

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 857**

51 Int. Cl.:

A61K 35/16 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61K 35/19 (2015.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2012 E 12155924 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2628484**

54 Título: **Composiciones de plasma rico en plaquetas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.08.2016

73 Titular/es:

**OPKO LAB EUROPE SL. (100.0%)
Placa d'Europa, 13-15
08908 Hospitalet de Llobregat, Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**AGUT SÁNCHEZ, JULIÁN;
FERNÁNDEZ NAVARRO, CARLOS;
COS TRULLAS, JOAN;
OCAÑA SAFONT, LAURA y
GENOVE COROMINAS, ELSA**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 579 857 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

Composiciones de plasma rico en plaquetas

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para la administración oral que comprende plasma rico en plaquetas y a usos de la misma. La invención también describe composiciones nutricionales que comprenden plasma rico en plaquetas.

10

Antecedentes de la invención

El plasma rico en plaquetas (PRP) es un producto derivado de la sangre que es rico en plaquetas. El PRP normalmente se obtiene de la sangre de un paciente y se usa en la medicina regenerativa.

15

Las plaquetas desempeñan un papel fundamental en la hemostasia y son una fuente natural de factores de crecimiento. La liberación de estos factores de crecimiento se genera mediante la activación de las plaquetas, que puede ser iniciada por una variedad de sustancias o estímulos tales como la trombina, el cloruro de calcio o el colágeno. Los factores de crecimiento son proteínas naturales capaces de estimular la proliferación y la diferenciación celular. Los estudios han encontrado que los factores de crecimiento son importantes en diferentes etapas de la cascada de curación de heridas y que influyen en gran medida en las actividades de diferenciación mitogénica y celular (Pierce *et al.*, *Proc Natl. Acad Sci. EE.UU.* 86 (7), 2229-2233 (1989) y *J. Biol Cell.* 109(1), 429-440 (1989) y D. L. Steed *et al.*, *Surg. Clin. North Am.* 77, 575-586 (1997)). Por lo tanto, los factores de crecimiento son potencialmente útiles para fomentar específicamente la curación de heridas y la reparación de tejidos. En general, el PRP puede incluir uno o más de un factor de crecimiento transformante (TGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PDEGF), factor de angiogénesis derivado de plaquetas (PDAF), factor plaquetario 4 (PF-4) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).

20

25

30

En particular, los factores de crecimiento transformantes (TGF) presentes en el PRP incluyen particularmente los de la familia TGF- β . El TGF- β es una proteína que controla la proliferación, la diferenciación y otras funciones de las células. También puede actuar como un factor de crecimiento autocrino negativo. Se sabe que el TGF- β activa los fibroblastos para formar procolágeno, que produce la deposición del colágeno dentro de la herida. Otros factores de crecimiento tales como PDGF son activadores de la colagenasa durante la curación de las heridas, permitiendo la remodelación del colágeno para reforzar la herida.

35

El PRP tiene muchas aplicaciones médicas, principalmente en cirugía oral constructiva y como parte de una composición usada como adhesivo quirúrgico. El PRP se ha usado para formar un adhesivo de tejido de fibrina a través de la activación del PRP usando trombina y calcio, que activan las plaquetas para liberar su contenido, tal como citoquinas y otros factores de crecimiento. Por ejemplo, el documento US 6.322.785 desvela un gel de plaquetas autólogas que comprende PRP para aplicaciones de injertos óseos e implantes dentales.

40

El uso de PRP se ha expandido a nuevas aplicaciones tales como la ingeniería de botejidos o los injertos de tejido autólogo y alogénico, así como la regeneración de tejidos blandos (Oikarinen *et al.*, *Dent. Traumatol.* 19, 19-29 (2003)). Estas aplicaciones incluyen el PRP como parte de una composición para la curación de heridas (documento US 5.599.558) y la reparación de tejidos (documento US 6.811.777), para su uso como sellante de tejidos (documento US 5.585.007) o en combinación con un biopolímero para bloquear temporalmente las arterias y las venas (documento US 5.614.204). Por otra parte, el documento WO 2011/127071 se refiere a formulaciones de PRP y a su uso en el tratamiento de la lesión isquémica, particularmente, del tejido conjuntivo, tejido cardíaco y tejido pulmonar dañado.

45

50

El documento US 6.811.777 desvela una composición de plasma rico en plaquetas para el tratamiento de tejido lesionado, tal como tejido conjuntivo, músculo cardíaco, músculo esquelético, material discal, cuerpo vertebral, cerebro, médula espinal y tejido vascular mediante la introducción de la composición de plasma rico en plaquetas en y alrededor del sitio de una lesión tisular.

55

La fuente más rápida de PRP es la de la sangre extraída de un paciente, pudiéndose, por tanto, obtenerse y activarse el PRP para su uso en el mismo paciente. Los métodos de uso de la propia sangre del paciente se denominan métodos de donante "autólogo" o "autógeno". Cuando la sangre es donada por un ser humano, pero no por el mismo ser humano que se está tratando, se denomina "homóloga". Las fuentes homólogas de PRP pueden ser biológica o inmunológicamente incompatibles con el paciente, y pueden implicar un posible riesgo de contaminación con contaminantes de la hepatitis y del VIH. El PRP autólogo tiene varias ventajas de seguridad. Por ejemplo, dado que, en general, el PRP es un subproducto de la propia sangre del paciente, la transmisión de enfermedades o las reacciones inmunológicas no son un problema. Sin embargo, los pacientes con enfermedades sistémicas complejas pueden afectar a la concentración de los factores de crecimiento en la sangre y en cualquiera

60

65

de los preparados derivados de la sangre, y por tanto, no se beneficiarán de las ventajas de este tipo de tratamientos. Además, ciertos tratamientos requieren composiciones plaquetarias que se deben preparar diariamente, y por lo tanto, requieren extraer regularmente sangre del paciente.

5 A la vista de la información anterior, las fuentes "heterólogas" de PRP (de una especie foránea) pueden ser de interés, ya que pueden proporcionar una fuente fiable, ampliamente disponible y altamente reproducible de materia prima. Por ejemplo, la sangre porcina genera un menor riesgo de infección viral humana (VIH, hepatitis, etc.), la producción de factores de crecimiento es casi 100 % idéntica a sus homólogos humanos, y es una fuente de concentración eficaz y constante de factores de crecimiento. Además, en muchos países, la sangre de los mataderos se desecha como material residual por la falta de posibilidades de uso de la misma.

10 Por lo tanto, sería muy deseable obtener una composición que comprendiera PRP sin la necesidad de la propia sangre de un paciente y que procediera de una fuente más disponible, accesible y económica tal como la sangre porcina.

