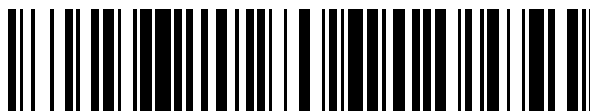


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 561**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2013 PCT/IN2013/000266**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.02.2014 WO14027362**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2013 E 13879335 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2884992**

54 Título: **Procedimiento de preparación de un concentrado de factores de crecimiento derivado de plaquetas humanas**

30 Prioridad:

17.08.2012 IN 2406MU2012

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

27.10.2017

73 Titular/es:

**KASIAK RESEARCH PVT. LTD. (100.0%)
Hoechst House17th FloorNariman Point
Mumbai 400 021 Maharashtra, IN**

72 Inventor/es:

**TOTEY, SATISH MAHADEORAO;
MANIYAR, RACHANA RAJIV;
FONSECA, LYLE CARL;
LAGHATE, SNEHA DEEPAK y
KOSHY, NICOLE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 639 561 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

Procedimiento de preparación de un concentrado de factores de crecimiento derivado de plaquetas humanas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un concentrado de factores de crecimiento derivado de plaquetas humanas. La invención también se refiere al concentrado de factores de crecimiento, una preparación liofilizada del mismo, una composición que comprende el concentrado de factores de crecimiento, un procedimiento de tratamiento de afecciones dermatológicas, ortopédicas, neurológicas y endocrinas, y el uso del concentrado de factores de crecimiento.

Antecedentes de la invención

10 Se sabe que las plaquetas, al activarse, liberan factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, y proteínas de adhesión. Estos factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, y proteínas de adhesión tienen un papel importante en la reducción de la inflamación y el aumento de eventos proliferativos que ayudan al remodelado tisular y regeneración del tejido en caso de lesiones o heridas. Sin embargo, in vivo, las metaloproteinasas de la matriz (MMP), que habitualmente tienen un papel importante en el remplazo proteico durante la formación de tejido, también pueden producir una degradación tisular no específica si está presente una alta concentración de MMP en el sitio de la herida durante una duración prolongada. Esto puede dar como resultado la destrucción 'sin diana' de factores de crecimiento que son esenciales para la cicatrización. Las proteasas presentes en el exudado de la herida y la contaminación bacteriana de la herida degradan adicionalmente los factores de crecimiento y pueden hacer que la cicatrización de la herida sea imposible dando lugar a una herida crónica, sin curación.

20 Con el fin de poner en marcha el proceso de cicatrización, se ha adoptado recientemente el uso de factores de crecimiento sintetizados mediante técnicas recombinantes o derivados de cualquier otra fuente en las prácticas médicas. Una de dichas fuentes se encontró ser las propias plaquetas del paciente. La terapia con plasma rico en plaquetas (PRP) se ha desarrollado y está siendo utilizada habitualmente para distintas indicaciones clínicas, incluyendo las heridas crónicas. El PRP es, por definición, un volumen de la fracción de plasma de sangre autóloga que tiene una concentración de plaquetas superior a la línea basal, o un aumento de la concentración de plaquetas autólogas suspendidas en una pequeña cantidad de plasma tras la centrifugación. Básicamente, se recolecta la sangre del paciente y se centrifuga a distintas velocidades para obtener el PRP. Habitualmente se utilizan dos centrifugaciones para la preparación de PRP. La primera centrifugación, también conocida como centrifugación suave se hace a aproximadamente 245 g a 800 g durante 10 minutos, separa la fracción RBC, la fracción WBC y la fracción de plaquetas en el plasma. La segunda centrifugación, también conocida como centrifugación dura se hace a aproximadamente 1500 g a 3000 g durante 10 minutos, separa las plaquetas del PPP. El material con la gravedad específica más alta, es decir, las plaquetas se asientan en el fondo del tubo, este aglomerado de plaquetas se re-suspende en un pequeño volumen de plasma, generalmente 5 veces menor que el volumen de la sangre total procesada, obteniendo así una suspensión PRP. Inmediatamente antes de la aplicación, se añade un activador/agonista de plaquetas, tal como trombina bovina y/o un 10 % de cloruro cálcico, para activar la cascada de coagulación, produciendo un gel de plaquetas o coágulo. Las plaquetas activadas liberan factores de crecimiento en el plasma. El procedimiento completo tarda aproximadamente 30 a 60 minutos y produce una concentración de plaquetas de tres a ocho veces la del plasma nativo. (Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 1998; 85:638-646; y Petrunaro PS. Using platelet-rich plasma to accelerate soft tissue maturation in esthetic periodontal surgery. Compend. Contin. Educ. Dent. 2001; 22:729-732, 734, 736 passim; quiz 746).

45 El PRP contiene no solo un alto nivel de plaquetas, sino que contiene también el complemento completo de factores de coagulación ya que también comprende plasma. Para que el PRP sea funcional, las plaquetas se tienen que activar por adición de trombina y cloruro cálcico de manera que los contenidos de las plaquetas se liberen mediante la degranulación de los gránulos alfa de las plaquetas que contienen los factores de crecimiento. Sin embargo, habitualmente se utiliza trombina bovina para este fin lo que puede producir reacciones inmunitarias y también conlleva el peligro de la transmisión de virus o enfermedades bovinas a los seres humanos. El uso de trombina humana hace que el producto sea inviable económicamente debido a su alto coste.

50 Además, el uso clínico del PRP para lesiones nerviosas y medicina deportiva ha producido resultados contradictorios en los primeros ensayos. De hecho hay pocos ensayos clínicos controlados que tengan evaluado adecuadamente la seguridad y eficacia de los tratamientos con PRP y estos ensayos en general concluyen que el PRP es una opción de tratamiento 'prometedora' pero no probada para las lesiones de articulaciones, tendones, ligamentos y músculos. La razón de dichos resultados contradictorios y resultados negativos para los estudios clínicos del PRP se asocian con la baja calidad del PRP producido por procedimientos no convencionalizados. Otro problema es que la mayoría de los dispositivos para preparar el PRP no cuentan las plaquetas y producen un PRP con solo un porcentaje fijo de plaquetas que se relaciona directamente con el porcentaje presente en la muestra de sangre original. Por lo tanto, el número actual de plaquetas en el PRP de diferentes pacientes será diferente ya que hay una variabilidad inter-individuo significativa en la concentración de plaquetas del plasma humano. Esta variable puede afectar los

resultados, ya que, por una parte, la concentración mayor de factores de crecimiento ha demostrado tener efectos inhibidores y, por otra parte, el PRP con un número de plaquetas menor puede no mostrar resultados óptimos. Por lo tanto, existe la necesidad de un producto con una concentración fija o convencionalizada de plaquetas o factores de crecimiento que está disponible en el mercado de manera que se puedan administrar a los pacientes dosis fijas de los mismos para el tratamiento de distintas afecciones de enfermedad.

Uno de los inconvenientes principales de los procedimientos que se utilizan actualmente es que el PRP solo se puede utilizar como terapia autóloga y no se puede utilizar como terapia alogénica debido a factores inmunológicos tales como la incompatibilidad ABO en el que el plasma del donante o las membranas celulares de las plaquetas pueden ser inmunogénicas y producir graves eventos adversos en los pacientes. Además, cuando se administra el PRP a un paciente, lo que se inyecta son las plaquetas completas intactas y por lo tanto, las membranas celulares de las plaquetas existentes pueden producir alo-inmunización y reacciones adversas. También, el PRP puede contener RBC hemolizados o intactos que pueden producir reacciones inflamatorias. La proporción de leucocitos sanguíneos, factores de crecimiento y otros productos químicos tales como la trombina presentes en el PRP también pueden afectar a la calidad final del PRP. Otro inconveniente del procedimiento existente de preparación de PRP es que es un procedimiento de extracción sanguíneo para una única dosis y por lo tanto son necesarias múltiples extracciones de sangre en el caso de que se necesiten múltiples dosis. Otro inconveniente más es que el PRP tiene que utilizarse en las cuatro horas del procedimiento y no se puede almacenar debido a que el almacenamiento hace que se formen flóculos y coágulos de fibrina en el plasma.

Otra teoría que respalda el por qué de que el PRP no funcione tan bien como se esperaba es que la concentración de plaquetas en el PRP obtenido por máquinas automáticas es baja para alcanzar el efecto clínico deseado, probablemente porque el 30 a 35 % de las plaquetas se pierden durante el procediendo en máquinas automáticas.

Aunque recientemente se ha desarrollado una nueva sustancia llamado lisado de plaquetas humanas (HPL) que tiene características similares al PRP, no se ha utilizado en aplicaciones clínicas debido a que tiene varios inconvenientes que incluyen número de plaquetas y factores de crecimiento variables. La preparación de HPL consume tiempo ya que conlleva múltiples congelaciones-descongelaciones del PRP para que la activación de las plaquetas libere los factores de crecimiento ya que se libera una pequeña cantidad de factores de crecimiento en cada ciclo de congelación y descongelación. La congelación que produce la activación y la lisis posterior de las membranas celulares de las plaquetas, se hace habitualmente de -20 a -80 °C y puede tardar varias horas. La descongelación se hace habitualmente a 4 °C o a temperatura ambiente. Las múltiples congelaciones-descongelaciones y el almacenamiento a largo plazo producen desnaturalización de los factores de crecimiento y también produce que se forme un coágulo de fibrina al almacenarlo, haciendo al HPL inadecuado para su uso. La mayoría de los factores de crecimiento se quedan atrapados en el coagulo formado, dejando, de esta manera insuficientes factores de crecimiento para las aplicaciones posteriores en el lisado plasmático preparado. Recientemente, se ha identificado una tecnología para retirar la fibrina presente en el plasma, sin embargo, el procedimiento para retirar la fibrina es complicado y consume tiempo y por lo tanto el producto es prohibitivo. También se ha utilizado sangre de animales para fabricar HPL y esto es inadecuado para su uso en seres humanos y puede producir reacciones inmunitarias xenogénicas. También, se utilizó convencionalmente el HPL en medios de cultivo celular y no se utiliza para ninguno de los fines terapéuticos/aplicaciones clínicas. Además, se utilizan a menudo disolventes o detergentes para fabricar los concentrados de plaquetas antes de la lisis, y el uso de dichos disolventes o detergentes también hace que estos procedimientos sean inaceptables para el uso de HPL en inyectables para el tratamiento de seres humanos.

