales a 3500 V, después de lo cual la diferencia de potencial se aumentó a 5000 V durante una carrera por la noche.
- En la segunda dimensión, se usó un gel en gradiente vertical con el sistema discontinuo de Laemmli con SDS con algunas modificaciones pequeñas. Se usaron geles (160 x 200 x 1,5 mm de tamaño), no polimerizados en presencia de SDS, para prevenir la formación de micelas de monómero de acrilamida, aumentando de esta manera la homogeneidad del tamaño de poro. El SDS usado en el tampón de carrera del gel era suficiente para mantener la carga negativa necesaria en las proteínas. Se usó piperacina diacrililo (PDA) como entrecruzador. Se usó tiosulfato de sodio como un aditivo para reducir el fondo en la tinción de plata de los geles. Las condiciones de carrera de la

segunda dimensión incluían: corriente: 40 mA/gel (constante); diferencia de potencial: 250 V; temperatura: 10°C constante; tiempo: 5 horas.

- Después de la carrera final, los geles se retiraron de las placas de cristal, se lavaron en agua desionizada durante 5 minutos, y se transfirieron para su tinción a recipientes colocados en agitadores orbitales que operaban a 36 rpm. Un protocolo de tinción con plata consistía en tratar los geles como sigue: los geles se remojaron en mezcla etanol: ácido acético: agua (40:10:50) durante 1 hora, después se remojaron en mezcla etanol: ácido acético: agua (5:5:90) durante al menos 2 horas. Los geles se lavaron después en agua desionizada durante 5 minutos en cada lavado y se remojaron en un solución que contenía glutaraldehído (1%) y acetato de sodio (0,5 M) durante 30 minutos en cada remojo. Los geles se lavaron después 3 veces en agua desionizada durante 10 minutos, se remojaron dos veces en una solución de ácido 2,7-naftaleno-disulfónico (0,05% p/v) durante 30 minutos, y después se enjuagaron 4 veces en agua desionizada durante 15 minutos en cada enjuague.
- Los geles se tiñeron en una solución de nitrato de plata amoniacial recién hecha durante 30 minutos. Después de la tinción, se lavaron 4 veces en agua desionizada durante 4 minutos en cada lavado. Los geles se revelaron después en una solución que contenía ácido cítrico (0,01% p/v) y formaldehído (0,1% v/v) durante 5 a 10 minutos. Cuando apareció una ligera tinción de fondo, se paró el revelado con una solución que contenía Tris (5% p/v) y ácido acético (2% v/v).
- La comparación de los resultados de la electroforesis en gel bidimensional anterior de la presente invención comparada con la de los compuestos liberados de plaquetas derivados del estado de la técnica ('938) muestra marcadas diferencias en la composición de proteínas.
- La comparación de las figuras 1 (estado de la técnica) y 2 (presente invención) muestra que la presente invención, que contiene tanto proteínas de plaquetas citosólicas como proteínas de plasma, contiene una serie mucho mayor de proteínas que las preparadas según el estado de la técnica, que es un método de derivar compuestos comprendidos principal o exclusivamente de material granular de plaquetas. Esta serie aumentada de proteínas en el agente final es consistente con observaciones que han identificado al menos 125 proteínas citosólicas de plaquetas. Marcus, K. et al., "Identification of Platelet Proteins Separated by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Analyzed by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry and Detection of Tyrosine-Phosphorylated Proteins," Electrophoresis 21(13):2622-36 (2000).
- Una diferencia incluso más drástica entre la preparación de la presente invención y la del estado de la técnica se ve con análisis de matrices de genes. El análisis de matrices de genes es un medio de determinar los niveles relativos de transcripto de una multitud de genes en un punto determinado en el tiempo. Los datos informan al investigador qué genes de entre un subconjunto de dianas (o sospechosos) se expresan realmente en la genoteca de ARNm de las células analizadas en una instantánea determinada en el tiempo. Estos datos también muestran la robustez relativa de la expresión basado en la cantidad de diana que hibrida.
- Tales datos son extremadamente útiles para determinar si un tratamiento o condición determinado ha efectuado el perfil de expresión de ARNm, es decir, para responder la pregunta de si el tratamiento cambió o no el perfil de expresión génica. Esta información incluye no solo información respecto a cuál de los genes diana se expresan, sino que también proporciona información respecto al nivel de expresión, o intensidad, de la expresión génica. El nivel de ARNm con frecuencia es reflejo de los niveles de proteína correspondientes. Por tanto aumentos drásticos en el ARNm con frecuencia están acompañados por un aumento en la expresión de proteínas.
- Las matrices de genes son soportes sólidos en los que se ha colocado una colección de ácidos nucleicos específicos de genes en localizaciones definidas, bien mediante aplicación o síntesis directa. En el análisis de matriz, una muestra que contiene ácido nucleico se marca y después se deja hibridar con las dianas específicas de genes en la matriz. Los ácidos nucleicos unidos a las matrices se llaman "dianas", mientras que los ácidos nucleicos marcados que comprenden la muestra se llaman "sondas". Basado en la cantidad de sonda hibridada a cada mancha diana, se gana información sobre la composición de ácido nucleico específica de la muestra. La principal ventaja de las matrices de genes es que pueden proporcionar información sobre miles de dianas en un único experimento. En este experimento las secuencias diana eran un conjunto de genes que se sabe están implicados en el perfil de cicatrización.
- Un experimento de matrices de genes típico implica: 1) aislar ARN de las muestras que se van a comparar; 2) convertir las muestras de ARN en ADNc marcado a través de transcripción inversa, y este paso se puede combinar con amplificación de ARNa; 3) hibridar el ADNc marcado a matrices de membranas o portaobjetos de vidrio idénticos; 4) eliminar el ADNc sin hibridar; 5) detectar y cuantificar el ADNc hibridado; y 6) comparar los datos cuantitativos de varias muestras.
- Los productos que resultan del método de aislar compuestos del proceso de activación de plaquetas, según el método de la patente '938 se compararon con los productos que resultan de la presente invención en términos de sus efectos en los perfiles de expresión génica de cuatro tipos de células relevantes para la cicatrización. La técnica de análisis de micromatrizes de genes se realizó para comparar los niveles de expresión génica en células tratadas

con compuestos derivados del proceso '938, con los de la presente invención. Estos estudios indican un fuerte contraste en la expresión de ARNm tras el tratamiento con las dos fórmulas diferentes. Como se ve en las figuras 3-6, el análisis de matrices de genes muestra un aumento marcado en la expresión de ARNm en células de piel, células endoteliales, fibroblastos y macrófagos, entre la presente invención (a la izquierda en todas las figuras) y el estado de la técnica (a la derecha en todas las figuras).

Los resultados demuestran claramente que la presente invención induce un perfil de expresión mucho más drástico basado en las dianas evaluadas. Este descubrimiento sugiere que 1) los factores derivados de plaquetas hechos de lisis de plaquetas inducida por calcio tienen un efecto más drástico y robusto en las células relevantes para la curación y 2) los factores derivados de lisis inducida por calcio no son los mismos que los producidos de la reacción de liberación de plaquetas. Además, el análisis sugiere que la diferencia de expresión es probablemente debida tanto a un aumento en la cantidad de los mismos factores que se producen en la invención '938 como también a factores novedosos que solo se ven usando la presente invención, es decir, los factores que ahora están disponibles en el suero retenido, el citoplasma de plaquetas, y del vaciado de gránulos más completo que se produce con la lisis de plaquetas.