15 Además, el uso de PRP autólogo para el tratamiento de pacientes afectados por la degeneración de la rodilla con inyecciones intraarticulares de PRP ha sido descrito por G. Filardo *et al.*, *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 19(4), 528-35 (2011). La artrosis es una enfermedad de las articulaciones con una alta incidencia y prevalencia en la población. El síntoma principal es el dolor, causando pérdida de capacidad y, a menudo, rigidez. No tiene cura, y los tratamientos paliativos tales como la administración de analgésicos y antiinflamatorios se usan principalmente para el tratamiento de los síntomas. De hecho, la liberación sostenida de los factores de crecimiento contenidos en el PRP tiene efectos preventivos contra la progresión de la artrosis. El tratamiento con inyecciones de PRP puede reducir el dolor y mejorar la función de la rodilla y la calidad de vida eficazmente a corto plazo. Estos efectos preventivos parecen deberse a la estimulación del metabolismo de la matriz del cartílago, causada por los factores de crecimiento contenidos en el PRP (Saito *et al.*, *Clin. Exp. Rheumatol.* 27(2), 201-7 (2009)).

20 El documento WO2009/016451 desvela un método para el tratamiento de enfermedades articulares o dolor articular, que comprende la infiltración en la articulación de un compuesto que comprende al menos una sustancia derivada de sangre autóloga.

25 Como se ha explicado anteriormente, se sabe que los factores de crecimiento son útiles para potenciar la curación de heridas y la reparación de tejidos. La adición de factores de crecimiento exógenos a la herida ha demostrado aumentar la velocidad a la que se cierra la misma, el número de células de la zona de curación, el crecimiento de los vasos sanguíneos y la resistencia de la cicatriz (Carter *et al.*, *Biolog. And Clinical Implications* 303 (1988)).

30 En Knighton *et al.*, *Ann. Surg.* 204, 322-330 (1986), se ha descrito una fórmula de curación de heridas derivada de plaquetas en forma de un bálsamo o de una pomada de aplicación tópica.

35 Como se ha desvelado en la técnica anterior mencionada anteriormente, la mayoría de los productos biológicos, tales como péptidos y fármacos de proteínas, actualmente se usan como formulaciones parenterales debido a su baja biodisponibilidad oral. Las principales razones de la baja biodisponibilidad oral de los productos biológicos son sus propiedades fisicoquímicas desfavorables, que incluyen la degradación enzimática, la mala permeabilidad de la membrana intestinal y el gran tamaño molecular (R. I. Mahato *et al.*, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 20, 153-214 (2003) y J. H. Hamman *et al.*, *BioDrugs* 19, 165-177 (2005)). El plasma rico en plaquetas (PRP) contiene altos niveles de entidades biológicas, tales como plaquetas y factores de crecimiento. Los inventores de la presente invención han encontrado que, sorprendentemente, el factor de crecimiento TGF- β 1 no se degrada en condiciones gástricas ni gastrointestinales, y por consiguiente, los niveles de TGF- β 1 no se ven afectados por la digestión. Este resultado fue totalmente inesperado, especialmente en vista de la baja biodisponibilidad oral mostrada por los productos biológicos.

50 **Explicación de la invención**

Los inventores han encontrado que, sorprendentemente, las composiciones farmacéuticas que comprenden plasma rico en plaquetas se pueden formular para la administración oral y que son útiles en el tratamiento de varios tipos de enfermedades y lesiones tisulares.

55 Así pues, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica administrada por vía oral que comprende plasma rico en plaquetas (PRP). Dicha composición farmacéutica comprende PRP heterólogo que se administrará por vía oral y que es eficaz en el tratamiento o en la prevención del dolor asociado con las enfermedades, los trastornos o las lesiones de las articulaciones y de los tendones.

60 Aunque no englobada por las reivindicaciones, también se desvela una composición farmacéutica que comprende PRP heterólogo que se puede administrar por vía oral y que es eficaz en el tratamiento o en la prevención del dolor asociado con las enfermedades, los trastornos y las lesiones del tejido conjuntivo.

65

También se desvela una composición cosmética y una composición nutricional o un complemento nutricional para la administración oral que comprende plasma rico en plaquetas.

5 La composición farmacéutica para la administración oral de la presente invención comprende plasma rico en plaquetas de una fuente heteróloga. Preferentemente, dicho plasma rico en plaquetas procede de sangre entera de animales. Más preferentemente, se usa la sangre entera de ganado o cerdos.

10 En otra realización, la composición farmacéutica de la invención comprende además factores de crecimiento. Preferentemente, dicha composición farmacéutica comprende factores de crecimiento seleccionados del grupo que consiste en factores de crecimiento transformantes (TGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), factores de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PDEGF), factores de angiogénesis derivado de plaquetas (PDAF), factores de plaquetas 4 (PF-4), factores de crecimiento de hepatocitos (HGF) y mezclas de los mismos.

15 Para la administración oral, la composición farmacéutica que comprende plasma rico en plaquetas de acuerdo con la invención se puede incorporar en una formulación que podría incluir uno o más agentes, vehículos o excipientes tales como diluyentes inertes, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes con el fin de proporcionar preparados agradables para el paladar. La formulación se puede administrar por vía oral en forma de cápsulas de gelatina cerradas o comprimidos fabricados por compresión. Las cápsulas y los comprimidos se pueden preparar mediante cualquiera de las técnicas convencionales. Los comprimidos pueden contener la composición farmacéutica de acuerdo con la invención mezclada con excipientes aceptables no tóxicos que sean adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes tales como carbonato de calcio, carbonato de calcio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y disgregantes, por ejemplo, almidón de maíz, carboximetilcelulosa sódica, crospovidona, glicolato de almidón de sodio o ácido algínico; lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, dióxido de silicio) y agentes aglutinantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico, lactosa monohidratada, celulosa microcristalina o talco. Las cápsulas y los comprimidos pueden estar recubiertos con diversos recubrimientos conocidos en la técnica para modificar los aromas, los sabores, los colores y las formas de las cápsulas y de los comprimidos. Las cápsulas y los comprimidos también pueden recubrirse mediante técnicas conocidas para retrasar la disgregación y la adsorción en el tracto gastrointestinal, proporcionando así una acción sostenida durante un mayor período de tiempo. Por ejemplo, se puede emplear un material de retardo temporal tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. Las formulaciones para su uso oral también pueden presentarse en forma de cápsulas de gelatina dura, en las que la composición farmacéutica se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o en forma de cápsulas de gelatina blanda, en las que la composición farmacéutica se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva. Las formulaciones orales adecuadas también pueden estar en forma de suspensión, jarabe, goma de mascar, oblea, elixir, y similares. Si se desea, también se pueden incluir agentes convencionales para la modificación de los aromas, los sabores, los colores y las formas de las formas especiales. Además, para la administración conveniente por sonda de alimentación enteral a pacientes que no pueden tragar, la composición farmacéutica se puede disolver en un vehículo de aceite vegetal lipófilo aceptable tal como aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de cártamo.

