

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 815**

21 Número de solicitud: 201630355

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 8/18 (2006.01)

A61K 35/16 (2015.01)

A61P 17/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

23.03.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.09.2017

Fecha de concesión:

29.06.2018

45 Fecha de publicación de la concesión:

06.07.2018

73 Titular/es:

**BIOTECHNOLOGY INSTITUTE I MAS D, S.L.
(100.0%)**

**San Antonio 15, 5º
01005 Vitoria (Araba/Álava) ES**

72 Inventor/es:

ANITUA ALDECOA, Eduardo

74 Agente/Representante:

TRIGO PECES, José Ramón

54 Título: **FORMULACIÓN DE APLICACIÓN TÓPICA, RICA EN PLAQUETAS Y/O FACTORES DE CRECIMIENTO Y UN MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LA MISMA**

57 Resumen:

Método de preparación de una formulación de aplicación tópica, rica en plaquetas y factores de crecimiento, en el cual se mezcla un sobrenadante obtenido de un plasma rico en plaquetas proveniente de un sujeto con una composición de proteínas polimerizadas, también obtenida de un plasma rico en plaquetas proveniente del mismo sujeto, obteniéndose una formulación autóloga, con propiedades regeneradoras, y con una consistencia de crema o "sérum" sin la necesidad de añadir aditivos, conservantes, colorantes u otros excipientes.

ES 2 633 815 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

FORMULACIÓN DE APLICACIÓN TÓPICA, RICA EN PLAQUETAS Y/O FACTORES DE CRECIMIENTO Y UN MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LA MISMA

5

DESCRIPCIÓN

Sector de la técnica

10 La invención se refiere a una formulación de aplicación tópica, rica en plaquetas y/o factores de crecimiento, que comprenden una mezcla de un sobrenadante obtenido de un plasma rico en plaquetas proveniente de un sujeto con una composición de proteínas polimerizadas, también obtenida de un plasma rico en plaquetas proveniente del mismo sujeto. La invención también se refiere a un método de preparación de dicha
15 formulación.

Estado de la técnica

20 En el campo de la medicina y odontología se conoce el uso de composiciones preparadas a partir de la sangre, que presentan propiedades regeneradoras de tejidos, como por ejemplo de tejido óseo.

25 En particular, se conoce la preparación de plasma rico en plaquetas (PRP) a partir de la sangre de un paciente. Para la preparación del plasma rico en plaquetas se parte de una cantidad inicial de sangre, que es procesada, generalmente por centrifugación, para separar la sangre en fracciones, entre ellas una fracción de glóbulos rojos y una fracción de plasma rico en plaquetas. Seguidamente, se separa toda o parte de la fracción de plasma y se utiliza dicha parte separada para
30 diferentes aplicaciones médicas.

35 Un ejemplo de plasma rico en plaquetas se conoce como plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). Para la obtención de PRGF, se centrifuga sangre de un paciente por ejemplo a 580g durante 8 minutos, obteniéndose una fracción inferior de glóbulos rojos, una fracción intermedia de glóbulos blancos o capa leucocitaria y una fracción superior

de plasma. Esta fracción superior de plasma presenta un gradiente de concentración de plaquetas a lo largo de toda la fracción, siendo mayor la concentración en la zona inferior de la fracción de plasma, más próxima a la fracción de glóbulos blancos. Seguidamente, se extrae toda o parte de la fracción de plasma y se realiza un procesado posterior. En dependencia de la parte extraída y del procesado, se obtienen diferentes formulaciones o composiciones.

Por ejemplo, puede extraerse al menos el 50% del volumen de plasma adyacente a la capa leucocitaria, que es la parte del plasma significativamente más rica en plaquetas. Entonces, se añade cloruro cálcico (CaCl_2) al plasma extraído, para iniciar la coagulación del plasma y la liberación de factores de crecimiento. En ese momento, se dispone por tanto de una formulación aún líquida rica en factores de crecimiento, que puede ser utilizada inmediatamente para aplicaciones que requieran de un plasma rico en factores de crecimiento de consistencia líquida. Ejemplos de tales aplicaciones son mantener injertos, infiltraciones, humectación de superficies, etc. En aplicaciones de dermatología y medicina estética, esta formulación líquida es infiltrada intradérmicamente para potenciar la capacidad regenerativa de la piel.

En otro ejemplo, se extrae al menos el 50% del volumen de plasma situado inmediatamente encima de la capa leucocitaria y una vez extraído se activa el plasma con cloruro cálcico (CaCl_2), iniciándose la coagulación del plasma y la liberación de factores de crecimiento. En lugar de utilizar inmediatamente el plasma, se espera a un tiempo de al menos 15 minutos. Durante este tiempo, de manera progresiva los iones de calcio activan las plaquetas presentes en el plasma y la trombina plasmática va transformando el fibrinógeno presente en finas hebras de fibrina que van entrelazándose entre sí. Transcurrido dicho periodo se obtiene una matriz tridimensional de fibrina con numerosos dominios de unión a factores de crecimiento, lo cual la convierte en un sistema idóneo de liberación controlada. Los factores de crecimiento que antes estaban en el interior de las plaquetas son de esta forma liberados gradualmente siguiendo una cinética de liberación sostenida, es decir, una cinética gradual por la que en vez de liberarse todos los factores en un mismo momento lo van

haciendo de forma progresiva a lo largo del tiempo. Esta matriz tridimensional o coágulo suele utilizarse, por ejemplo, para el cierre de heridas crónicas como úlceras de tipo venoso.

5 En otro ejemplo aún, se extrae una parte superior de la fracción de plasma, menos rica en plaquetas. Se añade cloruro de calcio (CaCl_2) para iniciar la coagulación del plasma. Se permite que el proceso de coagulación finalice y que, después, el coágulo se retraiga, obteniéndose una membrana tridimensional de fibrina (“tridimensional fibrin membrane”,
10 en inglés) y un líquido que se conoce como sobrenadante. La coagulación y retracción suelen requerir un tiempo aproximado de 45 a 60 minutos. La membrana de fibrina posee unas propiedades biomecánicas más consistentes que el coágulo anteriormente mencionado; en concreto, resiste una mayor fuerza de compresión y mantiene el volumen de forma
15 más permanente y duradera en comparación con el coágulo. Además, la membrana de fibrina puede ser utilizada como soporte o andamiaje biológico con propiedades hemostáticas. Por soporte o andamiaje se entiende una matriz que sirve temporalmente de estructura mientras se va regenerando un tejido. Debido a su facultad para ejercer de soporte, la
20 membrana resulta idónea para algunas aplicaciones médicas tales como realizar suturas quirúrgicas o sellados de defectos biológicos.