Antes de la presente invención, los principales bloqueos al uso de productos que contienen plaquetas o derivados de plaquetas han sido cuestiones inmunológicas. Se sabe bien que las plaquetas llevan antígenos HLA en su superficie. Las preparaciones de plaquetas, incluso las que contienen plaquetas fragmentadas, llevan estos antígenos a los donantes. Esto puede ser particularmente problemático con la exposición repetida a plaquetas aleatorias, lo que produce crisis de compatibilidad graves tras tratamientos posteriores.

Otra ventaja principal de la presente invención es que la lisis de plaquetas, seguida por centrifugación y ultracentrifugación, elimina esencialmente todas las membranas de plaquetas, incluyendo pequeños fragmentos, y deja detrás proteínas de plaquetas no inmunógenas. La evaluación experimental de la inmunorreactividad de la presente invención comparada con preparaciones del método del estado de la técnica ('938) mostró esta eliminación de fragmentos potencialmente inmunógenos con alta eficacia.

Treinta voluntarios humanos se sometieron a ensayos cutáneos según un protocolo estándar de la prueba de escarificación cutánea tanto con la presente invención, es decir, producto de plaqueta y suero ultrapurificado de la presente invención, como también con el compuesto formulado según el estado de la técnica, que se cree que retiene algunos fragmentos de membrana de plaquetas. Los voluntarios fueron examinados tanto para reacción inmediata a los dos compuestos, como para hipersensibilidad retrasada tras descansar 30 días después del contacto inicial. Todos los voluntarios fueron controlados internamente usando una prueba cutánea control con histamina, para asegurar la reactividad de todos los voluntarios. Los resultados se muestran en la tabla A:

Tabla A: Prueba cutánea para componentes inmunógenos; presente invención y estado de la técnica

	Presente invención	Control de histamina	Estado de la técnica	Control de histamina
Reacciones positivas de la prueba cutánea en el tiempo = 1 día	0/33 (0%)	33/33 (100%)	3/33 (10%)	33/33 (100%)
Reacciones positivas de la prueba cutánea en el tiempo = 30 días	0/33 (0%)	33/33 (100%)	2/33 (6%)	33/33 (100%)

La presente invención no mostró reacción inmunógena en la prueba cutánea, sea con la exposición inicial o con una segunda exposición a los 30 días. En contraste, el compuesto preparado según el método del estado de la técnica ('938) mostró un índice de reacción inicial del 10% y una reacción de hipersensibilidad retrasada del 6% con una segunda exposición a los 30 días. Como las exposiciones repetidas a antígenos pueden producir respuesta inmunógena intensificada, se infiere que se hubieran visto números crecientes de las reacciones de hipersensibilidad con exposiciones adicionales a los productos del estado de la técnica.

Además, se acometieron experimentos animales para evaluar la eficacia de la presente invención para el fomento de la regeneración de tejido. En el primer experimento, se evaluó la cicatrización de la piel en un modelo de ratón.

Se anestesiaron cincuenta ratones con ketamina intramuscular. El pelo de la piel se eliminó con maquinilla de un área ligeramente más larga de 10 mm del lomo de cada uno. Se hizo una incisión de 10 mm de largo en el área desnuda a una profundidad hasta el músculo aponeurosis. La herida se desinfectó limpiando con una gasa con peróxido de hidrógeno y se contuvo la hemorragia con compresión manual durante dos minutos. Se aplicó una preparación que contenía la presente invención a la superficie de la herida. Una segunda aplicación de la preparación de la presente invención se reaplicó 24 horas después.

Un grupo control de veinte ratones se preparó simultáneamente según el mismo procedimiento quirúrgico. En este grupo, la herida quirúrgica se trató con una aplicación de suero de ratón con PDGF a una concentración de 50 pg/ml, para imitar el protocolo clínico común de Nagai *et al.*, basado en el uso de PDGF recombinante (PDGF

recombinante de marca REGRANEX™ de Ethicon, Inc. de Somerville, N.J.) para la cicatrización, seguido por una segunda aplicación del mismo compuesto 24 horas después. Por tanto, los grupos activo y control se diferenciaban en que el grupo activo recibía un compuesto con las proteínas citosólicas de plaquetas derivadas según la presente invención, así como constituyentes de plasma, mientras que el grupo control recibió solo constituyentes de plasma y PDGF. Por tanto, las diferencias observadas entre los grupos se cree que derivan de la presencia de proteínas citosólicas de plaquetas en el tratamiento.

Veinticinco ratones del grupo activo y diez ratones del grupo control se sacrificaron el tercer días tras el tratamiento. Se retiró un cuadrado de piel, dejando la incisión quirúrgica previa en el centro del cuadrado. La piel se transfirió a un sistema de ensayo de tracción universal (MIDI 5-5, Messphisk, Alemania). Este dispositivo permite que se haga la medida de la elasticidad en la piel, así como la tracción al punto de ruptura, lo que permitió que se hicieran medidas de la cantidad relativa de fuerza necesaria para romper los tejidos en curación, como describen Hara *et al.*, y Draaijers *et al.* Los resultados se muestran posteriormente en las figuras 7 y 8.

En el estudio de elasticidad, visto en la figura 7, la elasticidad de la piel en el grupo control, es decir, el grupo que recibe suero de ratón y PDGF como tratamiento tópico, mostró una marcada disminución sobre valores de piel normal (área rayada diagonal; a la derecha) tres días después de la lesión. Esto mejoró de alguna manera siete días después de la lesión, pero aún permaneció considerablemente por debajo de los niveles normales. En contraste, en los ratones tratados con la preparación según la presente invención, había menos disminución de los valores normales tres días después de la lesión, y la elasticidad de la piel había vuelto a niveles normales, o incluso niveles mejorados de elasticidad, siete días después de la lesión, comprado con los valores basales.

En la resistencia de la piel, o estudio de resistencia a la ruptura, visto en la figura 8, hubo una reducción drástica tras la lesión en la resistencia de la piel a la ruptura bajo tracción en esos ratones tratados con la preparación control, es decir, suero de ratón y PDGF como tratamiento tópico, a menos del 25% de la resistencia del tejido antes de la lesión (área rayada diagonal; a la derecha). Esto esencialmente no mejoraba, en el grupo control, siete días después de la lesión. Por otra parte, en ratones tratados con la preparación de la presente invención, la caída en la resistencia a la ruptura estaba de alguna manera atenuada, comprada con los controles, después de tres días; y a los siete días había recuperado hasta casi la mitad del nivel de antes de la lesión. La resistencia a la rotura de la piel durante la cicatrización es un parámetro importante, ya que se puede hacer analogía a dehiscencia después de una lesión o cirugía.