45 La composición farmacéutica que comprende PRP para uso oral también puede ser una suspensión acuosa que contenga dicha composición farmacéutica mezclada con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; agentes dispersantes o humectantes, que pueden ser un fosfátido de origen natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo, *p*-hidroxibenzoato de etilo o de *n*-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa, fructosa o sacarina.

55 Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan la composición farmacéutica de la presente invención mezclada con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes y los agentes de suspensión se ilustran por los ya mencionados anteriormente. También puede haber excipientes adicionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes.

60 Por consiguiente, en otra realización de la presente invención, la composición farmacéutica que comprende plasma rico en plaquetas que se describe en el presente documento está en forma de dosificación oral sólida. Preferentemente, dicha composición farmacéutica está en forma de un comprimido, una cápsula o un polvo seco que se puede suspender y reconstituir en agua.

65 De acuerdo con la invención, la composición farmacéutica para la administración oral que comprende PRP como se ha descrito anteriormente en el presente documento, se puede usar en el tratamiento o en la prevención del dolor asociado con las enfermedades, los trastornos o las lesiones de las articulaciones y de los tendones. Los ejemplos

de dichas enfermedades, los trastornos o las lesiones de las articulaciones o de los tendones incluyen, sin limitación, daño en las articulaciones, lesiones en los tendones, artritis, lesiones osteocondrales, artrosis, tendinitis, tenosinovitis, bursitis y lesiones de ligamentos. Preferentemente, la composición farmacéutica administrada por vía oral para su uso en el tratamiento o en la prevención del dolor asociado con las enfermedades, los trastornos o las lesiones de las articulaciones y de los tendones comprende plasma rico en plaquetas heterólogo.

Por consiguiente, en una realización preferida, la invención proporciona una composición farmacéutica administrada por vía oral que comprende plasma rico en plaquetas para su uso en el tratamiento o en la prevención del dolor asociado con la artrosis. Preferentemente, dicha composición farmacéutica comprende plasma rico en plaquetas heterólogo. Más preferentemente, el plasma rico en plaquetas es de origen porcino.

En otra realización, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra por vía oral a una dosis que varía de 0,2 g a 5 g al día.

En otra realización, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se puede administrar por vía oral una o más veces al día durante un año o más tiempo.

En otra realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para la administración oral que comprende entre 1 y 25 % en peso de PRP con respecto al peso total de la composición. Preferentemente, dicha composición farmacéutica comprende entre 1 y 25 % en peso de PRP heterólogo con respecto al peso total de la composición.

En otra realización, la composición farmacéutica para la administración oral, como se describe en el presente documento, comprende además entre 1 y 25 % en peso de un agente formador de volumen y entre 50 y 98 % en peso de al menos un excipiente o vehículo seleccionado del grupo que consiste en agentes aglutinantes, cargas, diluyentes, agentes filmógenos, lubricantes, deslizantes, disgregantes, conservantes, estabilizantes, antioxidantes, recubrimientos, antiadherentes, saborizantes, edulcorantes, colorantes y sus mezclas. Los ejemplos de dichos agentes formadores de volumen incluyen, sin limitación, manitol, sorbitol, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, dextrano, inositol, dulcitol, xilitol, arabitol, trehalosa, arginina, glicina, histidina, dextrano y polietilenglicol. Sin limitación, el excipiente o vehículo puede ser uno o más de los siguientes compuestos: celulosa microcristalina, fosfato tricálcico, lactosa monohidratado, hidroxipropilcelulosa, croscarmelosa de sodio, almidón de sodio, sílice coloidal, Aerosil 200, estearato de magnesio, fructosa, sabor a piña, ascorbato de sodio y sus mezclas.

La composición farmacéutica que comprende plasma rico en plaquetas de la presente invención se puede usar en combinación con otras terapias, compuestos o formulaciones conocidos. Por ejemplo, dicha composición farmacéutica se puede administrar por vía oral en combinación con uno o más otros agentes seleccionados entre antiinflamatorios, antirreumáticos, esteroides, factores estimulantes condrogénicos, monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos (por ejemplo, glucosamina), glucosaminoglucanos (por ejemplo, ácido hialurónico y sulfato de condroitina), proteínas (por ejemplo, colágeno hidrolizado), ácidos grasos esenciales y antioxidantes, bien por separado o en una sola formulación.

La composición farmacéutica que comprende plasma rico en plaquetas para la administración oral de la presente invención puede ser para uso humano o veterinario. Para uso veterinario, la composición farmacéutica como se describe en el presente documento se administra por vía oral como una formulación aceptable adecuada para el uso veterinario.

En otro aspecto, la composición nutricional o el complemento nutricional para la administración oral comprenden plasma rico en plaquetas. Preferentemente, la composición nutricional o el suplemento nutricional administrados por vía oral comprenden PRP heterólogo. Más preferentemente, la composición nutricional o el suplemento nutricional que comprenden plasma rico en plaquetas para la administración oral comprenden plasma rico en plaquetas de origen porcino.

La composición nutricional o el suplemento nutricional que comprenden PRP como se describe en el presente documento, comprenden además factores de crecimiento. Preferentemente, dicha composición nutricional o dicho suplemento nutricional comprenden factores de crecimiento seleccionados del grupo que consiste en factores de crecimiento transformantes (TGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), factores de crecimiento endotelial derivados de plaquetas (PDEGF), factores de angiogénesis derivados de plaquetas (PDAF), factores de plaquetas 4 (PF-4), factores de crecimiento de hepatocitos (HGF) y mezclas de los mismos.

La composición nutricional o el suplemento nutricional administrados por vía oral que comprenden PRP como se describe en el presente documento, comprenden además uno o más aditivos aceptables y vehículos.

Un proceso de preparación de una composición farmacéutica que comprende plasma rico en plaquetas comprende:

- a) centrifugar sangre porcina entera para preparar un sobrenadante de plasma rico en plaquetas;
- b) añadir al sobrenadante de la etapa a) un agente formador de volumen; y
- c) liofilizar la solución sobrenadante de la etapa b).

5 Las realizaciones descritas anteriormente se consideran ilustrativas en todos los aspectos y no restrictivas, estando el alcance de la invención indicado por las reivindicaciones adjuntas, más que por la descripción anterior.

Breve descripción de las figuras

10 Con el fin de ilustrar mejor las ventajas y propiedades de la composición objeto de la invención, se adjuntan varios gráficos e imágenes como ejemplos no limitantes:

La Figura 1 muestra las puntuaciones medias de la escala VAS de las visitas 1, 2 y 3, que corresponden a los días 0, 15 y 30, respectivamente. (Barras de error, IC del 95 %, **p < 0,05).

15 La Figura 2 muestra las puntuaciones medias TOTALES del cuestionario WOMAC de las visitas 1, 2 y 3, que corresponden a los días 0, 15 y 30, respectivamente. (Barras de error, IC del 95 %, **p < 0,05).