Sumario de la invención

De acuerdo con una realización de la invención se proporciona un procedimiento de preparación de un concentrado de factores de crecimiento administrable por vía intra-dérmica, sub-dérmica, intra-articular o tópica derivado de plaquetas humanas que comprende las siguientes etapas:

- a. suspender las plaquetas humanas en un medio isotónico;
- b. congelar de manera instantánea la suspensión;
- c. descongelar la suspensión congelada; y
- d. esterilizar por filtración la suspensión

en el que, se suspende un número fijo de plaquetas en un volumen fijo del medio isotónico para obtener la concentración necesaria de factores de crecimiento en el concentrado de factores de crecimiento; la congelación instantánea se lleva a cabo a una temperatura de -120 °C a -200 °C; la descongelación se lleva a cabo de 25 °C a 37 °C; y se separan los residuos celulares de la suspensión descongelada y la suspensión de factores de crecimiento resultante se diluye con el medio isotónico antes de esterilizarlo por filtración y opcionalmente liofilizarlo con excipientes después de la esterilización por filtración, a condición de que el medio isotónico de la etapa (a) sea plasma, el volumen de plasma no exceda de 5 ml.

De acuerdo con otra realización de la invención más se proporciona una dosificación de un concentrado de factores de crecimiento que se puede administrar por vía intra-dérmica, intra-articular, o tópica preparado por un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, derivado de aproximadamente 1250×10^6 plaquetas humanas por

5 ml, comprendiendo el concentrado aproximadamente 900 a 2000 pg/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 30 a 300 pg/ml de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), 20 a 100 pg/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF), 40000 a 120000 pg/ml de factor β de crecimiento transformante (TGF- β) y 200000 a 600000 pg/ml de factor AB de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-AB) suspendidos en un medio isotónico, de
 10 aproximadamente 875×10^6 plaquetas humanas por ml, comprendiendo el concentrado aproximadamente 800 a 1200 pg/ml de EGF, 20 a 80 pg/ml de VEGF, 15 a 30 pg/ml de b-FGF, 30000 a 40000 pg/ml de TGF- β y 100000 a 200000 pg/ml de PDGF-AB suspendidos en un medio isotónico; de aproximadamente 625×10^6 de plaquetas humanas, comprendiendo el concentrado aproximadamente 500 a 1000 pg/ml de EGF, 10 a 20 pg/ml de VEGF, 10 a 25 pg/ml de b-FGF, 20000 a 30000 pg/ml de TGF- β y 60000 a 150000 pg/ml de PDGF-AB suspendido en un medio isotónico. Se tiene que entender que la descripción general anterior y la siguiente descripción detallada de las presentes realizaciones de la invención tienen la intención de proporcionar una visión general o estructura para entender el carácter y naturaleza de la invención que es reivindicada. Las representaciones gráficas y pictóricas adjuntas se incluyen para sustanciar la invención y se incorporan y constituyen una parte de la presente memoria descriptiva.

15 **Breve descripción de los dibujos**

La FIG. 1A muestra la relación entre la velocidad de centrifugación y la recuperación media de plaquetas tras la 1ª centrifugación.

La FIG. 1B muestra la relación entre la velocidad de centrifugación y la recuperación media de plaquetas tras la 2ª centrifugación.

20 La FIG. 2 muestra una comparación de las concentraciones de distintos factores de crecimiento obtenidos por el método de la invención cuando el medio isotónico es una solución isotónica de múltiples electrolitos (Ejemplo 2) contra el plasma libre de plaquetas (Ejemplo 1).

La FIG. 3 es una comparación de los niveles de factores de crecimiento que se obtienen por el procedimiento del Ejemplo 1 y 2 respecto al proceso del Ejemplo 3 según se determina por ELISA.

25 La FIG. 4 muestra que los niveles de distintos factores de crecimiento en el GFC se encontraban relacionados linealmente con la concentración de plaquetas de las que se derivaba el GFC.

La FIG. 5 muestra una comparación de las concentraciones de distintos factores de crecimiento obtenidos por el procedimiento de la invención (GFC), con los factores de crecimiento obtenidos de plaquetas activadas con 150 unidades/ml de trombina bovina en un 10 % de cloruro cálcico (PRP).

30 La FIG. 6 muestra una comparación de las concentraciones de distintos factores de crecimiento por ELISA obtenidos por el procedimiento de la invención cuando la temperatura de congelación es de -196°C , en comparación con múltiples congelaciones-descongelaciones a temperaturas de congelación de -80°C y -20°C .

35 La FIG. 7 es una comparación fotográfica de un sujeto de estudio que presenta arrugas nasolabiales reducidas tras tres meses de recibir una inyección intra-dérmica de concentrado de factores de crecimiento derivado de 625×10^6 plaquetas por ml.

La FIG. 8 es una comparación fotográfica de un sujeto de estudio que muestra crecimiento del cabello dos meses después de la finalización del tratamiento con el concentrado de factores de crecimiento, consistiendo el tratamiento de tres inyecciones intra-dérmicas de concentrado de factores de crecimiento de 875×10^6 plaquetas por ml, aplicándose cada inyección posterior con un intervalo de un mes desde la inyección previa.

40 La FIG. 9 es una comparación gráfica puntuación de la evaluación del codo de tenista considerada por el paciente (PRTEE) de un sujeto de estudio que padecía codo de tenista un mes tras la finalización del tratamiento con el concentrado de factores de crecimiento, consistiendo el tratamiento en una inyección intra-articular de concentrado de factores de crecimiento derivado de 1250×10^6 plaquetas por ml.

45 La FIG. 10 es una comparación fotográfica de un sujeto de estudio que muestra una hiperpigmentación periorbital reducida tres meses tras la finalización del tratamiento con el concentrado de factores de crecimiento, consistiendo el tratamiento en una inyección intra-dérmica de concentrado de factores de crecimiento derivado de 1250×10^6 plaquetas por ml.

50 La FIG. 11 es una comparación fotográfica de ratas Wistar que muestran la cicatrización de una lesión por quemadura inducida por cera de parafina caliente 20 días después del tratamiento con concentrado de factores de crecimiento en comparación con el control sin tratar, consistiendo el tratamiento en la aplicación tópica diaria de concentrado de factores de crecimiento derivado de 1250×10^6 plaquetas por ml obtenidas por el procedimiento de los Ejemplos 1 y 2.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Por simplicidad, y con fines ilustrativos, la presente invención se escribe en referencia principalmente a las

realizaciones ejemplares de la misma. En la siguiente descripción, se exponen numerosos detalles específicos con el fin de proporcionar un entendimiento completo de la presente invención. Sin embargo, será evidente para un experto habituado en la técnica que la presente invención se puede practicar sin limitación a estos detalles específicos. En otros casos, no se han descrito en detalle los procedimientos bien conocidos de manera que no oscurezcan innecesariamente la presente invención.

En el contexto de la invención, la expresión "concentrado de factores de crecimiento" o "GFC" como se utiliza en la memoria descriptiva se refiere a una concentración convencionalizada de factores de crecimiento preparadas de acuerdo con una realización de la invención, estando derivados los factores de crecimiento de la crío-estimulación de plaquetas que se han contado, siendo obtenidas las plaquetas de sangre humana. El GFC también contiene citocinas, quimiocinas proteínas de adhesión y otros péptidos moduladores.

También, "solución isotónica de múltiples electrolitos" como se utiliza en la memoria descriptiva en el contexto de la invención comprende cloruro sódico (NaCl); gluconato sódico ($C_6H_{11}NaO_7$); acetato sódico trihidrato, ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$); cloruro potásico (KCl); y 30 mg de cloruro de magnesio ($(MgCl_2 \cdot 6H_2O)$) y seroalbúmina humana. Preferentemente, cada 100 ml de solución isotónica de múltiples electrolitos contiene 526 mg de cloruro sódico, (NaCl); 502 mg de gluconato sódico ($C_6H_{11}NaO_7$); 368 mg of acetato sódico trihidrato, ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$); 37 mg de cloruro potásico, (KCl); y 30 mg of cloruro de magnesio, ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) y un 1 a un 5 % de seroalbúmina humana. El pH se ajusta con hidróxido sódico a 7,4 (o de 6,5 a 8,0), se esterilizó por filtración y se ensayó en cuanto a endotoxinas.

Además, la expresión "plasma libre de plaquetas" como se utiliza en la memoria descriptiva en el contexto de la invención comprende el sobrenadante recolectado del plasma que se ha centrifugado a aproximadamente 17610 g y luego esterilizado por filtración. La expresión "plasma pobre en plaquetas" o "PPP" como se utiliza en la memoria descriptiva en el contexto de la invención comprende el sobrenadante recolectado de la sangre completa que se ha centrifugado a aproximadamente 2720 g.

Se pueden recolectar plaquetas recién recolectadas o sangre reciente de donantes o incluso de bancos de sangre para la fabricación de GFC a gran escala. La sangre se transporta preferentemente al laboratorio de procesamiento central a 20-24 °C en una caja de transporte. La sangre se puede recolectar alternativamente de donantes que necesitan tratamiento con el GFC. La sangre se puede recolectar también de otras especies de mamífero tales como un caballo, pero, gato, búfalo, vaca, oveja, cabra, roedores, etc., de la vena yugular o la vena cefálica o la vena femoral. Una parte de la muestra recolectada se procesa rutinariamente para el recuento de sangre completa (CBC), y ensayo de marcadores de enfermedades infecciosas para el virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1,2), virus de la Hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), ensayos de investigación laboratorial de enfermedades venéreas (VDRL). La parte restante de la sangre recolectada se envía preferentemente a una sala de ambiente limpio clase B para el procesamiento adicional para producir el GFC. La temperatura de la sala limpia se mantiene preferentemente a 22 °C con una humedad relativa del 55 %.

La estabilidad de las plaquetas en sangre completa (en términos de niveles de factores de crecimiento) se comprobó para diferentes temperaturas y puntos de tiempo y se descubrió que las plaquetas en sangre completa eran estables entre 15 a 30 °C hasta 24 horas para el fin de la preparación del GFC, es decir, los niveles de factores de crecimiento medidos utilizando un ELISA tras recuperar las plaquetas a diferentes temperaturas y puntos de tiempo se mantenían estables hasta 24 horas.