 En otro ejemplo, se extrae toda o parte de la fracción de plasma, se añade cloruro de calcio (CaCl_2) y se deja que transcurran
25 aproximadamente 60 minutos para asegurar que se produce la coagulación del plasma y la retracción del coágulo, formándose una membrana de fibrina y un sobrenadante con la particularidad de que la mayoría de factores de crecimiento y proteínas contenidos inicialmente en el coágulo de fibrina han pasado al sobrenadante. Entonces, se separa el
30 sobrenadante para su uso en aplicaciones tales como ensayos de investigación, por ejemplo como suplemento de cultivo para estudios *in vitro* con fibroblastos dérmicos. También se conoce el uso del sobrenadante como colirio.

35 Es decir, como puede observarse, esta versátil tecnología del plasma rico en factores de crecimiento ha evolucionado entorno a

múltiples áreas médicas, siendo muy ventajosa por ser completamente autóloga además de presentar efectos biológicos de utilidad. La capacidad regenerativa del conjunto proteico presente en el plasma rico en factores de crecimiento ha mostrado ser muy efectivo en disciplinas tan diversas como la oftalmología, neurobiología, traumatología y dermatología. Sin embargo, cada rama médica requiere sistemas de aplicación y dosificación particulares. Por esta razón la búsqueda de nuevas formulaciones basadas en el plasma rico en factores de crecimiento es clave para conseguir adaptar y optimizar la aplicación de esta tecnología a cada patología.

Por ejemplo, actualmente, a pesar de la amplia gama de posibilidades técnicas existentes, se considera que no existe una formulación galénica que presente una consistencia de crema que permita aplicar el plasma rico en factores de crecimiento de forma tópica con éxito.

Así, existen en el mercado ciertos compuestos basados en el plasma rico en plaquetas que presentan una consistencia de crema y pueden ser aplicados de forma tópica. Sin embargo, estas formulaciones están basadas en la mezcla del plasma rico en plaquetas (sin activar o activado) con alguna base cremosa comercial y con excipientes de uso tópico habituales. Este hecho hace que la crema no sea autóloga, ya la base cremosa comercial y los excipientes no provienen de la sangre del propio paciente. Además, no se han realizado estudios de biocompatibilidad al respecto y se carece del conocimiento necesario para saber si dichas bases comerciales afectan a la integridad del conjunto proteico aportado por los pacientes. Otra desventaja de estos compuestos cremosos existentes es que, para preparar los mismos, ha de trasladarse la sangre del paciente hasta un laboratorio donde se realiza la mezcla y preparación del compuesto cremoso, y después ha de enviarse el compuesto al paciente. Ello conlleva un coste y un tiempo adicionales para llevar a cabo dichos transportes y un posible almacenamiento temporal del compuesto.

La presente invención tiene como objetivo conseguir una crema

basada en plasma rico en factores de crecimiento, donde dicha crema o su método de preparación solucionen al menos uno de los problemas anteriores.

5 Descripción breve de la invención

Es objeto de la invención una formulación de aplicación tópica, que comprende un sobrenadante obtenido de un plasma rico en plaquetas proveniente de un sujeto, y que comprende además una composición de proteínas polimerizadas obtenida del mismo sujeto. La formulación presente una consistencia de crema más o menos densa, en función de la proporción entre el sobrenadante y la composición de proteínas polimerizadas.

Asimismo, es objeto de la invención un método de preparación de una formulación de aplicación tópica, en el cual se mezcla un sobrenadante obtenido de un plasma rico en plaquetas proveniente de un sujeto con una composición de proteínas polimerizadas, también obtenida de un plasma rico en plaquetas proveniente del mismo sujeto. Así, en el método se dispone inicialmente de una primera cantidad de sangre de un sujeto. Dicha primera cantidad se separa en fracciones por ejemplo por centrifugación, incluyendo dichas fracciones una fracción de glóbulos rojos y una fracción de plasma rico en plaquetas. Entonces, se extrae una cantidad de plasma rico en plaquetas igual a toda o parte de la fracción de plasma rico en plaquetas. La cantidad extraída se calienta a una temperatura entre 60 y 100°C durante al menos 1 minuto, y se enfría posteriormente durante al menos 1 minuto, obteniéndose una composición con proteínas polimerizadas o gelificadas, presentando la composición una consistencia semisólida. Por otra parte, se dispone de una segunda cantidad de sangre del sujeto. Se separa dicha segunda cantidad de sangre en fracciones, por ejemplo por centrifugación, incluyendo dichas fracciones una fracción de glóbulos rojos y una fracción de plasma rico en plaquetas. Se extrae toda o parte de la fracción de plasma rico en plaquetas obtenida de la segunda cantidad de sangre, y se permite la coagulación de dicha cantidad extraída, obteniéndose un coágulo. Entonces, se permite la retracción del coágulo obteniéndose un

sobrenadante. Finalmente, se mezcla o combina el sobrenadante con la composición con proteínas polimerizadas, obteniéndose una formulación autóloga con propiedades regeneradoras, y apta para la aplicación tópica en el sujeto. La formulación puede presentar una consistencia más sólida (crema) o más líquida (suero o "sérum") en función de la proporción de la mezcla de sobrenadante y composición con proteínas polimerizadas.

A diferencia de formulaciones convencionales, la formulación obtenida mediante el método según la invención presenta una textura de tipo crema o de tipo "sérum" que la hace ideal para su extensión cutánea superficial. Por tanto, el método permite conseguir una nueva manera de aplicar los factores de crecimiento autólogos presentes en un plasma rico en plaquetas y/o factores de crecimiento tal como el PRGF, de tal forma que puedan ser absorbidos por la piel sin necesidad de inyectarlos de manera invasiva. Se consigue un nuevo biomaterial que puede ser utilizado en amplias superficies dañadas ya sea por quemaduras u otras afecciones cutáneas.

La formulación obtenida es además ventajosa en que está libre de aditivos, conservantes, colorantes o cualquier otro excipiente. Además, la formulación es cien por cien autóloga, y por tanto constituye un producto totalmente seguro y biocompatible para el sujeto en el cual se va a aplicar. La base cremosa que se utiliza para crear este biomaterial procede de la fracción plasmática del propio sujeto, por lo que no es necesaria la mezcla con ningún tipo de base tópica externa.