La Figura 3 muestra las puntuaciones medias relativas al DOLOR del cuestionario WOMAC de las visitas 1, 2 y 3, que corresponden a los días 0, 15 y 30, respectivamente. (Barras de error, IC del 95 %, **p < 0,05).

20 La Figura 4 muestra las puntuaciones medias relativas a la RIGIDEZ del cuestionario WOMAC de las visitas 1, 2 y 3, que corresponden a los días 0, 15 y 30, respectivamente. (Barras de error, IC del 95 %, **p < 0,05).

La Figura 5 muestra las puntuaciones medias relativas a la DISCAPACIDAD FUNCIONAL del cuestionario WOMAC de las visitas 1, 2 y 3, que corresponden a los días 0, 15 y 30, respectivamente. (Barras de error, IC del 95 %, **p < 0,05).

25 La Figura 6 muestra la evaluación subjetiva de la eficacia de acuerdo con el médico en las visitas 2 y 3 correspondientes a los días 15 y 30, respectivamente.

La Figura 7 muestra la evaluación subjetiva de la eficacia de acuerdo con el paciente. Las visitas 2 y 3 corresponden a los días 15 y 30, respectivamente.

Explicación detallada de la invención

30 Las fuentes heterólogas de plasma rico en plaquetas pueden ser cualquier especie animal de la que sea posible obtener la cantidad necesaria de sangre, pero lo más preferentemente es una fuente porcina. Los animales destinados a la presente invención pueden ser básicamente todos los animales, tanto jóvenes como adultos. Preferentemente, se usa sangre extraída en mataderos, y la sangre procede principalmente de animales adultos.

35 Los ejemplos de animales que son convenientes para su uso en la presente invención son los animales de matanza y otros animales de granja tales como vacas, cerdos, ovejas y cabras. Preferentemente, se usa la sangre entera de ganado o de cerdo.

40 El origen porcino de la sangre, de acuerdo con la presente invención, garantiza: 1) una ausencia total de posible transmisión de agentes virales humanos (hepatitis, VIH, etc.); 2) la producción de factores de crecimiento casi 100 % idénticos a sus homólogos humanos; y 3) una fuente fiable, ampliamente disponible y altamente reproducible de materia prima.

45 Los métodos de preparación de plasma rico en plaquetas ya se han descrito en muchos informes. El plasma rico en plaquetas, preferentemente de origen porcino, se prepara mediante la centrifugación a baja velocidad con el fin de sedimentar y retirar los glóbulos rojos y los glóbulos blancos de la sangre entera. El sobrenadante de plasma rico en plaquetas aislado se disuelve en un agente formador de volumen (por ejemplo, manitol) y después se somete a un proceso de liofilización. La activación de los factores de crecimiento puede ocurrir de una variedad de maneras, por lo general, por una variedad de sustancias conocidas como activadores. Se sabe que el TGF-β1 está presente en

50 gránulos de plaquetas y se libera tras la activación de las plaquetas con CaCl₂. Por el contrario, en la presente invención, no se requieren activadores, ya que la liofilización del PRP causa una tensión mecánica que rompe y libera los factores de crecimiento de plaquetas.

55 Las composiciones de la presente invención dieron lugar a una composición mejorada de plasma rico en plaquetas que contenía factores de crecimiento. En particular, se evaluaron los niveles de TGF-β (especialmente, de la isoforma β1), porque el TGF-β potencia la producción de matriz extracelular para aumentar la actividad de proliferación de los fibroblastos, para estimular la biosíntesis de colágeno de tipo I y fibronectina, y para inducir la deposición de la matriz ósea. Por otra parte, este factor de crecimiento puede inhibir la formación de osteoclastos y la resorción ósea, favoreciendo así la formación de hueso durante la resorción.

60 Como se detalla a continuación en la Tabla 2, los resultados mostraron que los niveles de TGF-β1 en el PRP liofilizado generaron un aumento de 4,1 veces en comparación con el valor basal del PRP (no activado). Por otra parte, no se observaron diferencias al comparar los niveles de TGF-β1 del PRP liofilizado (no activado) con los niveles de TGF-β1 del PRP activado con CaCl₂.

65

Como se ha explicado anteriormente, la administración oral de fármacos es, con mucho, la vía de administración más ampliamente usada. A diferencia de los fármacos de bajo peso molecular convencionales, la administración oral de fármacos biológicos tales como péptidos, proteínas o fármacos macromoleculares, en general, no es factible sin algún tipo de tecnología farmacéutica sofisticada. La razón principal de la baja biodisponibilidad oral de los productos biológicos es la degradación enzimática presistémica y la mala penetración de la membrana intestinal.

Los inventores han encontrado que, sorprendentemente, la composición que comprende plasma rico en plaquetas de la presente invención conserva sus propiedades funcionales cuando se administra por vía oral.

Para evaluar la estabilidad gastrointestinal de la composición que comprende PRP acuerdo con la invención, se midieron los niveles de TGF- β 1 en condiciones gastrointestinales y gástricas (véase la Tabla 1).

Se incubaron muestras de PRP en condiciones gástricas y gastrointestinales como se describe anteriormente por E. Peña *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 52(15), (2004). Para evaluar la estabilidad gástrica, se incubó PRP liofilizado (151 mg/ml) a pH = 2,0 con pepsina porcina (PEP; Sigma Aldrich P-7000, EC 3.4.23.1 a una concentración final de 3,8 U/ml) durante 50 min a 37 °C. Las muestras se neutralizaron adicionalmente usando NaHCO₃ y se incubaron en condiciones intestinales usando pancreatina (PAN; Sigma-Aldrich P-1750 a una concentración final de 9,3 μ g/ml) durante 30 min a 37 °C para evaluar la estabilidad gastrointestinal.

En todos los casos, los tratamientos enzimáticos se detuvieron mediante la colocación de los productos digeridos en un baño de agua con hielo para su enfriamiento.

Se incluyeron muestras de control (sin tratamiento enzimático) (para el control de la estabilidad gástrica: PRP a pH = 2,0 durante 50 minutos; y para el control de la estabilidad gastrointestinal: PRP a pH = 2,0 (50 min) + pH = 7,0 min) (Tabla 1).

Se centrifugaron las muestras a 10.000 xg durante 30 min a 4 °C para obtenerse la fracción soluble de TGF-II. Se analizó el TGF- β 1 mediante ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (TGF- β 1 de ratón/rata/porcino/canino Quantikine; R&D Systems). La Tabla 1 muestra los niveles de TGF- β 1 de las muestras de control (PRP liofilizado sin tratamiento enzimático) y de las muestras en condiciones gástricas (PEP) y en condiciones gastrointestinales (PEP + PAN).