El método y agente de la presente invención no es solo adecuado para fomentar la cicatrización. En una forma de realización alternativa, el efecto saludable del agente en el crecimiento celular se puede usar para fomentar el trasplante, mezclando el agente con células que se van a trasplantar antes de aplicar el agente al tejido diana. A modo de ejemplo y no limitación en tal respecto, se acometieron experimentos para comparar los índices relativos de crecimiento celular en preparaciones aisladas bañadas bien en suero o la preparación de la presente invención (Fig. 9). Veinte fragmentos de piel de ratón, que medía cada una 1 x 0,5 x 0,3 mm, se sembraron en la superficie de una botella de cultivo y se cubrieron con medio esencial mínimo de Dulbecco, suplementado con suero de ratón al 10%. Después de 96 horas, el crecimiento celular resultante, visto con una lente 3X, aparece en la figura 9A. Al mismo tiempo, veinte fragmentos de piel de ratón, que medía cada una 1 x 0,5 x 0,3 mm, se sembraron en la superficie de una botella de cultivo y se cubrieron con medio esencial mínimo de Dulbecco, suplementado con el 10% de la preparación de la presente invención, es decir, suero y extractos citosólicos de plaquetas. Después de 96 horas, el crecimiento celular resultante, visto con una lente 3X, aparece en la figura 9B. El índice mucho mayor de crecimiento celular visto con la presente invención apoya fuertemente el agente de la presente invención como un auxiliar al trasplante de células.

Es crítico diferenciar la pluralidad de productos normalmente encontrados secuestrados en estructuras de plaquetas en la presente invención de los productos que se liberan en las reacciones de liberación de plaquetas, tipificados por el proceso de Knighton detallado anteriormente. Esta diferenciación se centra alrededor de la supresión de TGF-β activo en la presente invención, comparada con la gran cantidad de TGF-β activo producido en el proceso de Knighton.

El TGF-β transportado por plaquetas es un derivado problemático de plaquetas. El factor de crecimiento transformante b (TGF-β) es la principal citoquina que produce depósito de colágeno en fibroblastos, como describen Tietjen y Stover. Como se discute en Flanders *et al.*, la expresión excesiva de TGF-β se ha implicado como que es responsable de la acumulación de tejido cicatricial dañino. Por tanto, la supresión de TGF-β activo en un auxiliar de cicatrización tal como el de la presente invención tenderá a fomentar un proceso de curación con menos cicatrices que uno que contiene TGF-β activo.

El TGF-β transportado por plaquetas se lleva en los gránulos de plaquetas, como se ve en la figura 10, en una forma inactiva que se puede llamar pro-TGF-β. Tal pro-TGF-β consiste en una parte de aproximadamente 25 kD (kilo Dalton) (dímero de TGF beta-1 maduro) y un fragmento de 75 kD de precursor S; con ambos fragmentos unidos a un portador de 135 kD. Grainger *et al.*, denomina al precursor S como la proteína de unión a TGF-β latente o LTBP, y al fragmento de 75 kD del precursor S como péptido asociado a latencia o LAP, e indica que más del 95% de todo el TGF-β ensayado en plaquetas enteras es transportado como este pro-TGF-β.

Cuando las plaquetas se coagulan con trombina en la reacción de liberación de plaquetas, como en el proceso de Knighton, el proceso de coagulación causa la activación del pro-TGF- β , como discuten Wakefield et al., lo que puede en parte ser debido al corte de la parte de 25 kD (activa) del precursor S de 75 kD y el portador de 135 kDa, como se ve en la figura 10. Esto es particularmente pronunciado cuando la reacción de coagulación de plaquetas se produce en el medio extremadamente ácido (pH = 6,5) propuesto por Knighton. Como resultado, los materiales liberados por las plaquetas en la reacción de liberación de plaquetas por Knighton incluyen la totalidad de esos compuestos liberados por las plaquetas en la reacción de liberación de plaquetas, sin ningún procesamiento u otro tratamiento que afectaría a la bioactividad de la multitud de factores contenidos en las mismas, es decir, con altos niveles de TGF- β activo.

Por el contrario, se tiene cuidado en la presente invención específicamente para evitar la reacción de liberación de plaquetas y para excluir un cierto componente de la reacción de liberación de plaquetas como describe Knighton, es decir, suprimir la activación de TGF- β . Esto se logra en un número de modos novedosos.

En primer lugar, la muestra de sangre de la que el compuesto de la presente invención deriva se divide en dos muestras; y la primera se deja coagular. Esta coagulación de sangre completa no produce activación de la reacción de liberación de plaquetas y, después de la eliminación del coágulo, permanece un suero que está esencialmente libre de fibrinógeno, tromboplastina y plaquetas. Sin embargo, el suero es rico en alfa-2 macroglobulina, un factor importante que se discutirá ahora.

La segunda muestra de sangre se anticoagula y centrifuga para formar un plasma rico en plaquetas que contiene tanto plaquetas como alfa-2 macroglobulina. Cuando el suero de la primera muestra de sangre se combina con el plasma rico en plaquetas de la segunda muestra en presencia de calcio, las plaquetas se lisan sin experimentar activación de la reacción de liberación de plaquetas, liberando el TGF- β inactivo, así como los compuestos de los gránulos α , cuerpos densos, y citosólicos de plaquetas.

La presencia de alfa-2 macroglobulina es importante porque, como discuten O'Connor-McCourt y Wakefield, es un potente agente de unión de TGF- β , que mantiene el TGF- β en su forma inactiva. Por tanto, la alfa-2 macroglobulina presente en la presente invención mantiene el TGF- β en la presente invención en su forma unida, inactiva, como se ve en la figura 11. Por tanto la composición de la presente invención contiene TGF- β inactivo, resultante de la lisis de plaquetas, y alfa-2 macroglobulina derivada de suero, que capta eficazmente el TGF- β activado que se puede formar inadvertidamente, por ejemplo, por la formación accidental de microcoágulos, o por la activación debido a un medio ácido en el sitio de aplicación, como también se ve en la figura 11. En formas de realización alternativas, la composición se puede tratar además añadiendo compuestos que bloquean los efectos fisiológicos del TGF- β , tal como, a modo de ejemplo, decorina; o se puede tratar extrayendo el TGF- β de la composición, a modo de ejemplo y no limitación, por medio de pasar la composición a través de una columna de afinidad apropiada.

Esto se puede contrastar con una composición que contiene los materiales liberados por las plaquetas durante la reacción de liberación de plaquetas, como se tipifica por el proceso de Knighton. Las plaquetas se lavan, resuspenden en un tampón ácido (pH = aproximadamente 6,5), y la reacción de liberación de plaquetas se activa. La pérdida de la alfa-2 macroglobulina que se une a TGF- β por el lavado, la activación de la reacción de liberación de plaquetas por trombina; y el medio muy ácido, sabido de Wakefield et al., que es un activador de TGF- β ; todos se combinan para formar TGF- β activo. Por tanto, en suma, la composición de la presente invención se produce y trata específicamente para comprender los compuestos contenidos en gránulos α , cuerpos densos y citosol de plaquetas; pero para ser deficiente en al menos uno de los materiales liberados por las plaquetas durante la reacción de liberación de plaquetas: TGF- β activo.

La supresión del TGF- β activo se indica en los resultados experimentales vistos con la composición de la presente invención. Como se ve en la figura 7, la elasticidad de la piel después de lesión y siete días de tratamiento es mucho mayor que en controles tratados con PDGF, y es realmente mayor en los sujetos experimentales que en los controles de piel normal. Al mismo tiempo, como se ve en la figura 8, la resistencia de la piel en los sujetos experimentales es mayor que la de los controles tratados con PDGF, pero es solo aproximadamente la mitad de los controles de piel normal después de siete días de tratamiento. Esto sugiere una reducción visible en la sobreestimulación de fibroblastos, debido a la supresión de TGF- β , en los sujetos tratados con la composición de la presente invención. Esto está en contraste a la actividad fibroblástica aumentada vista con composiciones que contienen materiales liberados por las plaquetas durante la reacción de liberación de plaquetas, por ejemplo, el compuesto de Knighton.