Además, el método de preparación de la formulación puede realizarse *in situ*, en el propio centro dermatológico donde el paciente acude para solicitar el tratamiento, siendo el tiempo de preparación relativamente corto (1,5 horas aproximadamente).

Una ventaja adicional de la formulación obtenida es que puede ser dosificada y congelada para su mantenimiento prolongado, sin que su microestructura ni bioactividad se vean comprometidas.

Además, se han detectado altos niveles de factores de crecimiento

en extractos de esta formulación y se ha observado como la bioactividad de fibroblastos dérmicos cultivados con el mismo aumenta significativamente respecto a la ausencia de estimulación, es decir, a no añadir la formulación según la invención. Por bioactividad se entiende la estimulación de la proliferación celular, migración celular, etc.

Descripción breve de las figuras

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

- La Figura 1 muestra una gráfica del contenido en factores de crecimiento de la formulación según la invención, calculado a partir de seis muestras de formulaciones diferentes.
- La Figura 2 muestra gráficas ilustrativas de la cinética de liberación de los factores de crecimiento PDGF-AB, EGF, IGF-I y TGF- β 1 contenidos en la formulación según la invención.
- La Figura 3 muestra una gráfica de la proliferación celular de fibroblastos de piel en un cultivo con una formulación según la invención.
- La Figura 4 muestra una gráfica ilustrativa de la sintetización de ácido hialurónico por parte de fibroblastos humanos de piel a lo largo del tiempo y por acción de la formulación según la invención.
- La Figura 5 muestra una gráfica ilustrativa de la síntesis de colágeno tipo I por parte de fibroblastos humanos de piel, por efecto de la aplicación de la formulación según la invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención tiene como objeto, por una parte, una formulación de aplicación tópica con consistencia de crema más o menos densa, que comprende factores de crecimiento de origen plaquetario liberados y que es completamente autóloga. La formulación está basada en la mezcla de un sobrenadante de plasma sanguíneo y un gel de

5 proteínas de plasma sanguíneo. Tanto el sobrenadante como el gel están preparados de plasma sanguíneo proveniente del mismo sujeto, quien es a su vez el destinatario preferente de dicha formulación tópica. El gel de proteínas comprende proteínas en estado gelificado, tales como albúmina, glicoproteínas, globulinas y/o fibrinógeno.

10 La presente invención tiene también como objeto un método de preparación de una formulación de aplicación tópica, ideal para el tratamiento de problemas o defectos en la piel.

15 De acuerdo con dicho método de preparación, se obtiene sangre de un sujeto o paciente humano o animal. La sangre puede disponerse en uno o más contenedores o tubos. Seguidamente, se separa la sangre en fracciones, entre ellas una fracción de glóbulos rojos y una fracción de plasma rico en plaquetas. La separación en fracciones puede realizarse por ejemplo centrifugando el contenedor o los contenedores a una velocidad de entre 100 y 900 G durante 3 a 12 minutos y a temperatura ambiente o no (es decir, a cualquier temperatura). Dentro de estos rangos y de una forma especialmente ventajosa, el centrifugado se puede realizar a una velocidad de entre 300 y 800 G, durante un tiempo de entre 5 y 9 minutos y a temperatura ambiente. Estos rangos de parámetros de centrifugado permiten obtener una separación más definida de las diferentes fracciones.

25 Una vez separada la sangre en fracciones, se extrae una primera cantidad de plasma rico en plaquetas y una segunda cantidad de plasma rico en plaquetas, del mismo contenedor o de diferentes contenedores (en el caso de haber más de un contenedor). La primera cantidad de plasma rico en plaquetas y la segunda cantidad de plasma rico en plaquetas se extraen a contenedores destinatarios diferentes. Por ejemplo, puede partirse de una cantidad inicial de sangre de entre 63 y 72 ml, y obtenerse de dicha cantidad como mínimo 24 ml de plasma rico en plaquetas, de los cuales se utilizan 15,5 ml como primera cantidad de plasma y los 8.5 ml restantes como segunda cantidad de plasma.

35 Entonces, por un lado, la primera cantidad de plasma se calienta a

una temperatura de entre 60 y 100°C durante al menos 1 minuto. Seguidamente, se enfría la primera cantidad de plasma rico en plaquetas durante al menos 1 minuto, preferentemente a temperatura ambiente (aproximadamente de 20 a 30°C), obteniéndose una composición que
5 incluye proteínas polimerizadas o gelificadas como consecuencia del calentamiento y enfriamiento. En ciertos modos de realización, el calentamiento se realiza más concretamente a una temperatura de 70 a 85°C, con lo que se consigue una polimerización óptima de proteínas plasmáticas, lo que en última instancia repercute en las características
10 biomecánicas del gel proteico para su posterior emulsión o mezclado. Las proteínas polimerizadas o gelificadas pueden incluir albúmina, glicoproteínas, globulinas y/o fibrinógeno. De manera opcional, puede aplicarse un agente activador de plaquetas a la primera cantidad de plasma antes de calentar la misma. En modos de realización preferentes,
15 el agente activador de plaquetas es o comprende cloruro de calcio (por ejemplo cloruro de calcio al 10%). Alternativa o adicionalmente, el agente activador de plaquetas puede ser o comprender trombina humana o animal (por ejemplo bovina), una aplicación de frío y calor, y/o una aplicación de luz ultravioleta. El agente activador de plaquetas provoca
20 que las plaquetas de la primera cantidad de plasma rico en plaquetas liberen factores de crecimiento contenidos en las mismas.

Por otro lado, a la segunda cantidad de plasma rico en plaquetas se le aplica un agente activador de plaquetas. En modos de realización
25 preferentes, el agente activador de plaquetas es o comprende cloruro de calcio (por ejemplo cloruro de calcio al 10%). Alternativa o adicionalmente, el agente activador de plaquetas puede ser o comprender trombina humana o animal (por ejemplo bovina), una aplicación de frío y calor, y/o una aplicación de luz ultravioleta. El agente activador de plaquetas
30 provoca que las plaquetas de la segunda cantidad de plasma rico en plaquetas liberen factores de crecimiento contenidos en las mismas. Entonces, se deja transcurrir un tiempo suficiente para permitir la coagulación de la segunda cantidad de plasma rico en plaquetas, obteniéndose un coágulo. Se permite entonces que se produzca la
35 retracción del coágulo, obteniéndose un líquido o sobrenadante.