Tabla 1: Niveles de TGF- β 1 (ng/ml)

Muestra de PRP	Niveles de TGF- β 1 (ng/ml)
PRP liofilizado inicial	5,92
control de estabilidad gástrica a pH ~ 2	6,28
control de estabilidad gastrointestinal a pH ~ 2 + pH ~ 7	4,70
PEP en condiciones gástricas (3,8 U/ml)	6,81
PEP en condiciones gastrointestinales (3,8 U/ml) + PAN (9,3 μ g/ml)	6,56

Sorprendentemente, los resultados mostraron que los niveles de TGF- β 1 del PRP liofilizado de acuerdo con la invención eran comparables y que no se vieron afectados por el pH ni por el tratamiento enzimático. Estas observaciones sugirieron que el TGF- β 1 presente en el PRP liofilizado es estable tras el tratamiento gastrointestinal.

Además de la composición, la invención también se refiere al uso de cualquiera de las composiciones farmacéuticas que comprende el PRP de acuerdo con la invención para el tratamiento o la prevención del dolor asociado con enfermedades, trastornos o lesiones de las articulaciones y de los tendones, particularmente, en el tratamiento del dolor asociado con la artrosis. Sorprendentemente, los inventores han encontrado que la administración oral de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención durante 30 días es eficaz en la reducción del dolor en pacientes con artrosis de rodilla. Se observó una mejora en el valor medio de las puntuaciones de la escala VAS y del cuestionario WOMAC a lo largo del estudio. La mayoría de las variables fue significativamente diferente de las puntuaciones basales al final del estudio. Estos resultados fueron confirmados por la evaluación subjetiva tanto del médico como del paciente, que consideraron el tratamiento eficaz durante toda la evaluación. El tratamiento fue bien tolerado y no se observaron acontecimientos adversos.

Las expresiones "administración oral", "administrado/a por vía oral" o "suministro oral", como se usan en el presente documento, incluyen cualquier forma de administración de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención a un sujeto o a un animal, en la que la composición se introduce en la boca del sujeto o animal, independientemente de si la composición se traga o no. Así pues, la "administración oral" incluye bucal y sublingual, así como la administración esofágica.

Todos los porcentajes usados en el presente documento, relativos a los componentes enumerados de las composiciones de acuerdo con la invención son porcentajes en peso, calculados basándose en el peso total de dicha composición a menos que se especifique lo contrario.

- 5 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención y otras composiciones que comprenden PRP. Los ejemplos proporcionados a continuación son ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la invención reivindicada.

10 Ejemplo 1. Preparación del plasma rico en plaquetas (PRP)

10 a) Extracción de sangre

15 Para los fines experimentales, se usaron 24 cerdos blancos grandes destinados al consumo humano. Se extrajo un total de $1.968,20 \pm 322,66$ ml de sangre porcina por sangrado terminal de la vena yugular. La sangre se almacenó en recipientes estériles y se mezcló con citrato de dextrosa en una proporción v/v de 1:9 (1 parte de citrato de dextrosa: 9 partes de sangre). Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta su posterior procesamiento.

b) Recuento de plaquetas

- 20 El análisis de recuento de plaquetas de la sangre y del plasma se realizó usando un SPS ABX Pentra DX 120 (HORIBA Medical). Los datos mostraron un total de $4,18 \pm 1,54 \times 10^{11}$ plaquetas/cerdo (intervalo: de $2,4$ a $8,4 \times 10^{11}$) en la sangre y $1,51 \pm 0,87 \times 10^{11}$ plaquetas/cerdo (intervalo de $0,48$ a $3,35 \times 10^{11}$) en el plasma (recuperación: 36,12 %).

25 c) Procedimiento de obtención de PRP

30 Se centrifugó la sangre porcina estéril extraída a 780 g durante 10 min a temperatura ambiente para retirar los glóbulos rojos y los linfocitos. Se recogió el sobrenadante ($776,96 \pm 184,15$ ml de PRP/cerdo) y como agente formador de volumen se añadió manitol a una concentración final del 8 % (p/v). La solución se agitó durante 15-30 minutos antes de la liofilización.

d) Liofilización del plasma porcino

- 35 Se usó una combinación de 4.700 ml de plasma porcino con manitol en cada proceso de liofilización. Este proceso se llevó a cabo usando un modelo TELSTAR L-3. El plasma porcino se congeló a -56 °C. El proceso de sublimación se realizó a 30-32 °C y, a continuación, se secó el producto a 26-32 °C. El contenido total de sólidos obtenido tras la liofilización (50 % de plasma rico en plaquetas y 50 % de manitol) fue de 3.050,23 g; siendo el 70,48 % de proteína, el 18,81 % de hidratos de carbono, el 0,05 % de ácidos grasos, el 5,80 % de humedad y el 4,86 % cenizas.

40 g) Medición de los factores de crecimiento

- 45 Para cuantificar los niveles de TGF- β 1 del PRP liofilizado, se reconstituyeron las muestras con tampón de fosfato modificado por Dulbecco (PBS) sin calcio ni magnesio (92 mg de PRP/ml de PBS), y luego se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos para eliminar los desechos celulares. El sobrenadante se mantuvo a -80 °C hasta su posterior análisis. El TGF- β 1 se analizó mediante ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (TGF- β 1 de ratón/rata/porcino/canino Quantikine; R&D Systems). Con fines comparativos, se activó el PRP obtenido antes de la liofilización mediante la mezcla de 1 ml de PRP con 50 μ l de CaCl₂ al 10 %. Una vez gelificado el PRP, se centrifugaron las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos a 4.000 g y se recogió el sobrenadante. Se usó una fracción de sobrenadante activado con CaCl₂ para cuantificar el TGF- β 1.

- 50 Se compararon los niveles de TGF- β 1 del PRP liofilizado con los obtenidos para el PRP basal (no activado) y el PRP activado con CaCl₂ (Tabla 2).

Tabla 2: Niveles de TGF- β 1 (ng/ml)

	No activado	Activado con CaCl ₂
PRP	$3,7 \pm 0,6$	$18,3 \pm 4,4$
PRP liofilizado	$15,3 \pm 4,1$	$13,4 \pm 3,9$

- 55 La tensión mecánica producida durante el proceso de liofilización causa la activación y liberación de factores de crecimiento, por lo tanto, no es necesario añadir activadores tales como el CaCl₂ para liberar factores de crecimiento.

60

Ejemplo 2. Composición oral

El PRP obtenido se formuló de acuerdo con la siguiente composición para obtenerse un polvo para su uso en forma de una formulación sólida que se puede suspender en agua.

5

PRP	10,2 %
Fructosa	76,0 %
Manitol	10,2 %
Aroma de piña	2,5 %
Ascorbato de sodio	0,9 %
Aerosil 200	0,15 %

Ejemplo 3. Composición oral en comprimidos

El PRP liofilizado obtenido como se describe en el Ejemplo 1 se formuló de acuerdo con la siguiente composición para obtenerse un comprimido.

