

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 269**

51 Int. Cl.:

A61K 35/12 (2015.01)

A61K 35/14 (2015.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.06.2011 PCT/DE2011/001322**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2012 WO12010128**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2011 E 11764081 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2590659**

54 Título: **Sangre enriquecida en gelsolina para uso terapéutico**

30 Prioridad:
07.07.2010 DE 102010026500

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.03.2018

73 Titular/es:
SCHNEIDER, ULRICH (50.0%)
Wiessestr. 103
83707 Ringsee, DE y
ARTHROGEN GMBH (50.0%)

72 Inventor/es:
SCHNEIDER, ULRICH.

74 Agente/Representante:
VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 658 269 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

Sangre enriquecida en gelsolina para uso terapéutico

- 5 Se describe un procedimiento para la elaboración de al menos una proteína de efecto terapéutico o de una mezcla de proteínas en un recipiente, en el que el recipiente se llena con un líquido corporal, se incuba y se forma la proteína de efecto terapéutico en el líquido corporal. Además, se describen un recipiente para la realización del procedimiento y medicamentos que contienen como sustancia activa las proteínas elaboradas de esta manera.
- 10 Las enfermedades articulares degenerativas tienen una gran importancia tanto en el ser humano como en animales. En el ser humano, la artrosis aparece de forma idiopática (con factores de riesgo conocidos) en pacientes más mayores, o bien, puede aparecer como complicación postraumática en pacientes más jóvenes. Pero ambas formas tienen los mismos síntomas clínicos, entre otros, dolores articulares y una función limitada, y frecuentemente conducen a una calidad de vida fuertemente limitada del paciente afectado. Diferentes causas como una sobrecarga, una carga incorrecta, una inestabilidad articular o infecciones conducen a un daño mecánico y enzimático del cartílago articular con apoptosis de los condrocitos, así como a una pérdida de colágeno tipo II y de proteoglicanos. Existe un desequilibrio entre la degeneración y la reparación. Aunque en el centro de la patogénesis está la degeneración del cartílago, la enfermedad no sólo afecta al cartílago, sino también a la cápsula articular y al hueso subcondral. En caso de daños de cartílago, los productos de degradación llegan a la sinovia y conducen a una sinovitis. Además, también los daños en la cápsula articular pueden conducir directamente a una liberación de mediadores de inflamación y una cápsula articular fuertemente traumatizada resulta además en una inestabilidad articular. En caso de una carga fuerte y cíclica, la placa ósea subcondral se adapta con una densidad ósea más elevada. Sin embargo, por esta esclerotización, el hueso se vuelve más rígido y frágil. Esto conduce por una parte a una disminución de la capacidad de absorción de choques, lo que carga más el cartílago situado por encima y, por otra parte, a fuerzas de cizallamiento en la transición entre la placa ósea subcondral y el cartílago mineralizado. En caballos con artrosis y/u osteoartritis y/u otras enfermedades articulares se midieron concentraciones elevadas de citoquinas proinflamatorias (que fomentan la inflamación) factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) así como de prostaglandina E2 (PGE2) y metaloproteasas en la sinovia. También en seres humanos con artrosis está elevada la concentración de las citoquinas proinflamatorias en la sangre y en la sinovia.
- 20 Las citoquinas proinflamatorias (que fomentan la inflamación) TNF α , IL-1 e IL-6 son secretadas por los sinoviocitos B (synoviocytii secretorii) de la membrana sinovial, por células inflamatorias en la membrana sinovial y por condrocitos y estimulan la liberación de metaloproteasas de matriz (MMP) y de agregasas así como de mediadores de inflamación adicionales tales como prostaglandinas (PGE2) u óxido nítrico (NO). Las metaloproteasas son enzimas que degradan la matriz del cartílago (colágeno tipo II, proteoglicanos y otros). IL-1 y TNF α inhiben también directamente la producción de colágeno tipo II.
- 30 La terapia convencional de enfermedades articulares degenerativas consiste en la mayoría de los casos en un tratamiento sintomático de la inflamación, es decir, en una inhibición o sistémica o intraarticular de la inflamación por medio de medicamentos correspondientes. Entre estos figuran los corticosteroides de aplicación intraarticular, empleados con mayor frecuencia, en parte en combinación con ácido hialurónico. Adicionalmente, en ocasiones se administran además condroprotectores.
- 40 Sin embargo, estas terapias medicamentosas tienen numerosos efectos secundarios.
- 45 Una alternativa a las terapias sintomáticas (a base de antiinflamatorios no esteroideos y esteroideos) consiste en los tratamientos con inhibidores de citoquinas o condroprotectores que se denominan "disease modifying drugs" (Qvist y col. 2008). También figuran entre ellas las terapias en las que proteínas propias del cuerpo (autólogas) se obtienen de la sangre del paciente y se vuelven a administrar a este paciente como medicamento individual.
- 50 Por el documento WO9909051 se dio a conocer un procedimiento para la elaboración de proteínas autólogas (= propias del cuerpo) de efecto terapéutico en una muestra de líquido corporal obtenida previamente del paciente (animal o humano) y una jeringa para realizar este procedimiento. Como proteínas que pueden elaborarse de esta manera se mencionan la eritropoyetina, la insulina, los interferones, la interleucina 4, la interleucina 10, el receptor soluble de factor de necrosis tumoral y el antagonista del receptor de la interleucina 1. Las proteínas se elaboran y se ponen a disposición en una jeringa.
- 55 Las estructuras internas de la jeringa, entre las que figuran también partículas dispuestas dentro de la jeringa, especialmente bolitas de cristal impregnadas con sulfato de cromo, están recubiertas de inductores inmovilizados que deben estimular la biosíntesis de las proteínas deseadas. En el caso de sangre como muestra de líquido corporal, como inductores de este tipo están previstas inmunoglobulinas, especialmente inmunoglobulina G, para estimular la formación de proteínas antiinflamatorias por los monocitos contenidos en la sangre.
- 60 Para la realización del procedimiento, la jeringa se llena con un líquido corporal de un paciente y se incuba. Durante ello, en el líquido corporal se forma la proteína de efecto terapéutico.
- 65