Una vez preparados la composición de proteínas polimerizadas y el sobrenadante, se mezclan ambas, obteniéndose una formulación de consistencia cremosa idónea para la aplicación tópica. Preferentemente, la mezcla se realiza en una proporción de 1 parte en volumen de sobrenadante por entre 1 y 4 partes en volumen de composición con proteínas gelificadas, con lo que se consigue un biomaterial tópico de consistencia cremosa variable pudiendo obtener viscosidades más o menos elevadas a fin de que su aplicación sea por ejemplo, mediante extensión tópica o por goteo. En ciertos modos de realización, la mezcla se realiza en una proporción de 1 parte en volumen de sobrenadante por entre 1 y 2 partes en volumen de composición con proteínas gelificadas, con lo que se consigue un biomaterial tópico de consistencia cremosa con una viscosidad idónea para su aplicación tópica mediante extensión superficial. En algunos modos de realización puede efectuarse la mezcla a mano, por ejemplo realizando una mezcla vigorosa a través de un conector de jeringas durante 2 o más minutos. En otros modos de realización, puede utilizarse un mezclador para realizar la mezcla. La mezcla puede realizarse por ejemplo con una fuerza de mezclado de 0,5 a 30 Kg/cm² o de hasta 200 N.

Es decir, en resumen, la invención consiste en obtener por un lado un gel proteico basado en la polimerización de proteínas plasmáticas. Este gel sirve de base autóloga a partir de la cual se prepara la formulación de uso tópica. Por otro lado, se procede a la preparación del sobrenadante rico en factores de crecimiento liberados. Este sobrenadante líquido está libre de plaquetas y fibrina. Lo compone el conjunto de factores de crecimiento y morfógenos bioactivos liberados después de la cascada de coagulación propia del plasma rico en factores de crecimiento. Una vez se dispone del sobrenadante y el gel proteico, se procede a combinar ambos de tal forma que el resultado conforme una masa semisólida capaz de ser aplicable tópicamente y extenderse cubriendo una gran superficie cutánea. Variando la proporción entre el gel proteico y el sobrenadante, se obtiene una formulación más o menos sólida.

Se ha comprobado que la mezcla del sobrenadante con el gel de

proteínas permite lograr una sustancia con la textura óptima para su aplicación tópica. Por otro lado, la formulación es ventajosa ya que ciertas proteínas (por ejemplo la albúmina), presentes en estado gelificado en la formulación, pueden promover la absorción percutánea de los factores de crecimiento presentes en la porción líquida (el sobrenadante), debido a la capacidad que presentan dichas proteínas para promover la absorción de algunos fármacos y para servir de portadoras (“carrier”) de diferentes principios activos. Por tanto, la mezcla del sobrenadante con el gel de proteínas no solamente permite obtener una formulación de consistencia cremosa sino potenciar el efecto biológico de los factores de crecimiento aplicados en la piel.

A continuación se describen algunos ensayos realizados con el fin de caracterizar la formulación tópica y verificar sus propiedades bioactivas. En dichos ensayos se hace referencia al término “sérum”. Dicho término ha de entenderse como un nombre genérico para referirse a la formulación según la invención, y no como una indicación de la textura o grado de solidez de la misma (a no ser que expresamente se describa la textura o densidad del “sérum” o formulación).

20

Ensayo 1

En este primer ensayo, se evaluó el contenido en factores de crecimiento autólogos de la formulación tópica. Para ello, se analizó el contenido de seis formulaciones diferentes procedentes de seis respectivos donantes. Las formulaciones habían sido preparadas previamente a partir de sangre de los pacientes, de la manera siguiente:

A cada paciente se le extrajeron 99 ml de sangre en un número de 11 contenedores (tubos de extracción sanguínea). Cada tubo de extracción sanguínea tiene una capacidad para 9 ml de sangre. Los tubos de sangre se introdujeron en una centrífuga y se centrifugaron a 580 G a temperatura ambiente durante 8 minutos para separar la sangre en fracciones que comprenden una fracción de glóbulos rojos y una fracción de plasma rico en plaquetas. A partir de los 99 ml de sangre centrifugada, se extrajo la columna entera de plasma rico en plaquetas, dividiendo

35

dicha columna en una primera cantidad de 15,5 ml de plasma rico en plaquetas y una segunda cantidad de 8,5 ml de plasma rico en plaquetas. Entonces, se calentó la primera cantidad de plasma rico en plaquetas durante 12 minutos a 79°C, y se dejó enfriar la primera cantidad de plasma rico en plaquetas a temperatura ambiente durante 5 minutos obteniéndose una composición con proteínas polimerizadas. Por otra parte, se aplicó 0.17 ml de cloruro de calcio como agente activador de plaquetas a la segunda cantidad de plasma rico en plaquetas. Se permitió la coagulación de dicha segunda cantidad de plasma rico en plaquetas, obteniéndose un coágulo. Entonces, se permitió la retracción del coágulo durante 1 hora a 37°C obteniéndose un sobrenadante. Se mezcló el sobrenadante con la composición con proteínas polimerizadas, mediante emulsión manual a través de un conector de jeringas durante 2 minutos obteniéndose una formulación de aplicación tópica.

15

Al tratarse de una formulación cuyo principio activo es un extracto puro de las plaquetas, se analizó mediante técnica ELISA el contenido de los siguientes factores de crecimiento clave en procesos de regeneración tisular: factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento insulínico (IGF-I), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF-AB) y factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1). Se centrifugaron las seis formulaciones a 14000 G durante 15 minutos, y se obtuvo un extracto líquido de cada formulación. Se midió el contenido de los factores de crecimiento anteriores en cada uno de los extractos líquidos, obteniéndose los valores medios de concentración indicados de la Figura 1. Los resultados muestran que la formulación tópica ("sérum") de acuerdo con la invención porque posee un alto contenido en dichos factores de crecimiento, ventaja que se suma al hecho ventajoso de que los factores de crecimiento de cada formulación son enteramente autólogos del correspondiente paciente.

30

Ensayo 2

En el segundo ensayo, se realizó un estudio de cinética de liberación de los factores de crecimiento PDGF-AB, EGF, IGF-I y TGF- β 1 a lo largo del tiempo. Para ello, mediante un proceso como el descrito en

35

el Ensayo 1 se obtuvieron tres formulaciones de tres respectivos diferentes. Las tres formulaciones se sumergieron entonces en un medio de extracción durante 7 días. Se fueron tomando muestras a diferentes tiempos, para cuantificar la liberación de los factores de crecimiento
5 anteriormente mencionados. Se tomaron muestras a las 3 horas, 5 horas, 24 horas y 7 días. Una vez obtenidos los diferentes extractos, se cuantificó mediante técnica ELISA el grado de liberación de proteínas bioactivas por parte de la formulación. Como se puede observar en la Figura 2, los factores de crecimiento se liberan de forma gradual hasta
10 alcanzar un pico a las 24h, el cual se mantiene sustancialmente hasta los 7 días.