10

PRP	25,0 %
Hidroxipropilcelulosa	2,0 %
Almidón de sodio	4,0 %
Sílice coloidal	0,5 %
Lactosa monohidratada	15,0 %
Estearato de magnesio	1,2 %
Celulosa microcristalina	52,3 %

Ejemplo 4. Cápsulas

15 El PRP obtenido como se describe en el Ejemplo 1 se formuló de acuerdo con la siguiente composición para obtenerse una cápsula.

PRP	15,0 %
Manitol	15,0 %
Croscarmelosa de sodio	4,5 %
Sílice coloidal	0,5 %
Celulosa microcristalina	25,0 %
Fosfato tricálcico	40,0 %

20 Ejemplo 5. Evaluación del tratamiento

Se administró la composición descrita en el Ejemplo 2 por vía oral a 8 pacientes con artrosis de rodilla de clase II-III (puntuación ACR). Los pacientes recibieron una dosis diaria durante un mes. Los resultados clínicos relacionados con la función y el dolor de las articulaciones se midieron usando las escalas VAS y WOMAC. Además, se analizó la opinión subjetiva en términos de eficacia y tolerabilidad del médico y del paciente. Todos los resultados clínicos se midieron los días 0, 15 y 30.

25

Se calcularon los datos estadísticos descriptivos, la media, la desviación estándar y el intervalo de confianza del 95 % para todas las variables cuantitativas. Las variables cualitativas se analizaron mediante tablas de contingencia y diagramas de barras.

30

Las diferencias entre los grupos se analizaron por ANOVA para medidas repetidas con la corrección de Bonferroni, adoptando la primera visita como el control de las escalas VAS y WOMAC.

Se observó una disminución estadísticamente significativa de la puntuación del dolor de VAS desde la visita 2 (día 15) en adelante (Figura 1). De igual manera, el índice de WOMAC total (Figura 2), que está relacionado con el empeoramiento de la calidad de vida debido a la artrosis, se reduce significativamente de la visita 2 (día 15) en adelante.

El estudio de los componentes individuales de la escala WOMAC (dolor, rigidez y función) revela una disminución de las puntuaciones del dolor (Figura 3), de la rigidez (Figura 4) y de la incapacidad funcional (Figura 5), siendo significativamente diferentes de las puntuaciones basales en la visita 3, en la visita 2 y de la visita 3 en adelante, respectivamente.

La eficacia subjetiva de acuerdo con el médico fue de poca eficacia de acuerdo con el 62,5 % de los médicos, y de buena o poca eficacia para el 75 % de los pacientes en la visita 2 (día 15). Tras 30 días, el 100 % de los médicos consideró el tratamiento de buena o poca eficacia, y el 66,7 % de los pacientes consideró el tratamiento bueno o ideal (Tabla 3 y 4, Figura 6 y 7).

En la evaluación de la tolerabilidad durante todo el estudio, el 100 % de los médicos y de los pacientes consideró la tolerabilidad excelente. No se registraron acontecimientos adversos (Tabla 5 y 6).

Tabla 3. Eficacia subjetiva de acuerdo con el médico

	Ningún efecto		Poca eficacia		Buena eficacia		N total
	N	% en la visita	N	% en la visita	N	% en la visita	
Visita 2	3	37,5 %	5	62,5 %	0	0,0 %	8
3	0	0,0 %	3	50,0 %	3	50,0 %	6

Tabla 4. Eficacia subjetiva de acuerdo con el paciente

	Ningún efecto		Poca eficacia		Buena eficacia		Eficacia ideal		N total
	N	% en la visita	N	% en la visita	N	% en la visita	N	% en la visita	
Visita 2	2	25,0 %	2	25,0 %	4	50,0 %	0	0,0 %	8
3	0	0,0 %	2	33,3 %	3	50,0 %	1	16,7 %	6

Tabla 5. Evaluación subjetiva de la tolerabilidad de acuerdo con el médico

	Excelente		N total
	N	% en la visita	
Visita 2	8	100 %	8
3	6	100 %	6

Tabla 6. Evaluación subjetiva de la tolerabilidad de acuerdo con el paciente

	Buena eficacia		N total
	N	% en la visita	
Visita 2	8	100 %	8
3	6	100 %	6

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende plasma rico en plaquetas (PRP) obtenido de una fuente heteróloga para su uso en el tratamiento o en la prevención del dolor asociado con enfermedades, trastornos o lesiones de las articulaciones y de los tendones, en la que la composición se administrará por vía oral.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la enfermedad, el trastorno o la lesión de las articulaciones o de los tendones es artrosis.
- 10 3. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que el plasma rico en plaquetas es de origen porcino.
- 15 4. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende además factores de crecimiento, y los factores de crecimiento se seleccionan del grupo que consiste en factor de crecimiento transformante (TGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PDEGF), factor de angiogénesis derivado de plaquetas (PDAF), factor plaquetario 4 (PF-4), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y mezclas de los mismos.
- 20 5. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha composición comprende:
- 25 a) entre el 1 y el 25 % en peso de plasma rico en plaquetas (PRP);
b) entre el 1 y el 25 % en peso de un agente formador de volumen; y
c) entre el 50 y el 98 % en peso de al menos un excipiente o vehículo seleccionado del grupo que consiste en agentes aglutinantes, cargas, diluyentes, agentes filmógenos, lubricantes, deslizantes, disgregantes, conservantes, estabilizantes, antioxidantes, recubrimientos, antiadherentes, saborizantes, edulcorantes, colorantes y mezclas de los mismos.
- 30 6. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha composición está en forma de gránulos, comprimido, suspensión en un vehículo líquido, cápsula o polvo.