De acuerdo con una realización de la invención, la muestra de sangre que se va a utilizar para la obtención del GFC se centrifuga de 109 g a 680 g, preferentemente a aproximadamente 382 g durante 15 minutos a 22 °C para el aislamiento de plaquetas. Tras la centrifugación, se observaban tres capas: una capa superior de plasma rico en plaquetas de color amarillo (PRP), una capa media de corpúsculos de leucocitos (WBC) y la capa inferior de corpúsculos de glóbulos rojos (RBC). La capa superior se aspiró cuidadosamente para maximizar el rendimiento en plaquetas, mientras que se asegura que no se recogen WBC, y se coloca en otro tubo de centrifuga estéril. El plasma rico en plaquetas recolectado se centrifuga entonces de 680 a 3442 g, preferentemente a aproximadamente 2720 g durante 10 minutos. Esto separa el PRP en un aglomerado de plaquetas y un sobrenadante de plasma pobre en plaquetas. Se recolecta el PPP completo en un tubo de centrifuga estéril y se almacena a temperatura ambiente para un uso posterior. Se podrían preparar de esta manera las plaquetas de cualquier concentración deseada que no es posible en otros dispositivos conocidos para obtener PRP. Para el uso autólogo, el aglomerado de plaquetas se re-suspenden en la cantidad apropiada de medio isotónico. Preferentemente, el medio isotónico es plasma libre de plaquetas, plasma pobre en plaquetas, solución isotónica de múltiples electrolitos o combinaciones de los mismos. Para fines alogénicos, el aglomerado de plaquetas concentradas se puede re-suspender en 1 a 10 ml de solución isotónica de múltiples electrolitos o plasma libre de plasma que se ensaya en cuanto a compatibilidad ABO antes de su uso. Las plaquetas se cuentan entonces y se puede añadir medio isotónico adicional de manera que el número de plaquetas se ajustan a un recuento de aproximadamente 250 a 5000 x 10⁶ plaquetas por ml; preferentemente aproximadamente 1250 x 10⁶ plaquetas por ml, aproximadamente 875 x 10⁶ plaquetas por ml o aproximadamente 625 x 10⁶. Esta suspensión de plaquetas se somete entonces a una activación fisiológica por congelación a -196 °C. El tubo de centrifuga que contiene la suspensión de plaquetas concentradas se coloca en nitrógeno líquido durante 120 segundos y luego se somete a una descongelación rápida. La descongelación rápida se hace a 37 °C durante 120 segundos. Solo se suficiente un ciclo de congelación-descongelación para activar

fisiológicamente las plaquetas y producir la lisis de las membranas de las plaquetas. Esta congelación-descongelación crio-estimula las plaquetas para que liberen los factores de crecimiento. La suspensión se puede mezclar entonces con 4 a 15 ml de PPP que se retiró en la etapa anterior o plasma libre de plaquetas o solución isotónica de múltiples electrolitos y se somete a una centrifugación de alta velocidad a una velocidad de 17610 g durante 30 minutos. La última centrifugación es crítica para retirar todas las membranas plasmáticas o antígenos de membrana de las plaquetas o los residuos de manera que se obtiene una solución acelular. Tras la centrifugación de alta velocidad se aspira el sobrenadante y se transfiere a otro tubo estéril. El GFC es susceptible de liofilización tras el mezclado del GFC con 2 a 10 % de manitol, sacarosa y/o glicina que se añaden al GFC como agente de volumen/lioprotector para la liofilización. El producto liofilizado se sella con una tapa de tirar para la aplicación clínica y es estable durante más de un año a 4 °C. El GFC liofilizado se puede reconstituir con 5- 15 ml de solución electrolítica de múltiples electrolitos. También se puede utilizar agua estéril para inyección como diluyente para la reconstitución, con un 1 % de seroalbúmina humana. También se puede utilizar plasma coincidente con el grupo sanguíneo como diluyente.

En una realización de la invención, el aglomerado de plaquetas se suspende en 1 ml de solución isotónica de múltiples electrolitos y después de la congelación-descongelación, la solución descongelada se mezcla entonces con 9 ml del plasma que se había retirado de la capa superior al final de la segunda centrifugación.

En una realización preferida de la invención, la solución isotónica de múltiples electrolitos se suplementa con excipientes farmacéuticamente aceptables. Preferentemente, los aditivos farmacéuticamente aceptables se selecciona de entre un grupo que comprende solución A ácida de Citrato de dextrosa (ACD-A), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), y Fosfato citrato de dextrosa adenina (CPDA).

El GFC preparado en plasma es útil para el tratamiento de afecciones tales como quemaduras y heridas que necesitan las proteínas presentes en el plasma que ayudan a construir un armazón para la cicatrización. El GFC preparado en solución isotónica de múltiples electrolitos solo es útil para el tratamiento alogénico o para el tratamiento de las afecciones que no necesitan proteínas plasmáticas, tales como el tratamiento de la alopecia androgénica.

El GFC preparado en el plasma de acuerdo con el procedimiento de la invención tras el almacenamiento durante 2 meses a -20 °C y descongelado a 37 °C en un baño de agua se mantenía como una solución transparente sin ninguna floculación. El GFC que no se había liofilizado se puede almacenar a o por debajo de -20 °C durante un máximo de 6 meses. El GFC se puede utilizar con fines terapéuticos tal como el tratamiento de afecciones dermatológicas, ortopédicas, neurológicas, y endocrinas incluyendo la alopecia androgénica, pérdida del cabello, hiperpigmentación periorbital, arrugas nasolabiales, arrugas faciales, acné, escaras por acné, heridas crónicas, codo de tenista, úlceras del pie diabéticas, fístulas, lesiones por quemaduras y cambios dermatológicos relativos a la edad no deseados.

El GFC comprende una combinación de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante-beta (TGF-β), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento-1 tipo insulina (IGF-1), factor de crecimiento del hepatocito (HGF), Factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF-AA), (PDGF-AB, (PDGF-BB); citocinas como RANTES, interleucina-1 beta (IL-1β), proteína inhibidora de macrófagos-1 alfa (MIP-1α), GRO-alfa, ENA-78, MCP-3, NCP, IGFBP-3; proteínas básicas tales como el factor 4 de plaquetas (PF-4), Endostatina, PBP, péptido de activación de tejido conjuntivo (CTAP), péptido de activación de neutrófilos (NAP); proteínas adhesivas tales como ECGF, inhibidor del activador de plasminógeno-1, laminina-8, fibrinógeno, fibronectina, trombospondina y agentes antimicrobianos como la trombocidina. Estos factores de crecimiento y otras proteínas tienen propiedades regenerativas y ayudan a iniciar el proceso de cicatrización. El GFC solo o junto con excipientes farmacéuticamente aceptable se formula y administra como anti-envejecimiento, trastornos dermatológicos, pérdida del cabello, heridas crónicas, trastornos ortopédicos, úlceras del pie diabéticas, fístulas, lesiones por quemadura, trastornos endocrinos, trastornos neurológicos, trastornos oftalmológicos, trastornos musculoesqueléticos, etc. El GFC preparado por el procedimiento de la presente invención presenta una alta tendencia a la regeneración o cicatrización rápida de heridas.

El producto GFC se ensayó en cuanto a endotoxina para confirmar que el producto era seguro y libre de contaminación bacteriana. El producto GFC se ensayó también en cuanto a enfermedades infecciosas como VIH, VHC, VHB, sífilis, etc. y se descubrió que estaba libre de enfermedad y seguro para las aplicaciones clínicas.

Se llevaron a cabo estudios clínicos de varias indicaciones tales como la alopecia androgénica, hiperpigmentación periorbital, arrugas nasolabiales y codo de tenista para el GFC preparado con el procedimiento de la presente invención. En los ensayos clínicos que se llevaron a cabo, la administración de GFC daba lugar a una mejora significativa de la regeneración del cabello, disminución de la hiperpigmentación periorbital, reducción de arrugas nasolabiales y aceleración de la recuperación del codo de tenista. En los estudios pre-clínicos en ratas Wistar, la administración de GFC daba lugar a una cicatrización acelerada de las heridas por quemadura en comparación con las ratas no tratadas.

Está en el ámbito de la invención el uso de otros tipos de células humanas, es decir, también distintas de la

plaquetas, para dar lugar al GFC de acuerdo con el procedimiento de la invención. Está también en el ámbito de la invención el uso de otras células de mamífero o placenta para producir el GFC de acuerdo con el procedimiento de la invención.

5 Preferentemente, la congelación inmediata se hace en nitrógeno líquido o helio líquido. La descongelación se puede hacer en un baño de agua a 37 °C. El medio isotónico puede ser una solución isotónica de múltiples electrolitos, plasma, plasma libre de plaquetas, plasma pobre en plaquetas o una combinación de los mismos. La solución isotónica de múltiples electrolitos se puede suplementar con excipientes farmacéuticamente aceptables. Preferentemente, los excipientes incluyen manitol, sacarosa, glicina o combinaciones de los mismos.

10 Preferentemente, los residuos celulares se retiran de la suspensión descongelada centrifugando la suspensión descongelada de 11270 g a 17610 g durante 25 a 35 minutos y aislando el sobrenadante.

Las plaquetas de la etapa (a) del procedimiento se pueden obtener por plaquetoféresis, o por centrifugación de la sangre completa. Las plaquetas de la etapa (a) se obtienen preferentemente mediante:

- 15 a. centrifugar al menos 10 ml de sangre humana anticoagulada de 109 g a 680 g durante 5 a 20 minutos;
 b. aislar la capa más superficial que contiene las plaquetas y centrifugar la misma de 680 g a 3442 g durante 5 a 15 minutos; y
 c. aislar el aglomerado de plaquetas libre de plasma obtenido al final de la etapa (b). Más preferentemente, la centrifugación de la etapa (a) se lleva a cabo a 382 g durante 15 minutos y la centrifugación en la etapa (b) se lleva a cabo a 2720 g durante 10 minutos.

20 De acuerdo con otra realización de la invención, se proporciona un concentrado de factores de crecimiento preparado por un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de afecciones humanas dermatológicas, ortopédicas, neurológicas o endocrinas. Las afecciones pueden incluir la alopecia androgénica, pérdida del cabello, hiperpigmentación periorbital, arrugas nasolabiales, arrugas faciales, acné, escaras de acné, heridas crónicas, lesiones por quemadura, codo de tenista, úlceras del pie diabéticas, fístulas, y cambios dermatológicos relacionados con la edad no deseados.