Ensayo 3

15 Una vez determinado el contenido en factores de crecimiento y la capacidad de liberar gradualmente dichas proteínas, se evaluó el potencial biológico de la formulación sobre diferentes líneas celulares de fibroblastos dérmicos.

20 Primero, se testó la capacidad de la formulación para inducir la proliferación celular. Para ello, mediante un proceso como el descrito en el Ensayo 1 se obtuvieron tres formulaciones de tres respectivos donantes. Seguidamente, se obtuvieron extractos líquidos de dichas formulaciones mediante centrifugación a 14000 G durante 15 minutos.
25 Posteriormente, se aplicó un 20% de dichos extractos en un medio de cultivo celular libre de suplementos y se cultivaron hasta dos líneas de fibroblastos dérmicos. Tras mantener los cultivos celulares durante 72 horas con dicho tratamiento, se realizó un análisis cuantitativo mediante la técnica fluorimétrica Cyquant para cuantificar la cantidad de ADN (y por
30 consiguiente el número de células que habían sido capaces de proliferar en respuesta al tratamiento). Como se observa en la Figura 3, el tratamiento con el extracto de la formulación ("sérum") fue capaz de inducir la proliferación de fibroblastos dérmicos de una manera significativamente superior a aquellas no tratadas (control de no
35 estimulación).

Posteriormente, se analizó la capacidad que tenía la formulación de inducir la actividad biosintética de los cultivos celulares. Más concretamente, se estudió si la formulación era capaz de provocar la síntesis de ácido hialurónico y colágeno tipo I por parte de fibroblastos dérmicos (dos de las proteínas estructurales más importantes del tejido cutáneo). Para ello, mediante un proceso como el descrito en el Ensayo 1 se obtuvieron tres formulaciones de tres respectivos donantes. Entonces, se centrifugaron las formulaciones a 14000 G durante 15 minutos, obteniéndose extractos líquidos de las formulaciones. Se preparó un tratamiento al 20% en medio de cultivo celular y se mantuvieron dos líneas diferentes de fibroblastos dérmicos durante 3 y 7 días. Los medios de cultivo extraídos a ambos tiempos fueron analizados mediante técnica ELISA para cuantificar el grado de síntesis de ácido hialurónico. Como se puede observar en la Figura 4, la formulación ("sérum") es capaz de inducir la síntesis de ácido hialurónico, siendo estos resultados especialmente significativos respecto al control de no estimulación a los 7 días.

Para cuantificar la producción de colágeno tipo 1, utilizó la técnica Western Blot de análisis proteico. Los resultados de la Figura 5 muestran como a los 7 días de tratamiento con la formulación ("sérum"), los fibroblastos dérmicos son capaces de sintetizar nuevo colágeno tipo 1 de una manera significativamente superior a las células cultivadas con el control de no estimulación.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que la formulación obtenida a partir de la sangre del paciente posee un alto contenido en factores de crecimiento que libera de forma sostenida ejerciendo así un claro efecto bioactivo tanto a nivel de proliferación celular como de síntesis de componentes clave de la piel como lo son el ácido hialurónico y el colágeno tipo I.

REIVINDICACIONES

1. Método de preparación de una formulación de aplicación tópica, que se caracteriza por que comprende los pasos de:

5

- a) obtener sangre de un sujeto;
- b) separar la sangre en fracciones que comprenden una fracción de glóbulos rojos y una fracción de plasma rico en plaquetas;
- c) extraer una primera cantidad de plasma rico en plaquetas y una
- 10 segunda cantidad de plasma rico en plaquetas;
- d) calentar la primera cantidad de plasma rico en plaquetas a una temperatura entre 60 y 100°C durante al menos 1 minuto;
- e) enfriar la primera cantidad de plasma rico en plaquetas durante al menos 1 minuto, obteniéndose una composición con
- 15 proteínas polimerizadas;
- f) aplicar al menos un agente activador de plaquetas a la segunda cantidad de plasma rico en plaquetas;
- g) permitir la coagulación de dicha segunda cantidad de plasma rico en plaquetas, obteniéndose un coágulo;
- 20 h) permitir la retracción del coágulo obteniéndose un sobrenadante;
- i) mezclar el sobrenadante con la composición con proteínas polimerizadas, obteniéndose una formulación de aplicación tópica.

25

2. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el agente activador de plaquetas comprende cloruro de calcio.

30

3. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el agente activador de plaquetas comprende al menos uno de trombina, una aplicación de frío y calor, y luz ultravioleta.

35

4. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que comprende el paso de aplicar al menos un agente activador de plaquetas a la primera cantidad de plasma rico en plaquetas después del paso c) y antes del paso d).

5. Método según la reivindicación 4, que se caracteriza por que el agente activador de plaquetas comprende cloruro de calcio.

5 6. Método según la reivindicación 4, que se caracteriza por que el agente activador de plaquetas comprende al menos uno de trombina, una aplicación de frío y calor, y luz ultravioleta.

10 7. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el paso de calentar la primera cantidad de plasma rico en plaquetas comprende calentar a una temperatura de 70 a 85°C.

15 8. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el paso de enfriar la primera cantidad de plasma rico en plaquetas comprende enfriar a temperatura ambiente.

20 9. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el paso de mezclar el sobrenadante con la composición con proteínas polimerizadas se realiza en una proporción de 1 parte en volumen de sobrenadante por entre 1 y 4 partes en volumen de composición.

25 10. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el paso de mezclar el sobrenadante con la composición con proteínas polimerizadas se realiza en una proporción de 1 parte en volumen de sobrenadante por 2 partes en volumen de composición.

30 11. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el paso de mezclar el sobrenadante con la composición con proteínas polimerizadas se realiza con una fuerza de mezclado de 0,5 a 30 Kg/cm².