La supresión de TGF- β en la presente invención puede hacer una herida de alguna manera más elástica, al menos en las fases tempranas de curación, comparada con la obtenida con composiciones que contienen materiales liberados por las plaquetas durante la reacción de liberación de plaquetas y también confiere ventajas, tal como cicatrices disminuidas. Esto puede ser ventajoso particularmente para aplicaciones en las que la cicatrización puede ser crítica, tal como, a modo de ejemplo y no limitación, para reparaciones corneanas o en cirugía plástica.

También se divulga que la composición de la presente invención, que normalmente se mantiene a pH fisiológico, puede tener el TGF- β inactivo activado exponiéndolo a un proceso de acidificación, por ejemplo solo, burbujeando la composición con dióxido de carbono para cortar el TGF- β de 25 kD activo del precursor S y el portador; así como para causar la disociación de TGF- β de 25 kD activo de alfa-2 macroglobulina. Esto crearía una composición con efectos que recuerdan más a los de composiciones que contienen materiales liberados por las plaquetas durante la reacción de liberación de plaquetas, pero con los beneficios adicionales de proporcionar compuestos contenidos en los gránulos α , cuerpos densos y citosol de plaquetas.

Se debe enfatizar que los experimentos precedentes que se refieren a las mejoras en la elasticidad y resistencia de la piel, o al crecimiento celular, se pretenden como ilustraciones y no limitaciones respecto al agente, método y proceso de preparación. El agente en general fomenta la plasticidad de tejidos en un sentido más general, es decir, mejoras en uno o más parámetros tal como tamaño, resistencia, función celular u orgánica, composición de la matriz, u otras medidas fisiológicas, como sabría el experto en la materia. Además, el agente fomenta angiogénesis y es sustancialmente no inmunógeno.

Lo que se reivindica entonces, es un agente regenerador de tejidos biológicos obtenible por el proceso reivindicado que comprende los materiales liberados por la lisis de plaquetas, que comprende compuestos normalmente contenidos en gránulos α , cuerpos densos y citosol de plaquetas y en donde TGF- β está en una forma inactiva; y suero que contiene alfa-2 macroglobulina, para facilitar el crecimiento de tejidos, que se puede describir más ampliamente como que incluye mejoras en la plasticidad de los tejidos. Un proceso para preparar este agente, que puede ser para cualquier uso animal o humano, puede derivar además de plaquetas y suero del individuo que se trata, o de otro individuo. El agente puede ser sustancialmente no inmunógeno y puede contener menos del 0,1% p/p de fragmentos de membrana celular, que se pueden eliminar del agente por filtración, centrifugación o cualquier otra técnica como sería evidente para el experto en la materia.

El proceso para producir un agente regenerador de tejidos biológicos comprende los pasos de:

- (i) dejar que una primera muestra de sangre completa de un individuo coagule y se separe en coágulo y suero, desechar el coágulo y reservando el suero;
- (ii) anticoagular una segunda muestra de sangre completa de dicho individuo con un anticoagulante;
- (iii) separar dicha segunda muestra en una fracción celular que contiene principalmente glóbulos rojos y leucocitos, y una fracción de plasma rico en plaquetas que comprende una pluralidad de plaquetas, y desechar la fracción celular;
- (iv) someter dicha fracción de plasma rico en plaquetas de la segunda muestra a un tratamiento para inducir la lisis de las plaquetas en dicha fracción de plasma rico en plaquetas de la segunda muestra para formar una fracción de plasma rico en plaquetas que comprende plaquetas lisadas y fragmentos estructurales de plaquetas, dicho tratamiento comprende la adición de calcio a dicha fracción de plasma rico en plaquetas de la segunda muestra;
- (v) combinar dicha fracción de plasma rico en plaquetas que comprende plaquetas lisadas y fragmentos estructurales de plaquetas, con el suero de dicha primera muestra que contiene alfa-2 macroglobulina, para formar una mezcla; y
- (vi) eliminar todos los fragmentos estructurales de plaquetas de la mezcla para dar un agente regenerador de tejidos biológicos que comprende los materiales liberados por la lisis de plaquetas, en donde el TGF- β está en una forma inactiva.

Se divulga que la proporción del volumen de la primera muestra y la segunda muestra es 2:1. El procesamiento de varios componentes durante la preparación se puede mejorar o acelerar mediante centrifugación a velocidades predeterminadas y durante tiempos predeterminados, así como mediante incubación a temperaturas predeterminadas durante tiempos predeterminados. En una forma de realización preferida, el anticoagulante es citrato de calcio tamponado. También se divulga que la lisis de plaquetas, que también se puede producir congelando y descongelando las plaquetas mediante de un número predeterminado de ciclos de congelación-descongelación o por sonicación, se induce proporcionando una cantidad de calcio, que puede estar en forma de cloruro de calcio. El agente se puede purificar por medios tales como filtración y centrifugación, y se puede procesar para almacenamiento por tales medios como, a modo de ejemplo y no limitación, congelación y liofilización. El agente se puede combinar con al menos un excipiente farmacéuticamente aprobado, y se puede aplicar en forma de un líquido, crema, aerosol, o en cualquier otra forma como sabría el experto en la materia.

El método facilita el crecimiento de tejido, que se puede describir más ampliamente como que incluye mejoras en la plasticidad de tejidos, y se puede aplicar a tejido animal, incluyendo tejido de mamífero y humano. La pluralidad de materiales liberados por la lisis de plaquetas se puede liberar de plaquetas de mamíferos, incluyendo humanos, y pueden derivar del individuo cuyo tejido se trata o de otro individuo. El tratamiento fomenta la plasticidad de tejidos en al menos un tejido, que puede incluir, pero no está limitado a, tales parámetros perceptibles como mejoras en la elasticidad y resistencia de la piel después de lesión; así como a crecimiento celular, incluyendo el crecimiento celular de células transplantadas. El método puede implicar la aplicación del agente en cualquiera de varias maneras como sabría el experto en la materia, incluyendo sin limitación, aplicación tópica y aplicación en un espacio cerrado.

El aumento en la concentración y variedad de compuestos contenidos en la presente invención hace el método más terapéuticamente eficaz que un compuesto que contiene los liberados por una reacción de liberación de plaquetas.

5 En formas de realización adicionales, se pueden añadir a la mezcla compuestos que bloquean los efectos fisiológicos del TGF- β , que puede a modo de ejemplo solo, ser decorina; y se puede añadir un paso adicional de eliminar el TGF- β de la mezcla, de nuevo a modo de ejemplo solo, pasando la mezcla a través de una columna de afinidad apropiada. También se divulga que el TGF- β inactivo en la mezcla se puede activar, a modo de ejemplo solo, acidificando la mezcla.