25 Preferentemente, la hiperpigmentación periorbital, heridas crónicas, lesiones por quemadura, codo de tenista, úlcera del pie diabética y fístulas se tratan con el concentrado de factores de crecimiento derivados de aproximadamente 1250×10^6 plaquetas humanas por ml. Preferentemente, la alopecia androgénica y la pérdida del cabello se tratan con el concentrado de factores de crecimiento derivado de aproximadamente 875×10^6 plaquetas humanas por ml. Preferentemente, las arrugas nasolabiales, arrugas faciales, y cualquier afección dermatológica relacionada con la edad se tratan con el concentrado de factores de crecimiento derivado de aproximadamente 625×10^6 plaquetas humanas por ml.

30 De acuerdo con otra realización de la invención, se proporciona una composición terapéutica para administración tópica, sub-dérmica, intra-articular, o intra-dérmica que comprende el concentrado de factores de crecimiento preparado por un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en combinación con constituyentes suplementarios que incluyen sangre, solución salina, nanopartículas de plata, ácido hialurónico, péptidos inmunomoduladores, factores de crecimiento, hormonas, antibióticos, anticuerpos monoclonales, receptores recombinantes, vehículo o combinaciones de los mismos. La composición puede estar en forma de una crema, gel, solución acuosa, aerosol en pulverizador o parche transdérmico.

40 Con el fin de que los expertos en la técnica sean más capaces de poner en práctica la presente divulgación, se dan los siguientes ejemplos a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplo 1

La sangre humana se extrajo en vacutainers tras obtener el consentimiento informado del paciente. Se recolectaron aproximadamente 50-60 ml de sangre en dos tipos de vacutainers: 50 ml en vacutainers que contenían ACD-A para preparar GFC y 5-10 ml de sangre en tubos con EDTA para el ensayo de marcadores de enfermedades infecciosas y el ensayo de los parámetros de sangre completa. Se tomó un mínimo de 50 ml de sangre para la preparación de 45 10 ml de preparación de GFC. La sangre se transportó de 15 a 30 °C preferentemente a 22 °C a las 4 horas de la extracción. La primera centrifugación se hizo a 382 g durante 15 minutos ya que la recuperación de plaquetas a 382 g durante 15 minutos es óptima con una pérdida de solo un 8-10 % de plaquetas como se muestra en la FIG. 1A. La pérdida de plaquetas es significativamente mayor a velocidades de centrifugación más altas o más bajas. Al terminar la primera centrifugación se formaban tres capas. En el fondo estaban comprimidos los glóbulos rojos, en la media 50 los leucocitos y en la capa superior había plasma que contenía las plaquetas. El plasma que contenía las plaquetas se aspiró y se transfirió a otro tubo estéril. La segunda centrifugación se hizo a 2720 g durante 10 minutos ya que la centrifugación a 2720 g durante 10 minutos daba como resultado la recuperación de plaquetas a casi el 99,5 % como se muestra en la FIG. 1B. La capa superior tenía el plasma y en el fondo estaba un aglomerado de plaquetas comprimidas. El plasma completo (PPP) se retiró y se colocó en un tubo estéril y se almacenó a temperatura ambiente para su uso posterior. El aglomerado de plaquetas se suspendió en 1 ml de PPP. Entonces se hizo el recuento de plaquetas y se señaló que la concentración de plaquetas por ml de plasma era 12500×10^6 . La solución se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido a -196 °C en 2 minutos. La solución congelada se descongeló 55

entonces rápidamente en un baño de agua a 37 °C en dos minutos. Con el fin de convencionalizar la concentración de factores de crecimiento en la solución, la solución descongelada se mezcló entonces con 9 ml de PPP. Esta solución se transfirió entonces a otro tubo estéril y se sometió a una centrifugación a alta velocidad a 17610 g durante 30 minutos. El sobrenadante que contenía los factores de crecimiento se recolectó y se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,22 micrómetros.

Como el volumen final del GFC es de 10 ml, y el número de plaquetas que se utilizaron para preparar el GFC era de 12500×10^6 , la concentración eficaz de plaquetas utilizada para la preparación del GFC es de 1250×10^6 plaquetas por ml. De manera similar, se preparó un volumen final de 5 ml en el que el número de plaquetas que se utilizaron para preparar el GFC era de 6250×10^6 , de manera que la concentración de plaquetas utilizada para preparar el GFC era de 6250×10^6 , de manera que la concentración de plaquetas eficaz que se utilizó para la preparación del GFC era aún de 1250×10^6 plaquetas por ml.

Ejemplo 2

El procedimiento del Ejemplo 1 se siguió excepto en que el aglomerado de plaquetas se suspendió en 1 ml de solución isotónica de múltiples electrolitos y tras la congelación-descongelación, la solución descongelada se mezcló entonces con 9 ml más de solución isotónica de múltiples electrolitos. La FIG. 2 muestra una comparación de las concentraciones de distintos factores de crecimiento obtenidos por el procedimiento del Ejemplo 1 frente al Ejemplo 2 para la sangre obtenida del mismo donante. Los gráficos muestran que los niveles de distintos factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas-AB (PDGF-AB), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor beta de crecimiento transformante (TGF- β) como se determinó por un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) eran casi comparables en el GFC preparado con plasma (Ejemplo 1) como en el GFC que está libre de plasma (Ejemplo 2).

Ejemplo 3

Los procedimientos del Ejemplo 1 y el Ejemplo 2 se siguieron por separado utilizando la sangre obtenida del mismo donante. Además, la suspensión que contenía el GFC se mezcló con un 10 % de manitol. La solución entonces se liofilizó. El producto liofilizado se empaquetó entonces en viales con tapas de tirar para hacerlo un producto "disponible para la venta". La FIG. 3 es una comparación de los niveles de factores de crecimiento obtenidos por el procedimiento de los Ejemplos 1 y 2 respecto al proceso del Ejemplo 3 como se determinó por un ELISA. ES evidente que los niveles de factores de crecimiento son casi los mismos o reducidos marginalmente en el producto de GFC liofilizado en comparación con el GFC preparado mediante el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2.

Ejemplo 4

El procedimiento del Ejemplo 1 se repitió excepto porque se prepararon dos concentraciones de GFC más en las que el número de plaquetas que se contaba y se suspendía en 1 ml de PPP era de 8750×10^6 plaquetas por ml y 6250×10^6 plaquetas por ml de manera que tras mezclar el sobrenadante que contenía GFC con 9 ml más de PPP, la concentración eficaz de plaquetas utilizadas para preparar el GFC era de 875×10^6 plaquetas por ml y 625×10^6 plaquetas por ml respectivamente. Las tres concentraciones de GFC, es decir, GFC derivado de 1250×10^6 plaquetas por ml como por el Ejemplo 1, y el GFC derivado de 875×10^6 plaquetas por ml y 625×10^6 plaquetas por ml como en el Ejemplo 5, se hicieron utilizando sangre del mismo donante. Los factores de crecimiento principales en el GFC se midieron por ELISA. El GFC se ensayó en cuanto a VEGF, b-FGF, PDGF-AB, EGF y TGF- β . La FIG. 4 muestra que los niveles de distintos factores de crecimiento en el GFC resultaban estar relacionados linealmente con la concentración de plaquetas a partir de la que se derivaba el GFC.

Ejemplo 5

El procedimiento del Ejemplo 1 se siguió hasta la etapa de recuento de las plaquetas y se hacía una concentración de 1250×10^6 plaquetas por ml de plasma. Esta concentración de plaquetas se activó entonces utilizando 150 unidades/ml de trombina bovina en un 10 % de cloruro cálcico. Tras diez minutos, se centrifugó el coágulo formado en la solución. El sobrenadante se separó entonces se determinó el nivel de factores de crecimiento en el mismo mediante un ELISA y se comparó con el nivel de factores de crecimiento preparados por el procedimiento del Ejemplo 1 y obtenido de la muestra de sangre del mismo donante. La FIG. 5 muestra una comparación de las concentraciones de distintos factores de crecimiento obtenidos por el procedimiento del Ejemplo 1 respecto al procedimiento del Ejemplo 5. La FIG. 5 muestra que los niveles de VEGF, b-FGF, PDGF-AB, EGF y TGF- β eran mayores o comparables a los del GFC preparado por el procedimiento del Ejemplo 1 en comparación con los niveles de factores de crecimiento obtenidos en el Ejemplo 5.

Ejemplo 6

El procedimiento del Ejemplo 1 se siguió hasta la etapa de recuento de plaquetas y se hacía una concentración de 1250×10^6 plaquetas por ml de plasma. Esta concentración de plaquetas se activó entonces utilizando un ciclo de congelación-descongelación, dos ciclos de congelación-descongelación, y tres ciclos de congelación-descongelación en los que la congelación se hizo a -20 °C, -80 °C y -196 °C seguidos por descongelación a 27 °C una vez, dos

veces y tres veces para cada temperatura. Tras la congelación-descongelación, se siguió con el resto del procedimiento del Ejemplo 1, a saber dilución, centrifugación final, y esterilización por filtración. La FIG. 6 muestra una comparación de las concentraciones de distintos factores de crecimiento por ELISA obtenida en el Ejemplo 6 para un ciclo de congelación-descongelación, dos ciclos de congelación-descongelación y tres ciclos de congelación-descongelación en los que la congelación se hizo a -20 °C, -80 °C y -196 °C. A partir de los resultados, es evidente que un ciclo de congelación-descongelación a -196 °C es suficiente para liberar los factores de crecimiento en comparación con las dos o tres congelaciones-descongelaciones a las temperaturas de la técnica anterior, es decir, -20 °C a -80 °C, que también consumen tiempo y no son adecuadas para los objetivos de producción en los que el tiempo es un factor muy importante. Los resultados mostraban que los niveles de factores de crecimiento aumentaban con el número de ciclos de congelación-descongelación a temperaturas de -20 °C y -80 °C y la temperatura de congelación óptima era -196 °C ya que solo se necesitaba un ciclo de congelación-descongelación para la óptima liberación de factores de crecimiento cuando la congelación se hace a esta temperatura. También, se tiene que señalar que las congelaciones-descongelaciones repetidas no son deseables debido a la desnaturalización de las proteínas cuando se someten a congelaciones-descongelaciones repetidas.