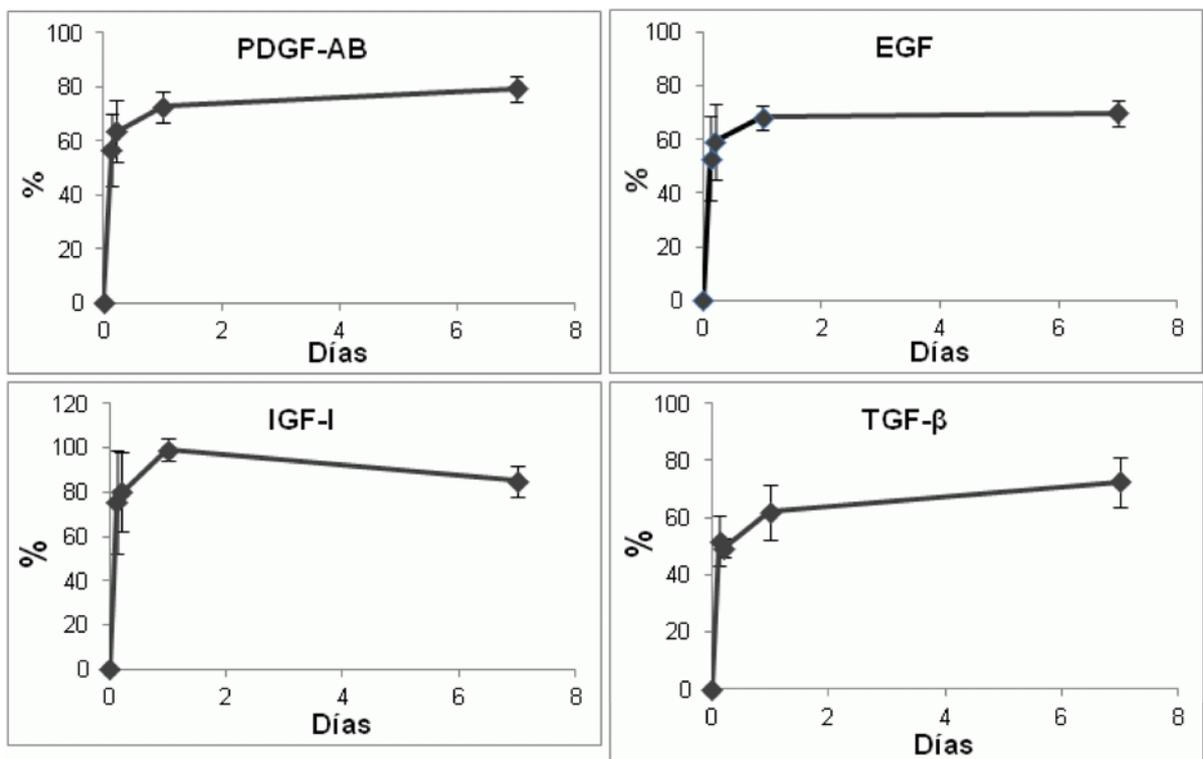
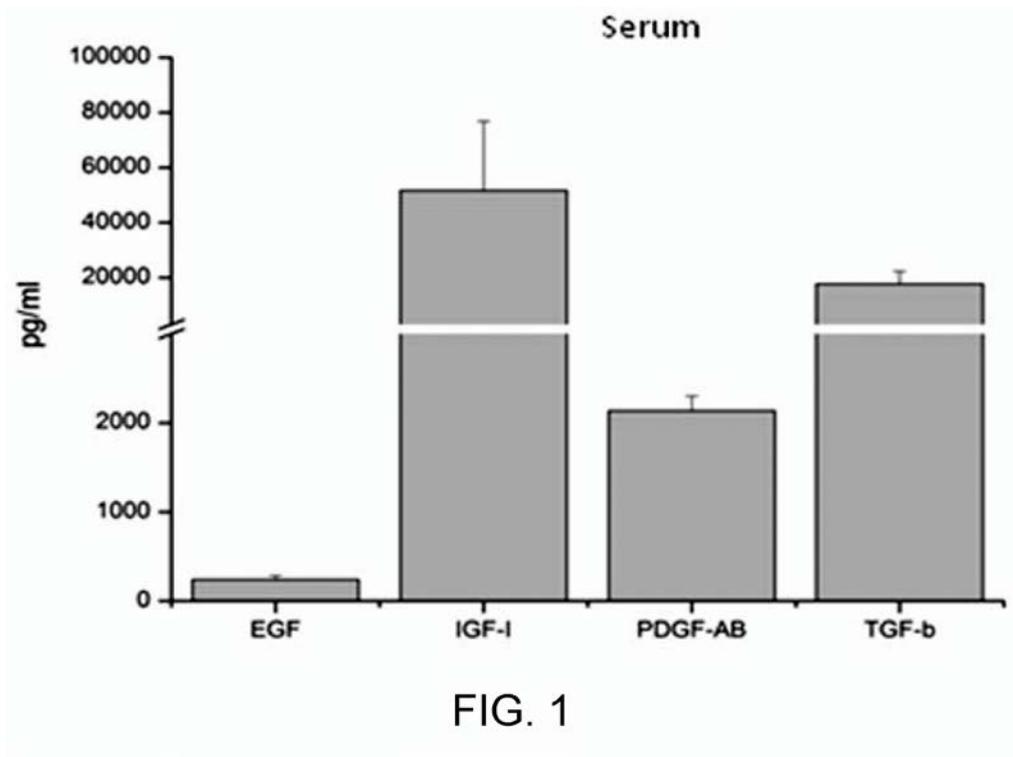
 12. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el paso de mezclar el sobrenadante con la composición con proteínas polimerizadas se realiza con una fuerza de hasta 200 N.

35 13. Formulación de aplicación tópica, que se caracteriza por que comprende una mezcla de un sobrenadante de plasma sanguíneo y un

gel de proteínas de plasma sanguíneo de un mismo sujeto, donde dicho gel de proteínas comprende proteínas en estado gelificado, y donde dicha formulación comprende factores de crecimiento plaquetarios liberados.

5 14. Formulación, según la reivindicación 13, que se caracteriza por que las proteínas comprenden al menos una de albúmina, glicoproteínas, globulinas y fibrinógeno.

10 15. Formulación, según la reivindicación 13, que se caracteriza por que las proteínas se encuentran en estado gelificado por un tratamiento de calentamiento y enfriamiento.