10 **Aplicabilidad industrial**

La solicitud responde a una necesidad largamente sentida para un agente regenerador de tejidos biológicos y un método para preparar el mismo. El agente y método de uso proporciona una pluralidad de compuestos liberados por la lisis de plaquetas, que comprende además compuestos normalmente contenidos en gránulos α , cuerpos densos y citosol de plaquetas; y suero. El agente y método suprime al menos un compuesto liberado por la reacción de liberación de plaquetas del estado de la técnica; TGF- β activo.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir un agente regenerador de tejidos biológicos que comprende los pasos de:
 - 5 (i) dejar que una primera muestra de sangre completa de un individuo coagule y se separe en coágulo y suero, desechar el coágulo y reservando el suero;
 - (ii) anticoagular una segunda muestra de sangre completa de dicho individuo con anticoagulante;
 - (iii) separar dicha segunda muestra en una fracción celular que contiene principalmente glóbulos rojos y leucocitos, y una fracción de plasma rico en plaquetas que comprende una pluralidad de plaquetas, y desechar la fracción celular;
 - 10 (iv) someter dicha fracción de plasma rico en plaquetas de la segunda muestra a un tratamiento para inducir la lisis de las plaquetas en dicha fracción de plasma rico en plaquetas de la segunda muestra para formar una fracción de plasma rico en plaquetas que comprende plaquetas lisadas y fragmentos estructurales de plaquetas, dicho tratamiento comprende la adición de calcio a dicha fracción de plasma rico en plaquetas de la segunda muestra;
 - (v) combinar dicha fracción de plasma rico en plaquetas que comprende plaquetas lisadas y fragmentos estructurales de plaquetas, con el suero de dicha primera muestra que contiene alfa-2 macroglobulina, para formar una mezcla; y
 - 15 (vi) eliminar todos los fragmentos estructurales de plaquetas de la mezcla para dar un agente regenerador de tejidos biológicos que comprende los materiales liberados por la lisis de plaquetas, en donde el TGF-β está en una forma inactiva.
2. El proceso según la reivindicación 1, en donde el anticoagulante es citrato de calcio tamponado.
- 25 3. El proceso según la reivindicación 1, en donde el calcio se proporciona en forma de cloruro de calcio.
4. El proceso según la reivindicación 1, en donde productos normalmente encontrados secuestrados en estructuras de plaquetas comprenden productos encontrados secuestrados en los gránulos alfa, y cuerpos densos de una plaqueta intacta.
- 30 5. El proceso según la reivindicación 1, en donde el paso de eliminar todos los fragmentos de estructuras de plaquetas de la mezcla comprende además filtración a través de una membrana con poros menores que o iguales a 0,4 µm.
- 35 6. El proceso según la reivindicación 1, que comprende además el paso de eliminar el TGF-β de dicha mezcla.
7. El proceso según la reivindicación 6, en donde el paso de eliminar el TGF-β del agente se logra añadiendo decorina.
- 40 8. El proceso según la reivindicación 6, en donde el paso de eliminar el TGF-β del agente se logra pasando dicha mezcla a través de una columna de afinidad apropiada.
9. Un agente regenerador de tejidos biológicos para facilitar el crecimiento de tejidos obtenido según el proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 45 10. Un agente regenerador de tejidos biológicos según la reivindicación 9 para uso en el fomento de regeneración de tejidos.
- 50 11. Un agente regenerador de tejidos biológicos según la reivindicación 9 para uso en el fomento de cicatrización.
12. Un agente regenerador de tejidos biológicos según la reivindicación 9 para uso en el fomento de trasplante.
- 55 13. Una composición farmacéutica que comprende un agente regenerador de tejidos biológicos según la reivindicación 9 y un excipiente farmacéuticamente aprobado.

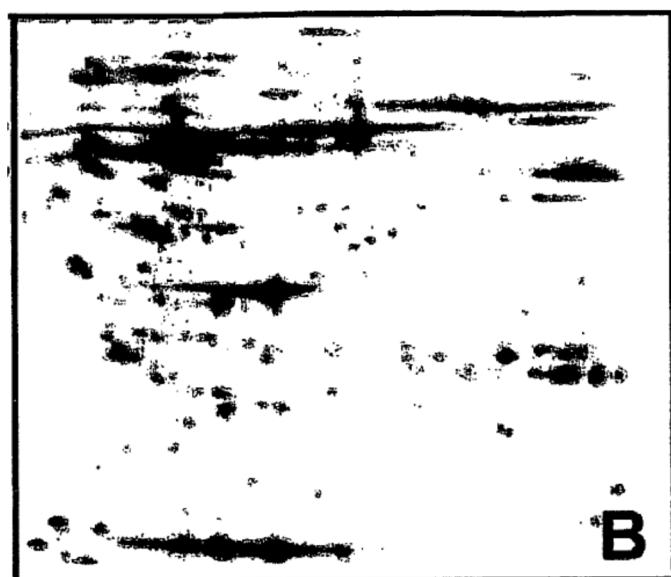


Figura 1

Electroforesis en gel bidimensional (Estado de la técnica)

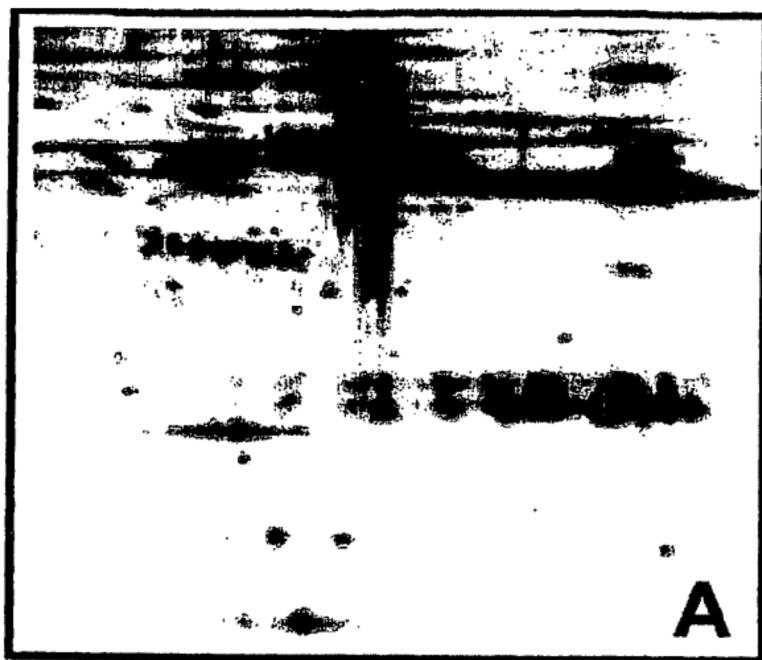


Figura 2

Electroforesis en gel bidimensional (Presente invención)

Efectos en células de piel

Nueva Invención

Estado de la técnica

Genes/rutas aumentados



Genes/rutas disminuidos



Figura 3

Genes/rutas aumentados y disminuidos en células de piel
Presente invención (Izquierda); Estado de la técnica (Derecha)

Efectos en células endoteliales

Nueva Invención

Estado de la técnica

Genes/rutas aumentados

Genes/rutas disminuidos



Figura 4

Genes/rutas aumentados y disminuidos en células endoteliales
Presente invención (Izquierda); Estado de la técnica (Derecha)