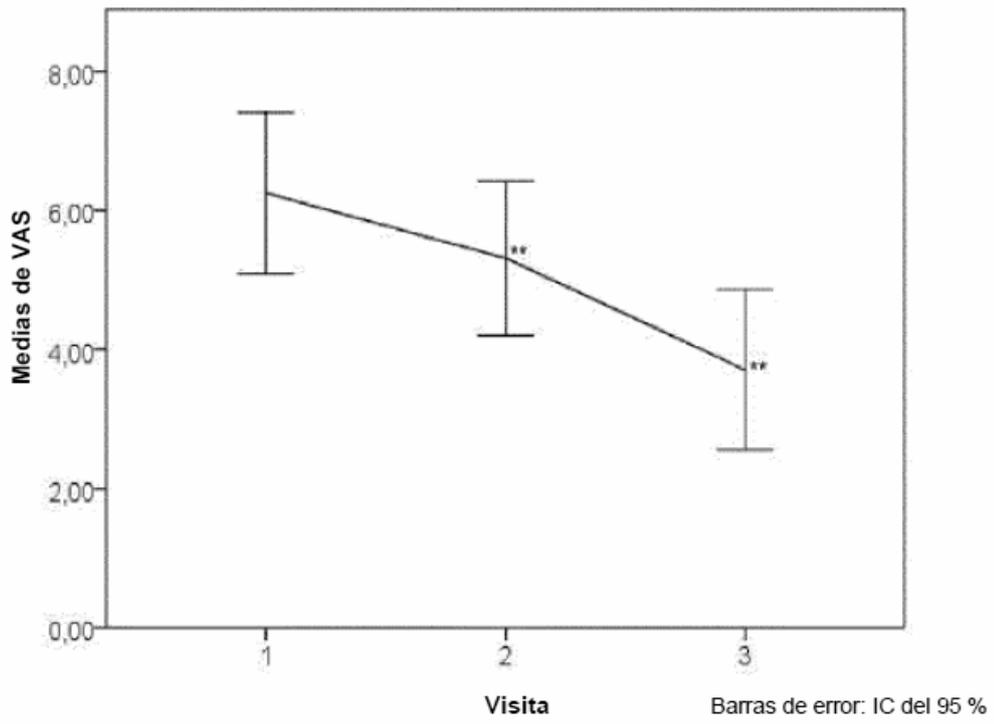


Fig. 1

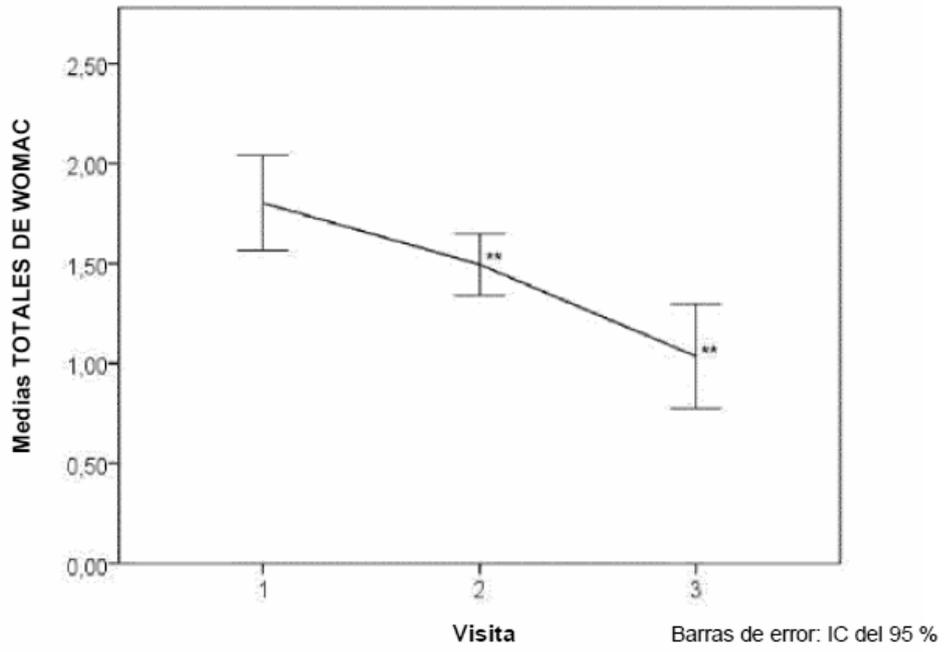


Fig. 2

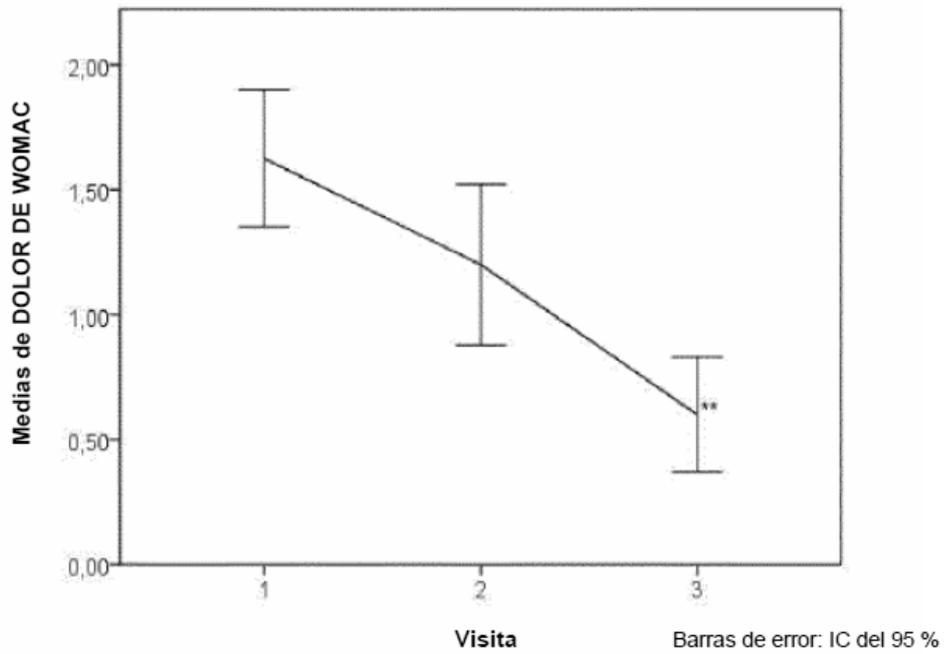


Fig. 3

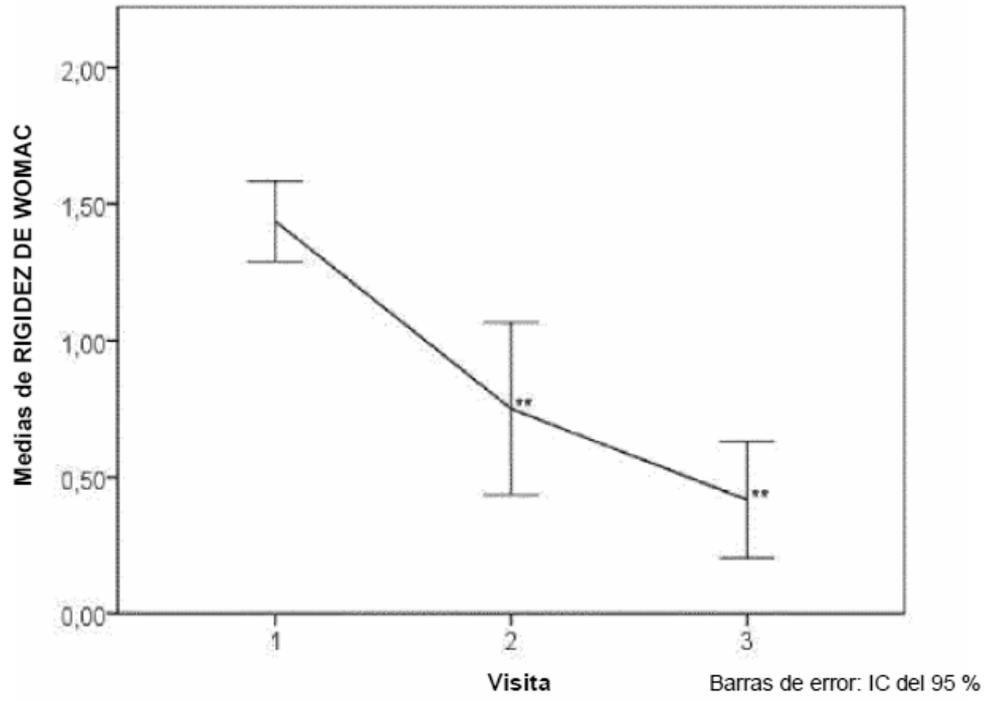