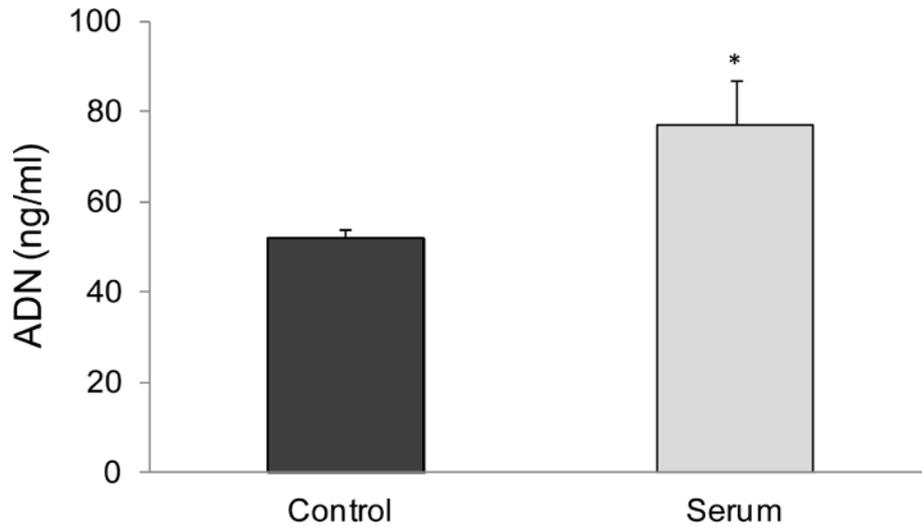


FIG. 3

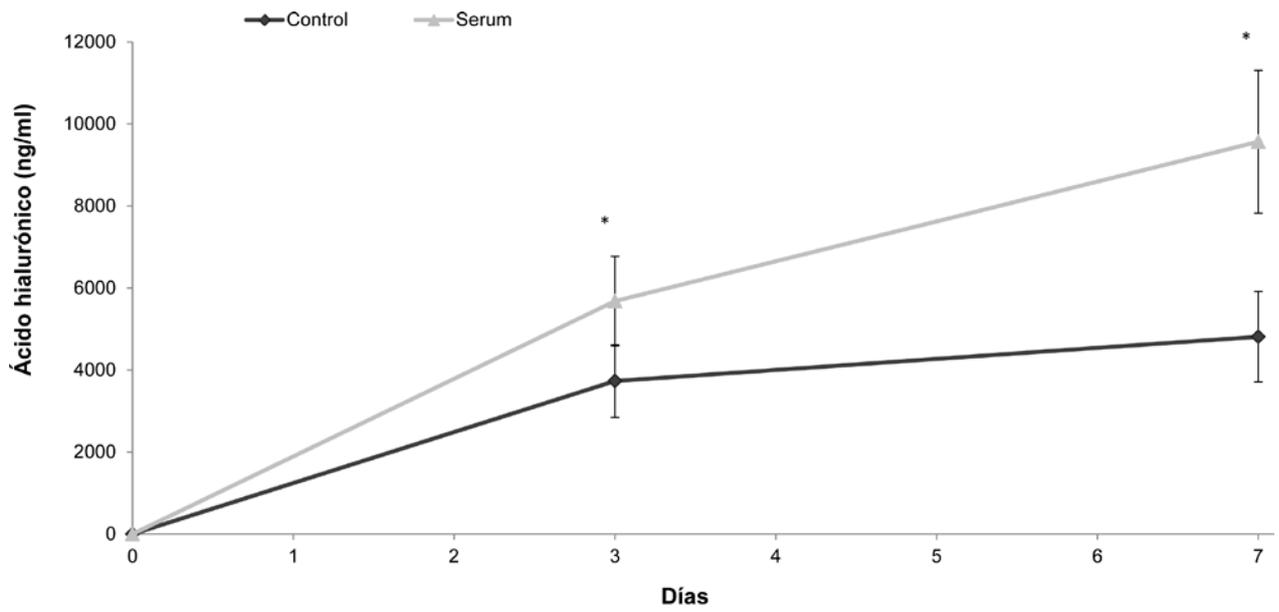


FIG. 4

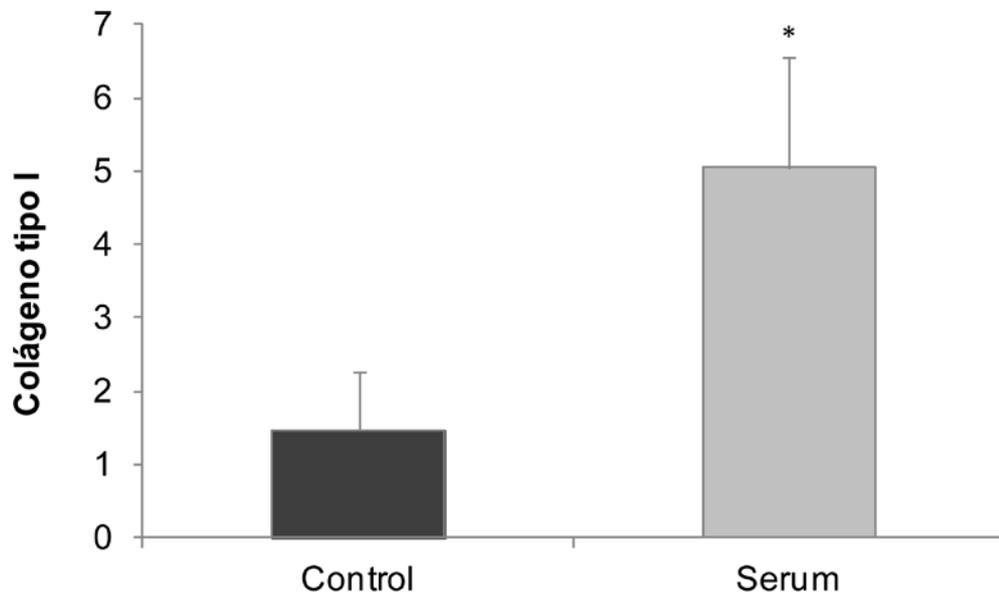


FIG. 5



- ②① N.º solicitud: 201630355
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.03.2016
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2015031465 A1 (COOK GENERAL BIOTECHNOLOGY LLC) 05/03/2015, Reivindicaciones 1, 18-28.	1-15
X	WO 2009087560 A1 (GWO REI BIOMEDICAL TECHNOLOGY et al.) 16/07/2009, Tablas 1-4, reivindicaciones.	1-15
X	WO 2013076507 A2 (CELL THERAPY LTD) 30/05/2013, Reivindicaciones 1, 12.	1-15
X	WO 2005065269 A2 (AM BIOSOLUTIONS et al.) 21/07/2005, página 6, reivindicaciones 1, 21	1-15
A	WO 2010064267 A1 (UNIV PAVIA et al.) 10/06/2010, Resumen, reivindicaciones.	1-15
A	US 5599558 A (GORDINIER RICHARD H et al.) 04/02/1997, Resumen.	1-15
A	WO 2010007502 A2 (FOND IRCCS OSPEDALE MAGGIORE P et al.) 21/01/2010, Resumen.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.10.2016