Efectos en fibroblastos

Nueva Invención

Estado de la técnica

Genes/rutas aumentados

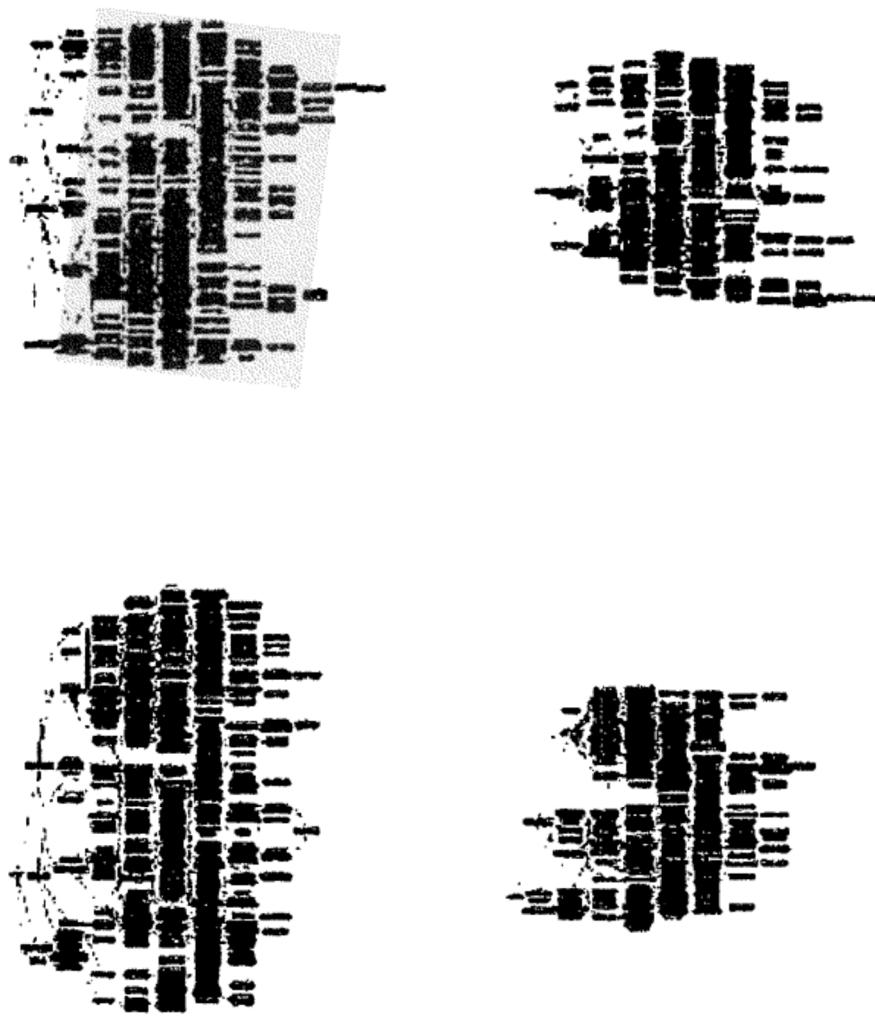


Figura 5

Genes/rutas aumentados y disminuidos en fibroblastos
Presente invención (Izquierda); Estado de la técnica (Derecha)

Efectos en macrófagos

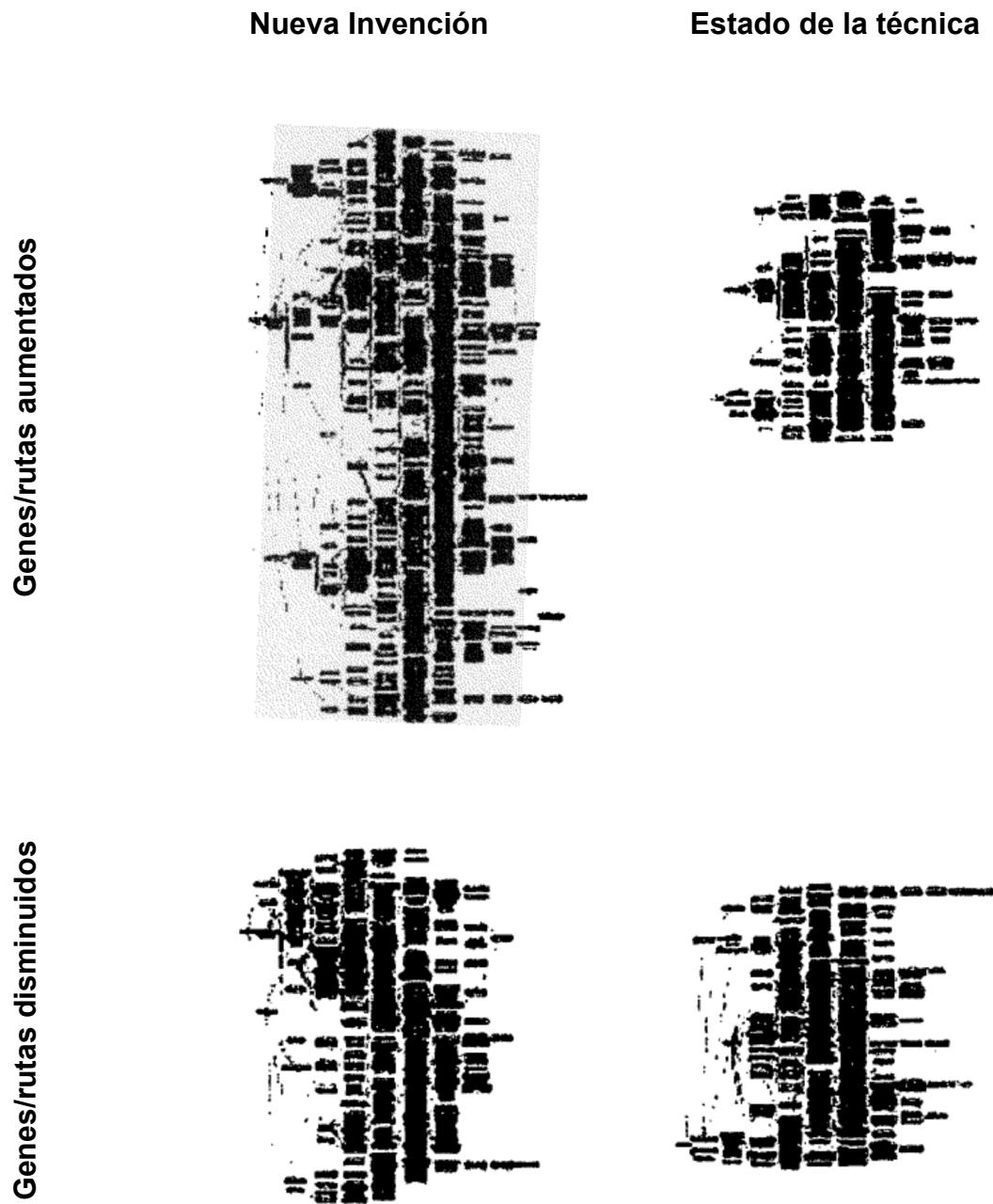


Figura 6

Genes/rutas aumentados y disminuidos en macrófagos
Presente invención (Izquierda); Estado de la técnica (Derecha)