Fig. 4

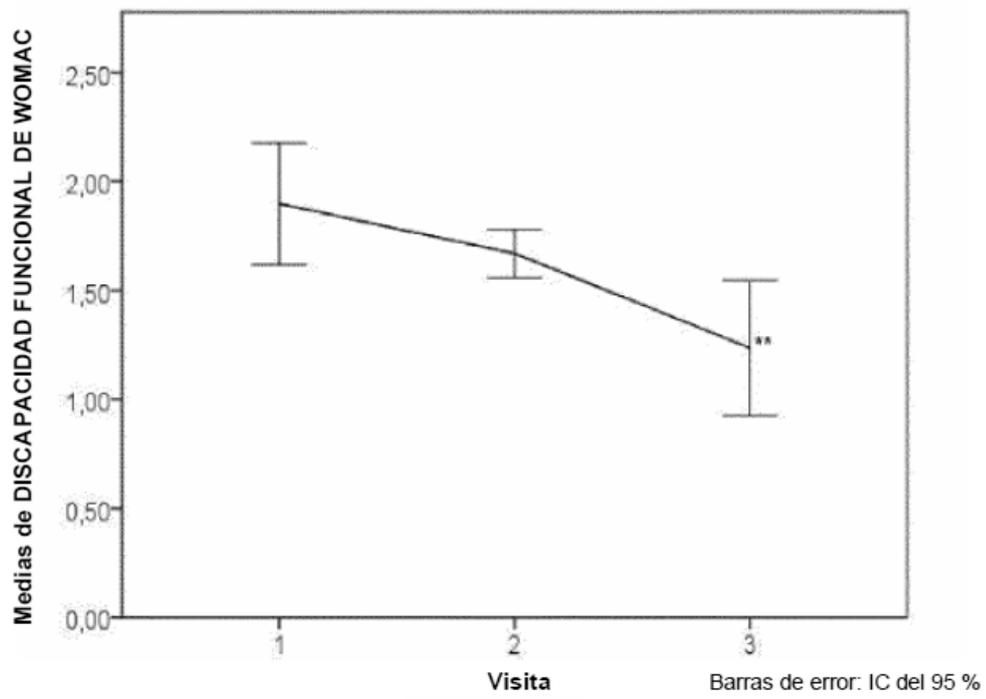


Fig. 5

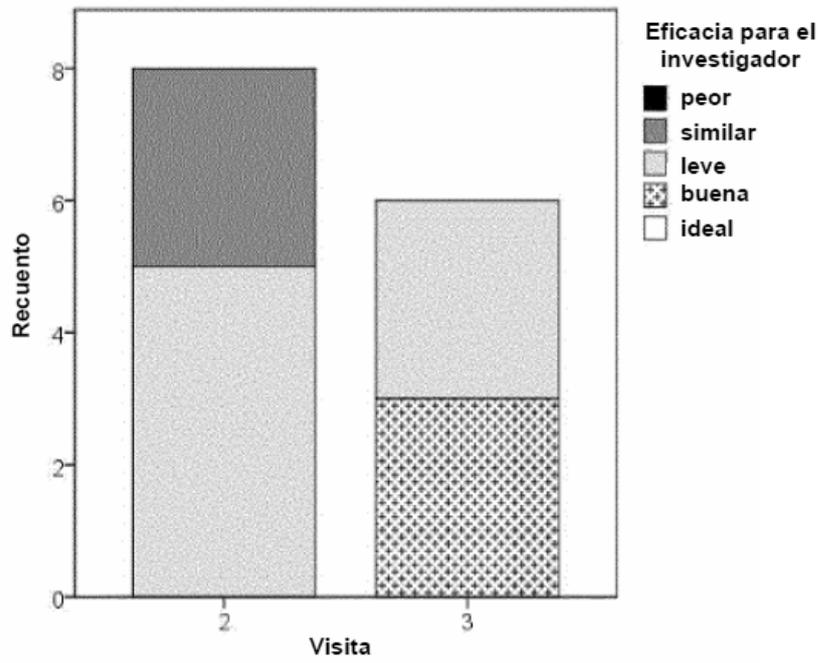


Fig. 6

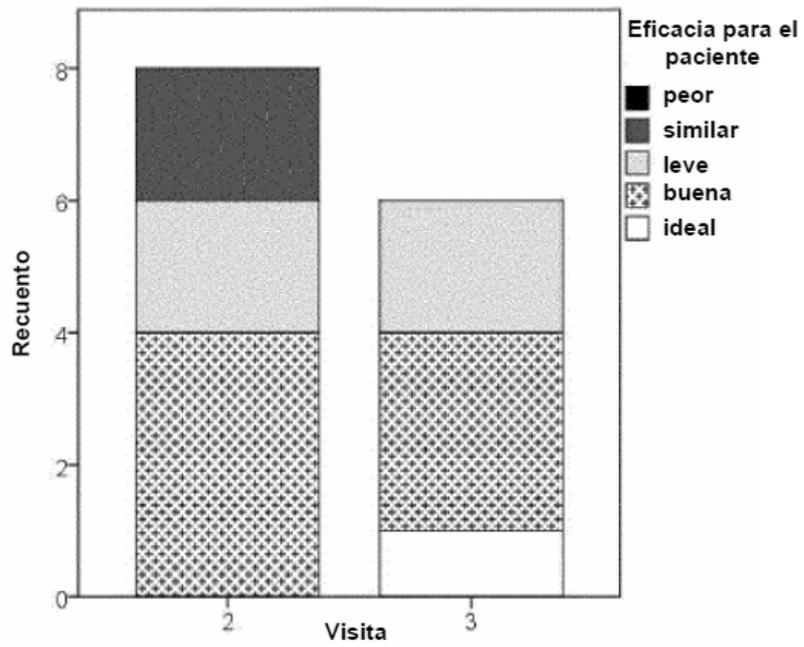


Fig. 7