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K38/18 (2006.01)

A61K8/18 (2006.01)

A61K35/16 (2015.01)

A61P17/00 (2006.01)

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

A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.10.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones 13-15	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-15	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2015031465 A1 (COOK GENERAL BIOTECHNOLOGY LLC)	05.03.2015
D02	WO 2009087560 A1 (GWO REI BIOMEDICAL TECHNOLOGY et al.)	16.07.2009
D03	WO 2013076507 A2 (CELL THERAPY LTD)	30.05.2013
D04	WO 2005065269 A2 (AM BIOSOLUTIONS et al.)	21.07.2005
D05	WO 2010064267 A1 (UNIV PAVIA et al.)	10.06.2010
D06	US 5599558 A (GORDINIER RICHARD H et al.)	04.02.1997
D07	WO 2010007502 A2 (FOND IRCCS OSPEDALE MAGGIORE P et al.)	21.01.2010

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

D01 divulga una composición que comprende una fracción bioactiva de un concentrado de plaquetas derivada de sangre humana, el concentrado de plaquetas conteniendo plaquetas y plasma humanos, donde la fracción bioactiva comprende componentes nativos del concentrado de plaquetas que incluyen fibrinógeno, albúmina, globulina, y al menos uno de factor de crecimiento transformante (TGF) - β 1, factor de factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) -Basic, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) -AA, PDGF-BB, derivado de células del estroma -1 β (SDF), y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El método para preparar la composición bioactiva comprende: añadir un agente de coagulación a un lisado de plaquetas para formar un material coagulado; separar los sólidos cuajados del líquido en el material coagulado; y someter el líquido a filtración. Como agente de coagulación se usa una sal de cloruro de calcio. El lisado de plaquetas se prepara por un proceso que incluye la congelación y descongelación de una composición de concentrado de plaquetas.

D02 divulga la preparación de un concentrado de factores de crecimiento de plaquetas comprendiendo la activación de las plaquetas con cloruro cálcico, la incubación del sobrenadante y la filtración del mismo. Opcionalmente, el sobrenadante puede ser sometido a un tratamiento con solventes y/o detergentes y extracción con aceite. El lisado obtenido contiene factores de crecimiento, fibrinógeno y albúmina.

D03 divulga una composición comprendiendo un lisado de plaquetas, en donde la composición está en forma de gel utilizando polímeros tales como metilcelulosa o ácido plurónico. La composición es útil en la reparación y regeneración de tejidos. El método de producción del lisado de plaquetas comprende someter una población de plaquetas a al menos un ciclo de congelación-descongelación, donde la porción de cada ciclo de congelación se lleva a cabo a una temperatura inferior o igual a -78 °C, obteniéndose la liberación de factores de crecimiento.

D04 divulga una composición comprendiendo lisados de plaquetas ricos en proteínas mezclados o combinados con un vehículo dermatológicamente aceptable para crear una formulación tópica. La formulación puede ser una pomada, crema, loción, aceite o similar, que puede ser colocada en la piel de un ser humano. El soporte puede estar compuesto de aceites naturales, refinados o sintéticos. El vehículo puede ser derivado de un petróleo líquido gelificado mediante la adición de una resina de polietileno, una composición a base de grasas de origen animal, y / o aceites vegetales se pueden utilizar incluyendo manteca de cerdo, aceite de oliva, o aceite de semilla de algodón y similares. El método comprende mezclar la composición de plaquetas con alguno de los ingredientes seleccionados entre la trombina, epinefrina, colágeno, o sales de calcio. Una amplia variedad de citoquinas son liberados por las plaquetas activadas: factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), derivado de plaquetas factor de angiogénesis (PDAF) y derivado de plaquetas factor de crecimiento endotelial celular (PD-ECGF) y el factor de crecimiento tipo insulina (IGF) están entre las citoquinas liberadas por las plaquetas. Estas citoquinas cumplen una serie de diferentes funciones en el proceso de curación, incluyendo ayudar a estimular la división celular en un sitio de lesión. También funcionan como factores quimiotácticos potentes para las células mesenquimales, monocitos y fibroblastos, entre otros.

D05 la presente invención se refiere al uso de lisado de plaquetas como un medicamento y, más específicamente, como medicamento para la terapia y / o profilaxis de la mucositis. Dicho lisado se obtiene mediante un ciclo de congelación/descongelación.

D06 un producto para la administración tópica cicatrización de heridas cutáneas, que comprende un concentrado plaquetario.

D07 divulga la preparación de un lisado de plaquetas a partir de sangre de placenta que comprende la adición de gluconato cálcico, batroxobina, la centrifugación del gel resultante y la filtración del mismo.

Cualquiera de los documentos citados como D01-D03 divulgan formulaciones de aplicación tópica obtenidos a partir de lisados de plaquetas que comprenden factores de crecimiento, albúmina, glicoproteínas, globulinas y fibrinógeno, por lo que las reivindicaciones 13-15 carecerían de novedad tal y como se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga un método con las mismas características al que aparece en las reivindicaciones 1-12, por lo que estas sí que cumplirían el requisito de novedad al que se refiere el art.6 de la ley.

El problema que plantea la solicitud es la provisión de una formulación galénica que presente una consistencia de crema y que permita aplicar un plasma rico en factores de crecimiento plaquetario de forma tópica.

La presente solicitud resuelve este problema divulgando un método que comprende la mezcla de dos lisados de plaquetas: uno obtenido de una primera fracción de plaquetas mediante un ciclo de calentamiento/enfriamiento de las plaquetas, y otro obtenido por coagulación de una segunda fracción de plaquetas con cloruro cálcico, y una formulación de aplicación tópica obtenida por este método.

Sin embargo, la selección y combinación de esas dos formas de obtención de lisados de plaquetas para la obtención de una fracción que contenga factores de crecimiento plaquetario, albúmina, globulinas, fibrinógeno y glicoproteínas es una de las alternativas posibles que el experto en la materia seleccionaría prescindiendo del ejercicio de esfuerzo inventivo alguno, puesto que tanto los procesos de calentamiento/enfriamiento, como la coagulación mediante adición de agentes activadores son métodos rutinariamente utilizados en el estado de la técnica, tal y como se muestra en cualquiera de los documentos referidos como D01-D04.

Así pues, las reivindicaciones 1-15 carecerían de actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986.