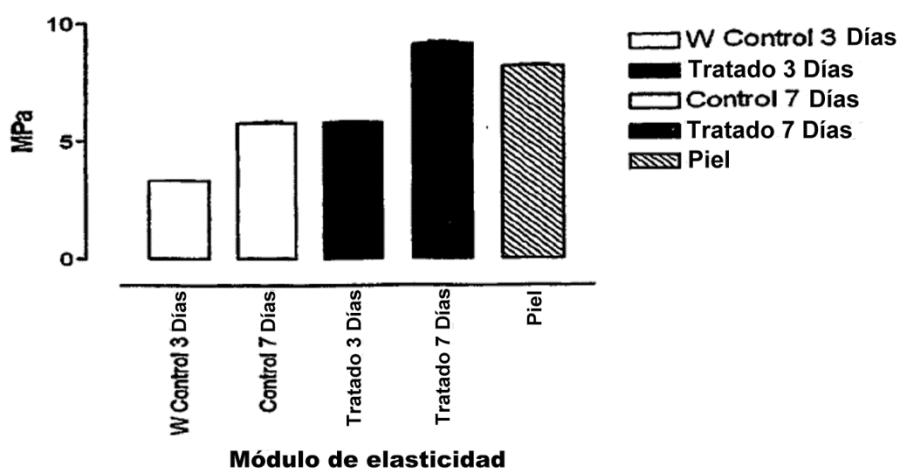


Figura 7

Estudio de elasticidad de la piel

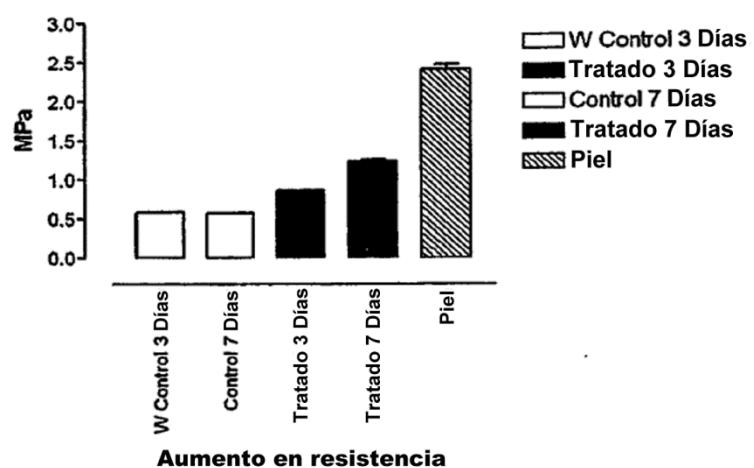


Figura 8

Estudio de resistencia de la piel (Resistencia a la ruptura)

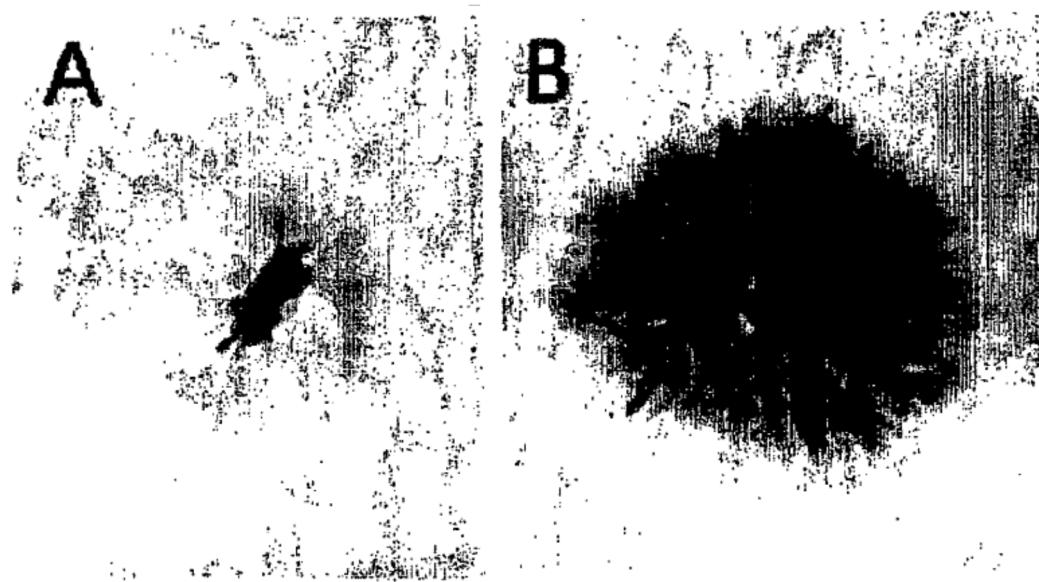


Figura 9

Crecimiento de células de la piel después de 96 horas de incubación

A: Medio esencial mínimo suplementado con suero al 10%

B: Medio esencial mínimo suplementado con el 10% del compuesto regenerador de la presente invención