15 **Ejemplo 7**

Se trataron unos cuantos sujetos de estudio con el GFC preparado de acuerdo con el Ejemplo 4 en el que el GFC se preparó a partir de 625 x 10⁶ plaquetas por ml. La FIG. 7 es una comparación fotográfica de la reducción de arrugas nasolabiales de un sujeto de estudio tras tres meses de recibir una inyección intradérmica de GFC derivado de 625 x 10⁶ plaquetas por ml. Es evidente en la figura que la administración de GFC produce una disminución apreciable de la prominencia de las arrugas nasolabiales.

20 **Ejemplo 8**

Unos cuantos sujetos de estudio se trataron con el GFC preparado de acuerdo con el Ejemplo 4 en el que el GFC se preparó a partir de 875 x 10⁶ plaquetas por ml. La FIG. 8 es una comparación fotográfica del crecimiento del cabello a los dos meses tras la finalización del tratamiento con el concentrado de factores de crecimiento, consistiendo el tratamiento en tres inyecciones intradérmicas de concentrado de factores de crecimiento derivado de 875 x 10⁶ plaquetas por ml, siendo administrada cada inyección posterior a un intervalo de un mes de la inyección previa. Es evidente en la figura que la administración del concentrado de factores de crecimiento produce un aumento apreciable del crecimiento del cabello.

25 **Ejemplo 9**

Unos cuantos sujetos de estudio se trataron con el GFC preparado de acuerdo con el Ejemplo 1 en el que el GFC se preparó a partir de 1250 x 10⁶ plaquetas por ml. La FIG. 9 es una comparación gráfica de las puntuaciones PRTEE de un sujeto de estudio que padecía codo de tenista un mes después de la finalización del tratamiento con el concentrado de factores de crecimiento, consistiendo el tratamiento en una(s) inyección(es) intra-articular de concentrado de factores de crecimiento derivado de 1250 x 10⁶ plaquetas por ml. Es evidente en la figura que la administración del concentrado de factores de crecimiento produce una disminución apreciable de la puntuación PRTEE.

30 **Ejemplo 10**

Unos pocos sujetos de estudio se trataron con el GFC preparado de acuerdo con el Ejemplo 1 en el que el GFC se preparó a partir de 1250 x 10⁶ plaquetas por ml. La FIG. 10 es una comparación fotográfica de la reducción de la hiperpigmentación de un sujeto de estudio tres meses tras la finalización del tratamiento con concentrado de factores de crecimiento, consistiendo el tratamiento en una inyección intra-dérmica de GFC derivado de 1250 x 10⁶ plaquetas por ml. Es evidente en la figura que la administración de GFC produce una disminución apreciable de la hiperpigmentación periorbital alrededor de los ojos.

35 **Ejemplo 11**

Se trataron ratas Wistar con lesiones por quemaduras inducidas por cera de parafina caliente con el GFC derivado de 1250 x 10⁶ plaquetas por ml preparado por el proceso de los Ejemplos 1 y 2. El tratamiento consistía en la aplicación diaria tópica de GFC. La FIG. 11 es una comparación fotográfica de las observaciones el día 20 tras el tratamiento con GFC. Se observaba cicatrización de las lesiones por quemadura el día 20 en las ratas tratadas con GFC preparado en los Ejemplos 1 y 2, al contrario que las ratas no tratadas.

50 Como es evidente a partir de los resultados anteriores, el GFC de la presente invención se derivó de un número predeterminado de plaquetas dando lugar a cantidades proporcionales de factores de crecimiento que a su vez sirven para proporcionar resultados clínicos uniformes. Las dosificaciones fijas de GFC se pueden administrar a los pacientes para tratar distintas afecciones dermatológicas, ortopédicas, neurológicas y endocrinas, incluyendo la alopecia androgénica, pérdida del cabello, hiperpigmentación periorbital, arrugas nasolabiales, arrugas faciales, acné, escaras de acné, heridas crónicas, codo de tenista, úlceras del pie diabéticas, fístulas, lesiones por quemaduras, y cambios dermatológicos relacionados con la edad no deseados. Además, se pierden menos del 10 % de las plaquetas en el procedimiento de la invención. También, las plaquetas se activan fisiológicamente sin la

incorporación de ningún material adicional o sustancia química, como el cloruro cálcico o la trombina bovina, y por lo tanto son seguros. También, la única congelación-descongelación hace que el procedimiento consuma menos tiempo y sea más adecuado para la producción a gran escala, y los factores de crecimiento no están desnaturalizados como en el caso de las múltiples congelaciones-descongelaciones.. Además, algunas indicaciones clínicas necesitan una gran cantidad de factores de crecimiento pero algunas indicaciones necesitan muy pocos factores de crecimiento ya que la presencia de receptores de factores de crecimiento varía de un tipo celular a otro y de una indicación a otra. Por lo tanto, la presente invención proporciona GFC que tienen concentraciones convencionalizadas que se pueden diluir según la necesidad para hacerlo adecuado para las indicaciones clínicas específicas. Otro beneficio del presente procedimiento es que se pueden preparar múltiples dosis de GFC a partir de una única extracción de sangre, y por lo tanto este procedimiento es barato y no consume tiempo. Además, el GFC no muestra ninguna floculación al almacenarlo a largo plazo de hasta seis meses a -20 °C. A veces se ve un pequeño flóculo que generalmente se disuelve en 2-3 minutos a temperatura ambiente y por lo tanto es posible utilizar el GFC como un producto "listo para la venta" que se puede almacenar hasta durante seis meses sin ningún problema de pérdida de potencia. También, como el GFC es acelular y carente de membranas plasmáticas u otros materiales antigénicos, no provoca reacciones inmunitarias ni formación de alo-anticuerpos. El GFC se puede producir opcionalmente libre de plasma de manera que se puede utilizar como un agente terapéutico sin ningún problema de plasma incompatible ABO que pueda producir reacciones inmunitarias. De manera alternativa, si los contenidos del plasma servirán como un almacén beneficioso para aplicaciones como la cicatrización de heridas, entonces se puede preparar también el GFC en plasma coincidente en ABO. El GFC también es susceptible a la liofilización de manera que el GFC se puede almacenar a temperatura ambiente o en un refrigerador a 4 °C sin ninguna degradación durante más de un año. Además, el GFC liofilizado se puede hacer en una crema, gel, solución acuosa, aerosol en pulverizador o parche transdérmico. En definitiva, el GFC es un producto natural, es decir, no recombinante y el procedimiento proporcionado por la presente invención para la producción de GFC es económico. Además, el GFC muestra resultados clínicos mejores debido a su significativamente alto nivel de factores de crecimiento en el GFC en comparación con el HPL de múltiples congelaciones-descongelaciones preparado por los procedimientos conocidos. El GFC también sirve para una terapia personalizada para pacientes que necesitan que se les administren concentraciones específicas de GFC ya que el GFC se puede preparar en cualquier concentración que se desee.

30

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de un concentrado de factores de crecimiento derivado de plaquetas humanas que se pueden administrar por vía intra-dérmica, intra-articular, sub-dérmica o tópica que comprende las siguientes etapas:

- 5 a. suspender plaquetas humanas en un medio isotónico;
 b. congelar instantáneamente la suspensión;
 c. descongelar la suspensión congelada; y
 d. esterilizar por filtración la suspensión

10 en el que se suspenden un número fijo de plaquetas en un volumen fijo del medio isotónico para obtener la concentración necesaria de factores de crecimiento en el concentrado de factores de crecimiento; la congelación instantánea se lleva a cabo a una temperatura de -120 °C a -200 °C; la descongelación se lleva a cabo de 25 °C a 37 °C; y los residuos celulares se separan de la suspensión descongelada y la suspensión de factores de crecimiento resultante se diluye con el medio isotónico antes de la esterilización por filtración y opcionalmente se liofiliza con excipientes después de la esterilización por filtración, a condición de que el medio isotónico de la etapa (a) sea plasma, el volumen de plasma no exceda de 5 ml.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que, la congelación se hace en nitrógeno líquido o helio líquido.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que, la descongelación se hace en un baño de agua estéril a 37 °C.

20 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que, el medio isotónico es una solución isotónica de múltiples electrolitos, plasma, plasma libre de plaquetas, plasma pobre en plaquetas o una combinación de los mismos.

5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 en el que, la solución isotónica de múltiples electrolitos se suplementa con excipientes farmacéuticamente aceptables.

25 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que, los residuos celulares se retiran de la suspensión descongelada centrifugando la suspensión descongelada de 11270 g a 17610 g durante 25 a 35 minutos y aislar el sobrenadante.

7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que, los excipientes incluyen manitol, sacarosa, glicina o combinaciones de los mismos.

30 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que, las plaquetas de la etapa (a) se obtienen por plaquetoféresis, o por centrifugación de la sangre completa.

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que, las plaquetas de la etapa (a) se obtienen por:

- 35 a. centrifugar al menos 10 ml de sangre humana con anticoagulante de 109 a 680 g durante 5 a 20 minutos;
 b. aislar la capa más superficial que contiene las plaquetas y centrifugar la misma de 680 g a 3442 g durante 5 a 15 minutos; y
 c. aislar el aglomerado libre de plasma de plaquetas obtenidas al final de la etapa (b).

10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 en el que, la centrifugación de la etapa (a) se lleva a cabo a 382 g durante 5 minutos y la centrifugación de la etapa (b) se lleva a cabo a 2720 g durante 10 minutos.

40 11. Una dosificación de concentrado de factores de crecimiento administrable por vía intra-dérmica, intra-articular, sub-dérmica o tópica preparado por un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, derivado de aproximadamente 1250 x 10⁶ plaquetas humanas por ml, comprendiendo el concentrado aproximadamente 900 a 2000 pg/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 30 a 300 pg/ml de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), 20 a 100 pg/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF), 40000 a 120000 pg/ml de factor β de crecimiento transformante (TGF-β) y 200000 a 600000 pg/ml de factor de crecimiento derivado de plaquetas AB (PDGF-AB) suspendidos en un medio isotónico, de aproximadamente 875 x 10⁶ plaquetas humanas por ml, comprendiendo el concentrado aproximadamente 800 a 1200 pg/ml de EGF, 20 a 80 pg/ml de VEGF, 15 a 30 pg/ml de b-FGF, 30000 a 40000 pg/ml de TGF-β y 100000 a 200000 pg/ml de PDGF-AB suspendidos en un medio isotónico; de aproximadamente 625 x 10⁶ de plaquetas humanas, comprendiendo el concentrado aproximadamente 500 a 1000 pg/ml de EGF, 10 a 20 pg/ml de VEGF, 10 a 25 pg/ml de b-FGF, 20000 a 30000 pg/ml de TGF-β y 60000 a 150000 pg/ml de PDGF-AB suspendido en un medio isotónico.