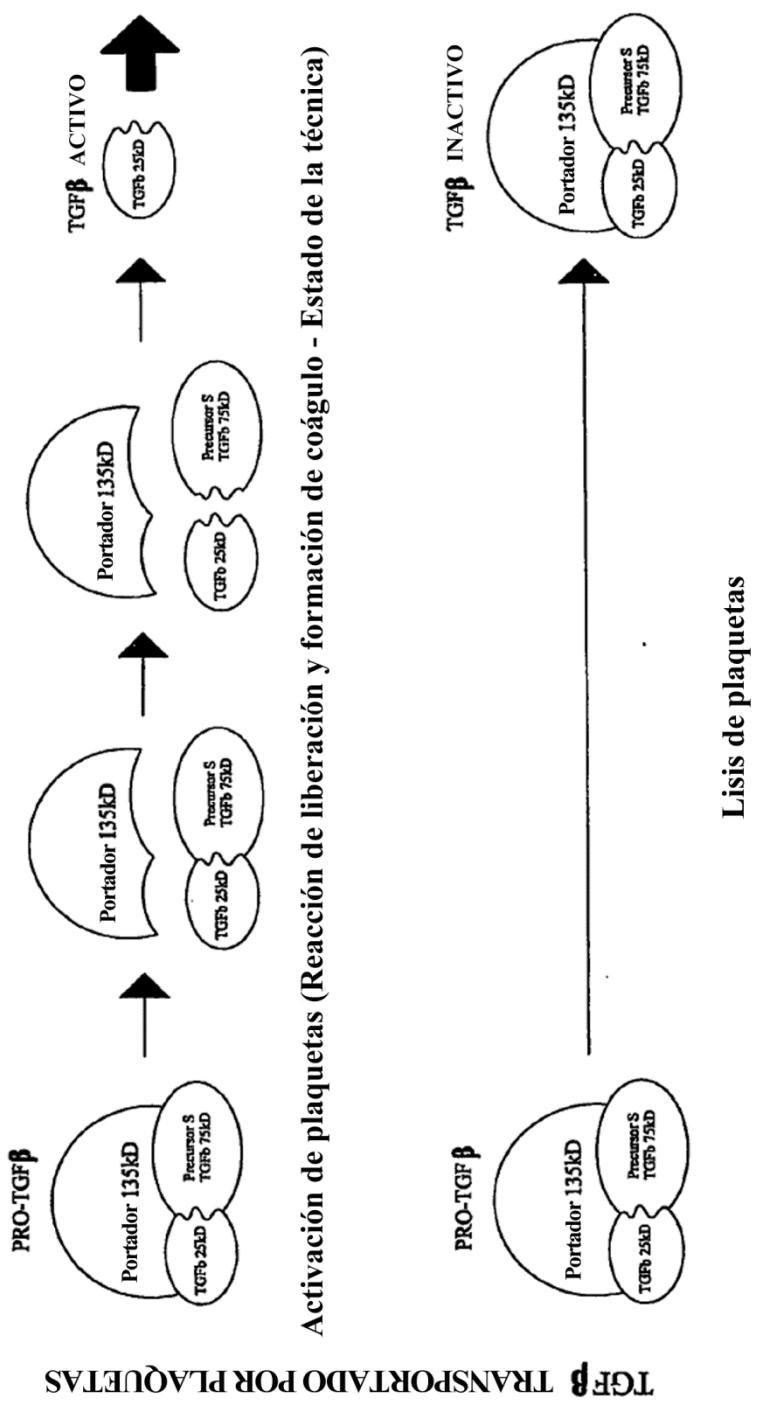
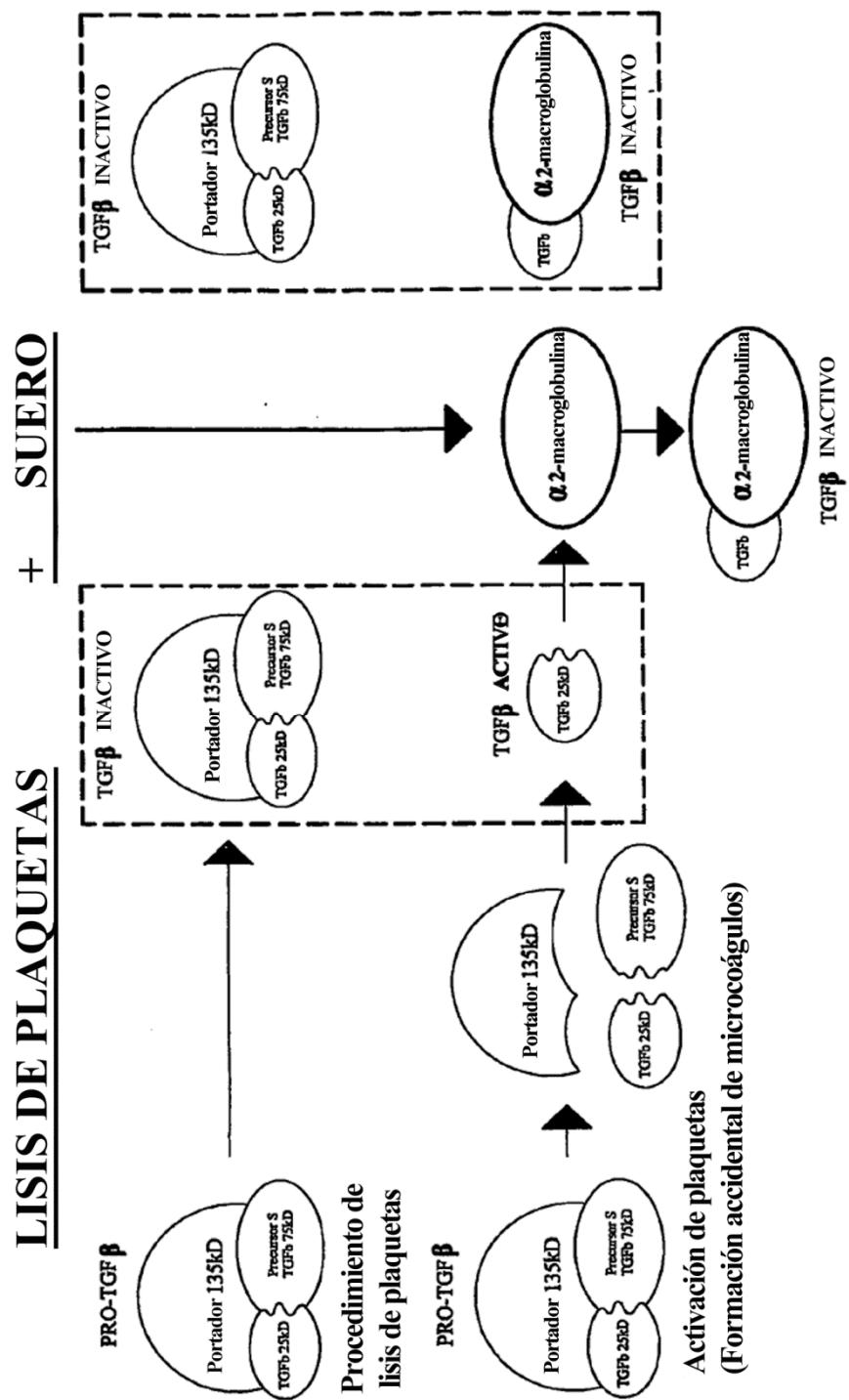
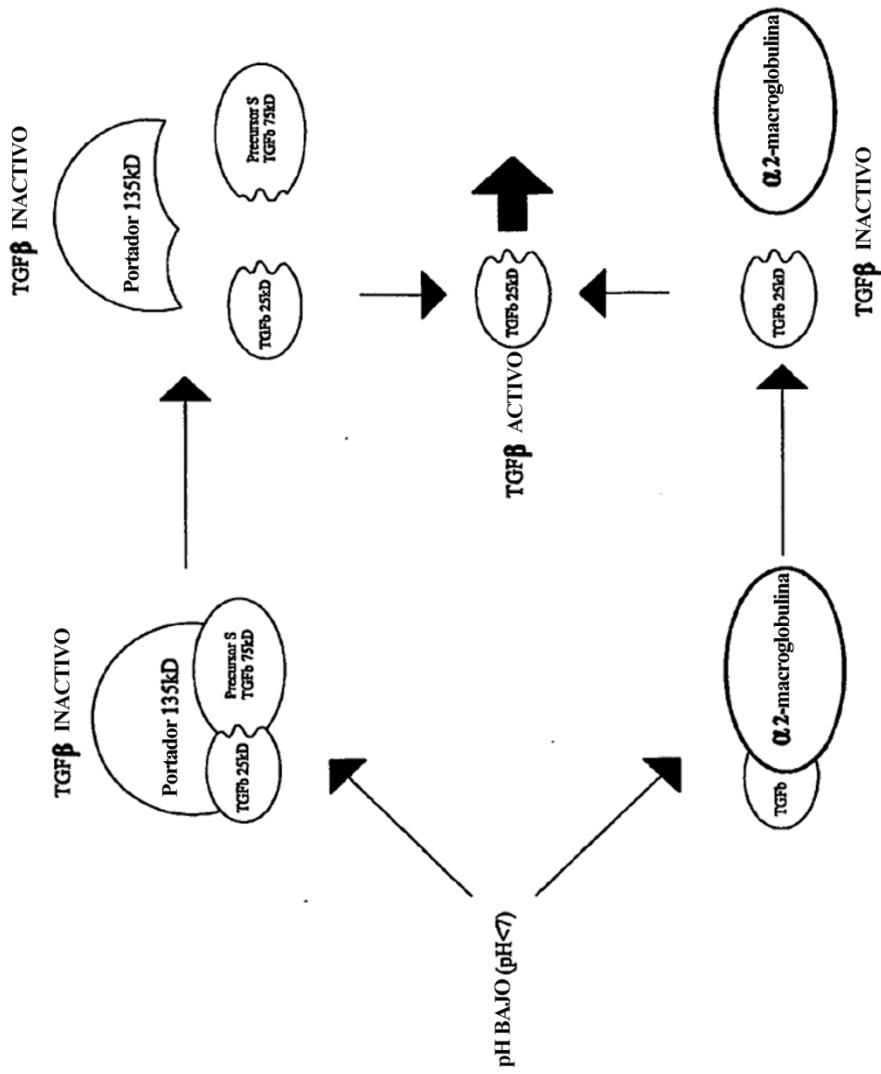


Figura 10

**Figura 11**

**Figura 12**