50 12. Una composición terapéutica que comprende el concentrado de factores de crecimiento administrable por vía tópica, intra-articular, sub-dérmica, o intradérmica preparado por el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de afecciones dermatológicas, ortopédicas, neurológicas y endocrinas, en el que se incluyen afecciones tales como alopecia androgénica, pérdida del cabello, hiperpigmentación periorbital, arrugas

nasolabiales, arrugas faciales, acné, escaras de acné, heridas crónicas, lesiones por quemaduras, codo de tenista, úlceras del pie diabéticas, fístulas, y cambios dermatológicos relacionados con la edad no deseados.

- 5 13. Una composición terapéutica que comprende el concentrado de factores de crecimiento administrable por vía tópica, intra-articular, sub-dérmica o intradérmica preparado por el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el concentrado de factores de crecimiento está en combinación con constituyentes suplementarios que incluyen la sangre, solución salina, nanopartículas de plata, ácido hialurónico, péptidos inmunomoduladores, factores de crecimiento, hormonas, antibióticos, anticuerpos monoclonales, receptores recombinantes, vehículos o combinaciones de los mismos.

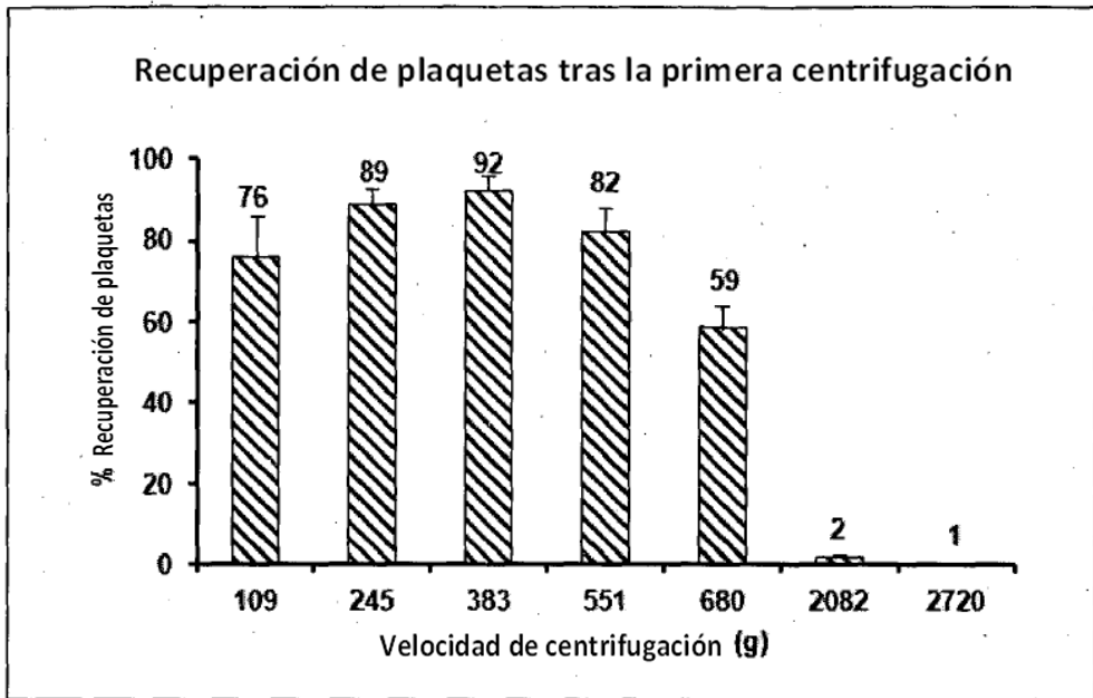


Fig 1A

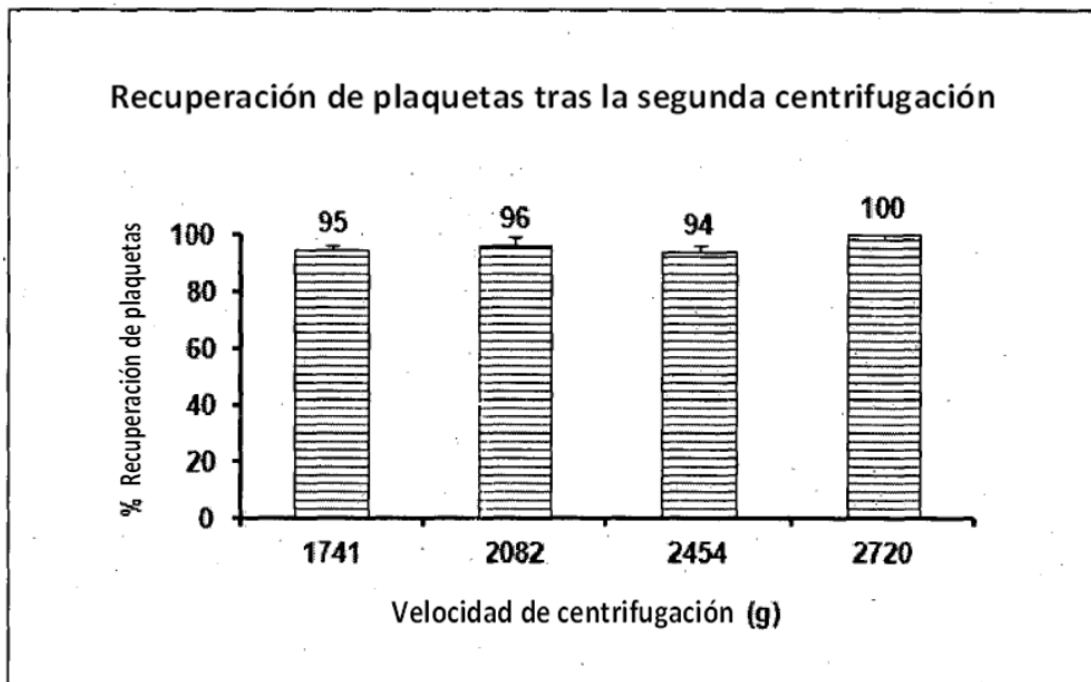


Fig 1B

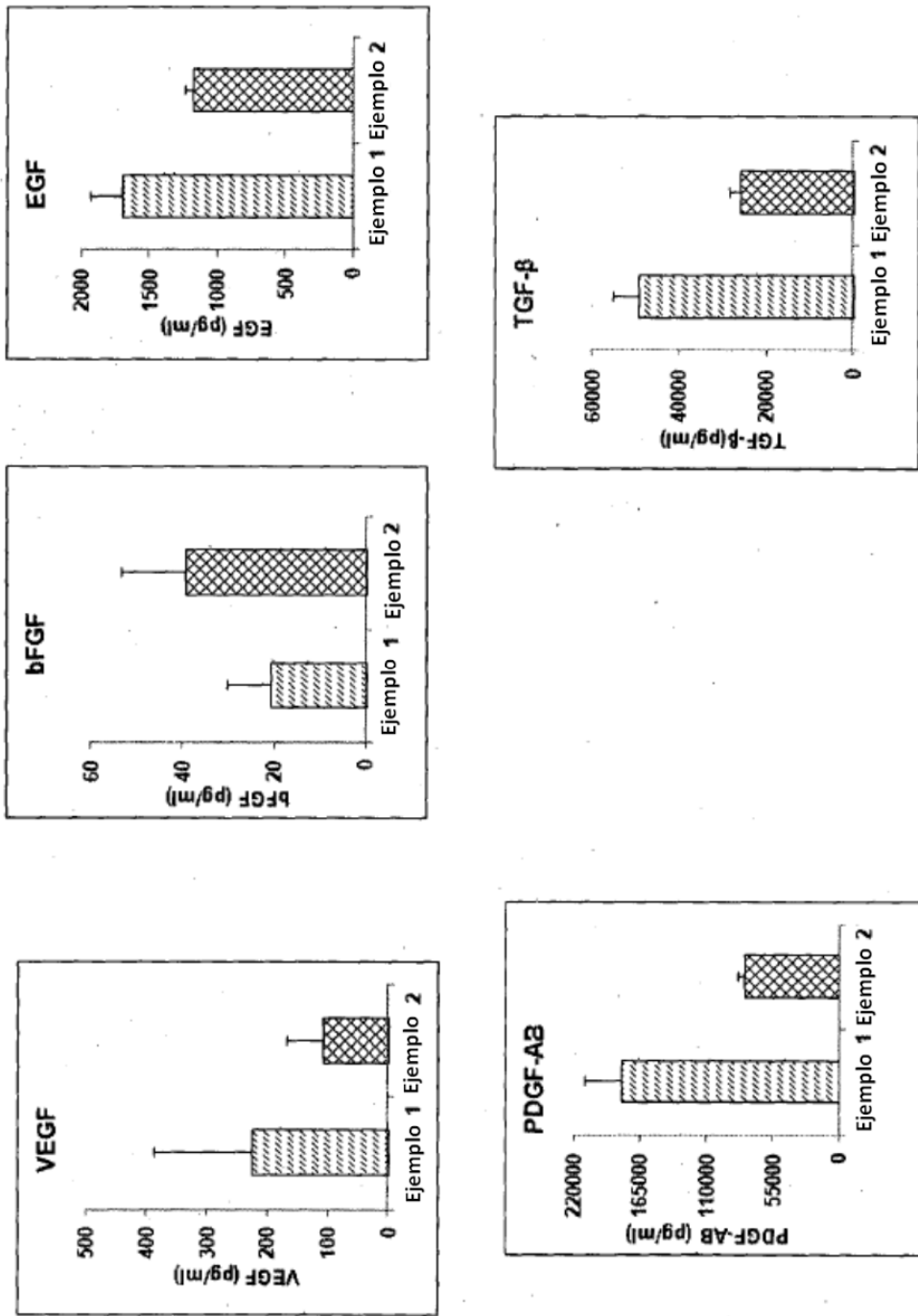


Fig 2

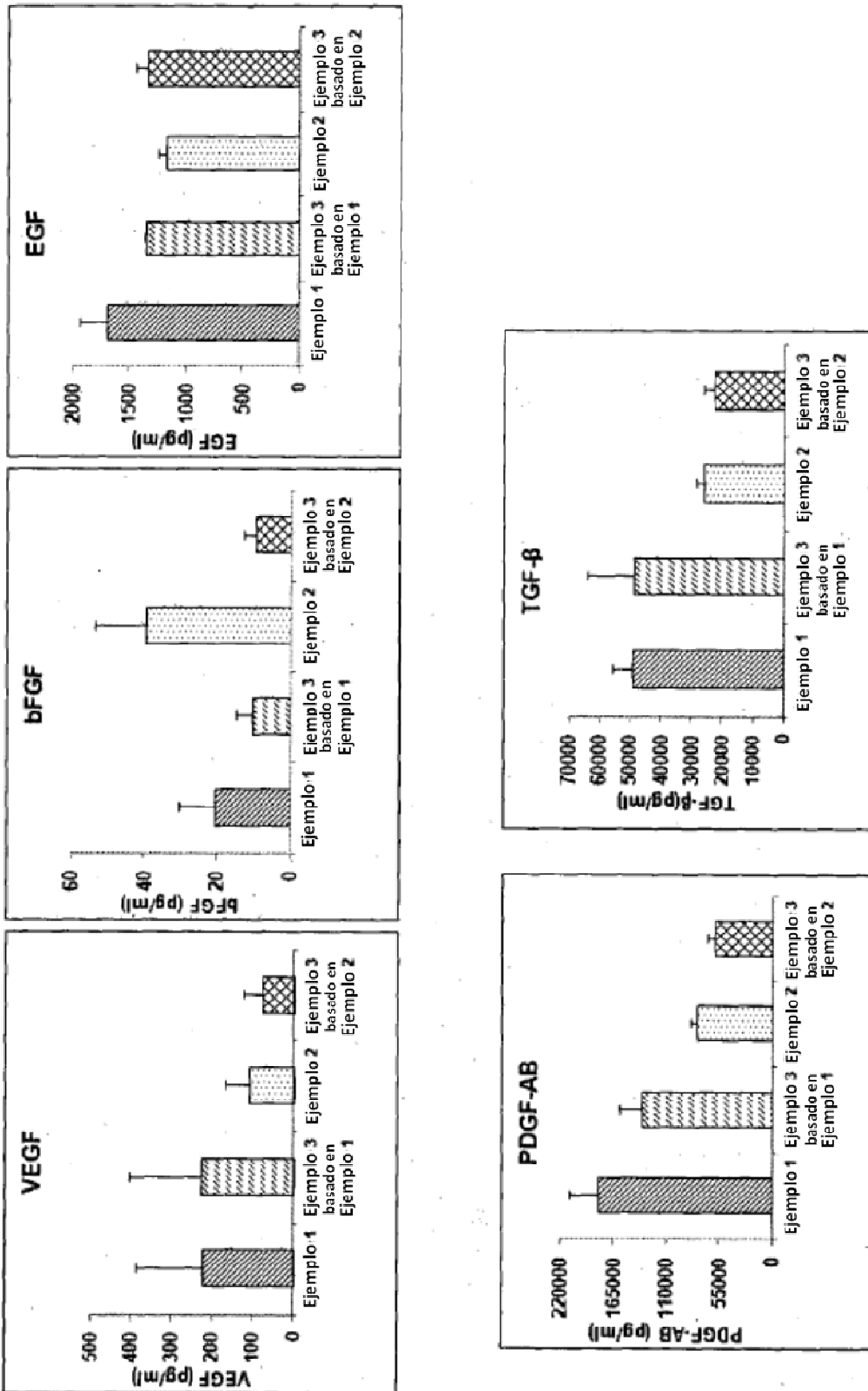


Fig 3

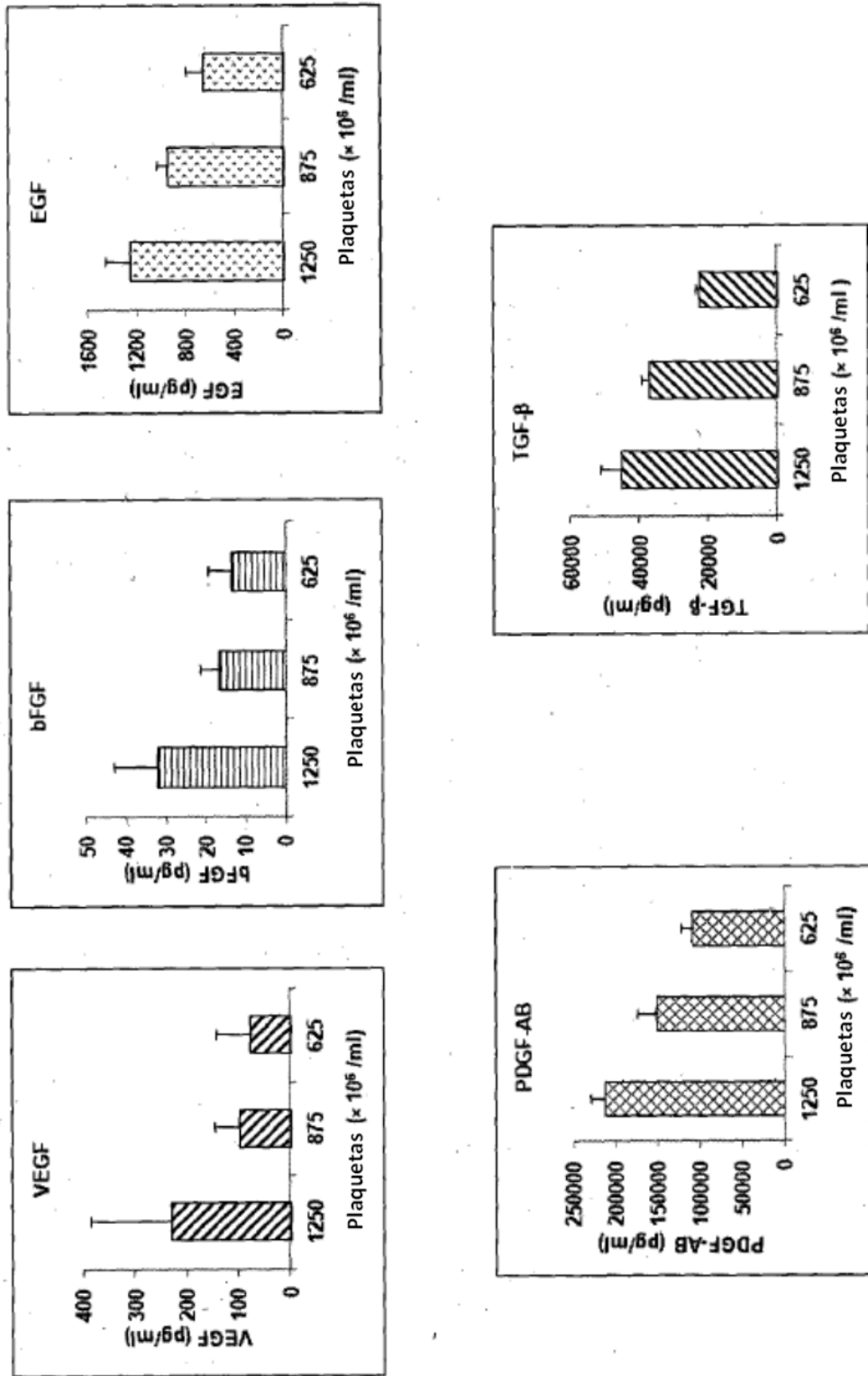


Fig 4

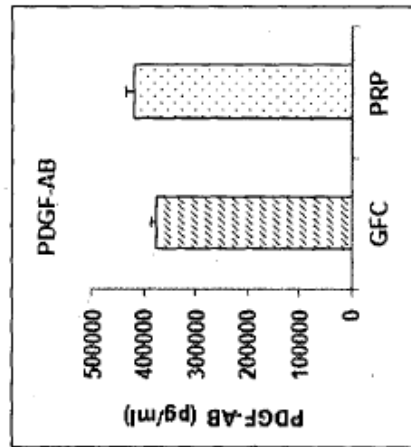
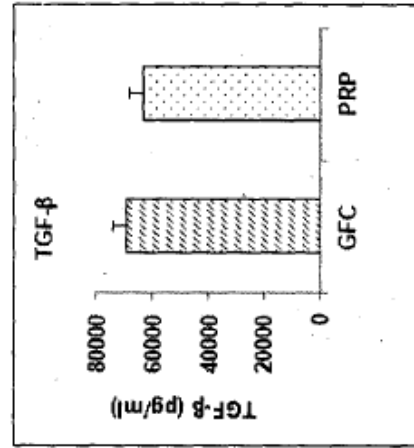
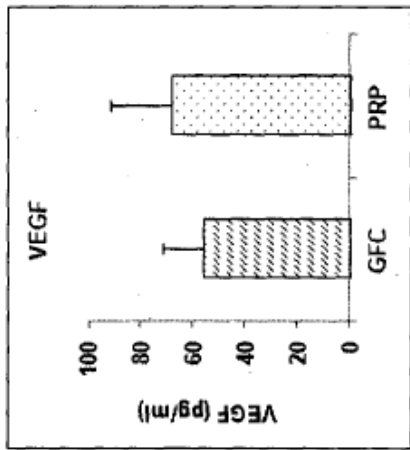
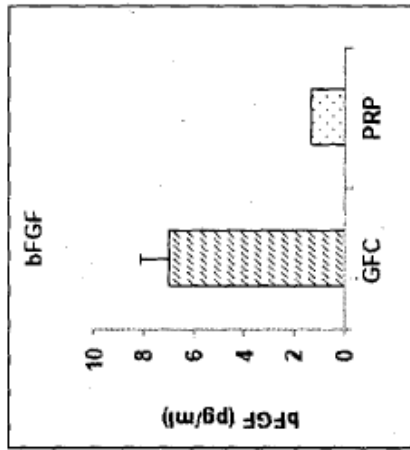
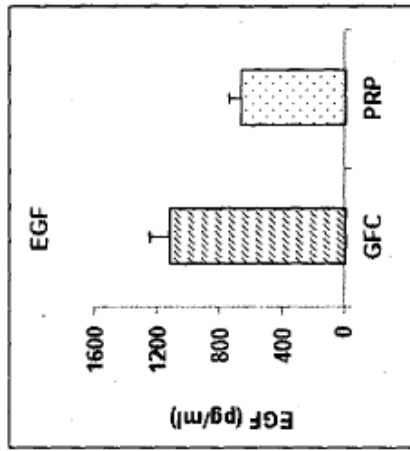


Fig 5

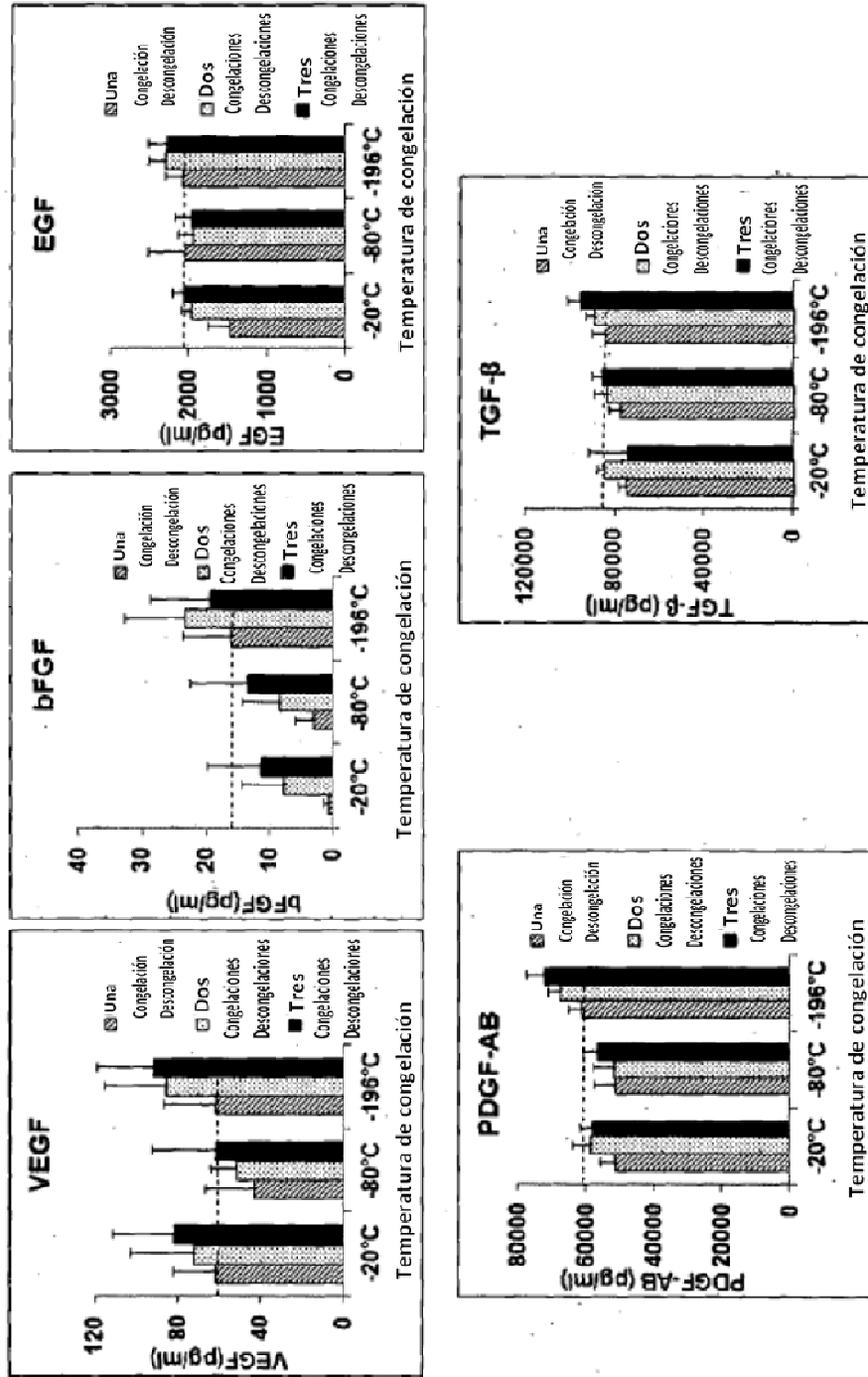
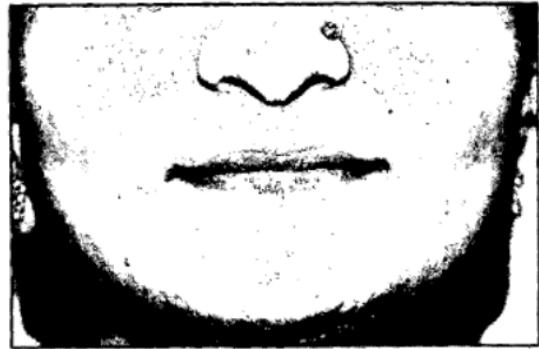


Fig 6



Antes



Después

Fig 7



Antes



Después

Fig 8

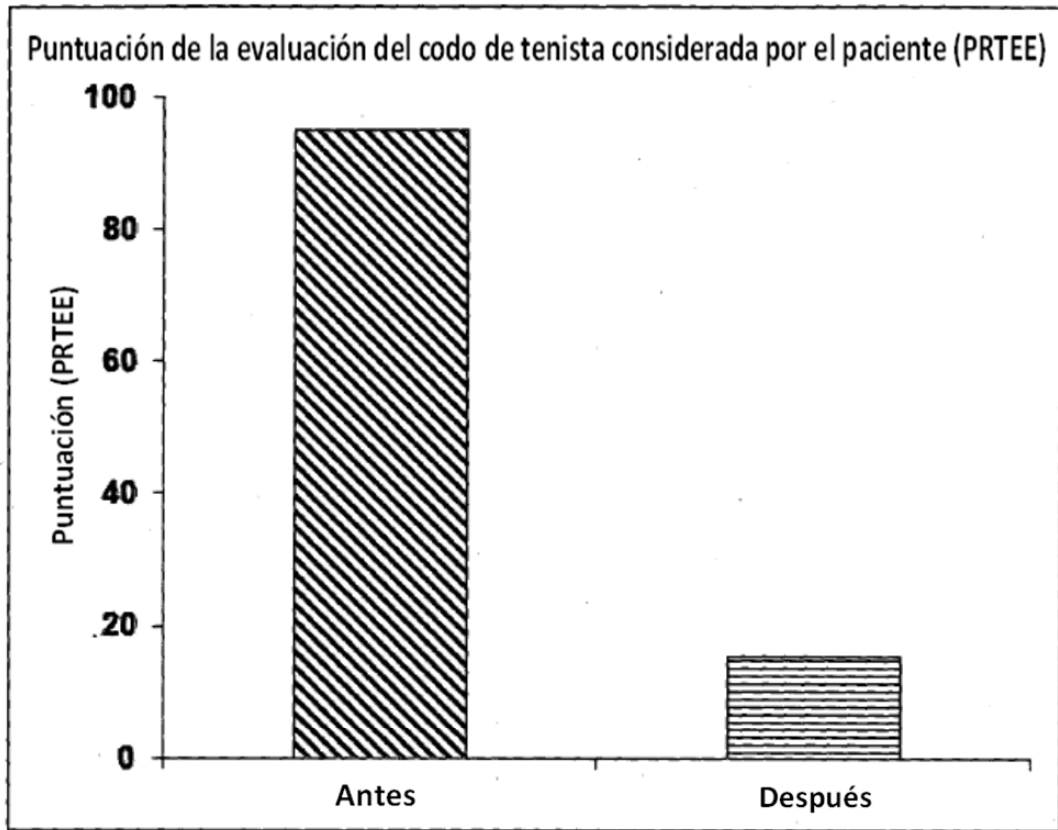


Fig 9

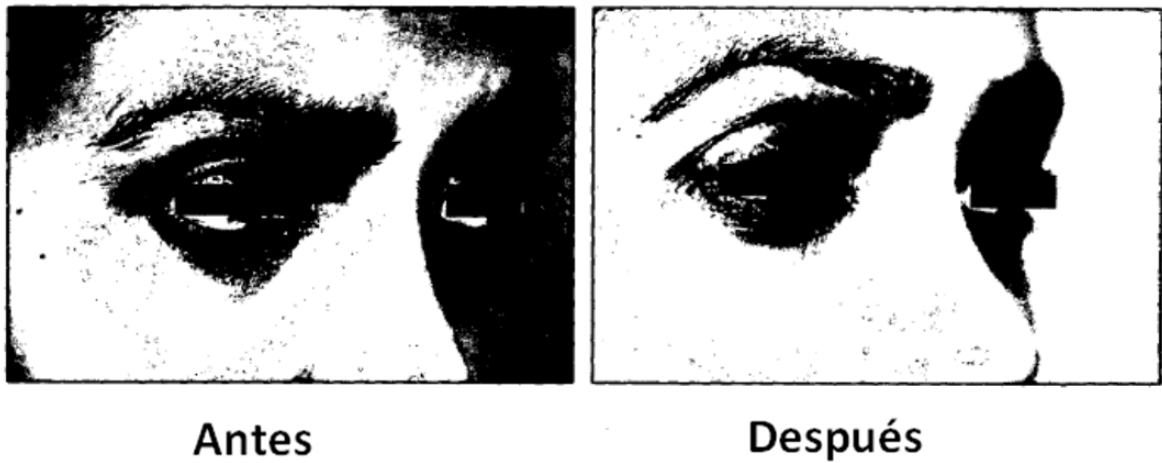
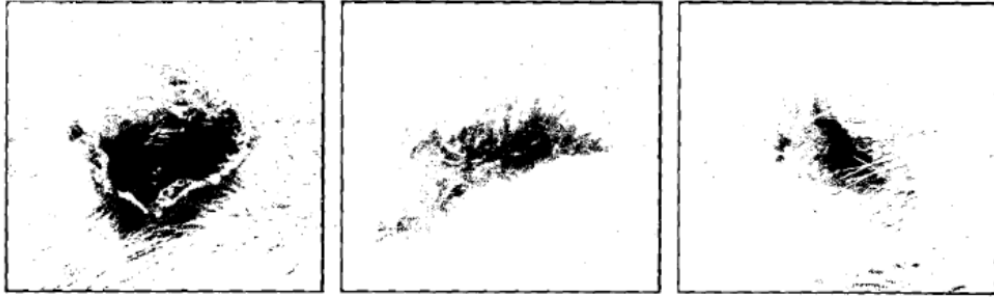


Fig 10



Rata sin tratar / Control

GFC por Ejemplo 1

GFC por Ejemplo 2

Fig 11