El líquido corporal enriquecido de esta manera se puede almacenar de forma estéril en la jeringa y, en caso de necesidad, se puede suministrar al paciente directamente sin más tratamiento o, por ejemplo, después de una centrifugación y/o una filtración estéril. Un aspecto de la presente invención consiste en perfeccionar o modificar este procedimiento de tal forma que las proteínas generadas existan en cantidades significativamente más elevadas y que se eviten fenómenos acompañantes. La descripción muestra la puesta a disposición de un procedimiento del tipo mencionado al principio en el que el recipiente contiene partículas de oro.

El término “recipiente” se refiere en lo sucesivo a un envase que se puede cerrar o a un receptáculo que se puede cerrar para guardar líquidos durante un tiempo determinado, siendo el envase o el receptáculo estanco con respecto al líquido que ha de ser alojado.

El uso de oro como medicamento es conocido desde hace mucho tiempo en la medicina. A finales de siglo 19 se empleaba oro sobre todo como medicamento para el tratamiento de la tuberculosis. A causa de la suposición errónea de que la artritis reumatoide también es una enfermedad infecciosa, se usaba oro como medicamento también en esta dolencia. La terapia era exitosa y se aplicaba luego durante muchos años hasta la actualidad (Kean and Kean 2008). Un estudio in vitro en condrocitos humanos mostró que los compuestos de oro (aurotiomato) inhibe la producción de óxido nítrico (NO) de los condrocitos. El óxido nítrico confiere (media) los efectos destructivos de las citoquinas proinflamatorias IL-1 y TNF α (Green y col. 2006). Esto conduce a una producción reducida de colágeno y de proteoglicano, a la apoptosis de condrocitos y a una estimulación de las metaloproteasas (Vuolteenaho y col. 2005).

En las fórmulas terapéuticas conocidas en el estado de la técnica, el oro se aplica o bien por vía intramuscular o por vía oral. Con estos métodos de aplicación y la galénica correspondiente del oro, los efectos deseados conocidos por los estudios in vitro, sin embargo, se consiguen sólo de forma incompleta.

La combinación de partículas de oro con un líquido corporal autólogo u homólogo, humano o animal, especialmente una muestra de sangre propia, en un sistema cerrado, empleada por primera vez en el procedimiento según la invención, proporciona sorprendentemente no sólo (i) una concentración notablemente más elevada de las proteínas deseadas, en comparación con el procedimiento conocido anteriormente, en el caso de sangre, especialmente de las citoquinas (sobre todo IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, G-CSF, MCP-1, MIP-1, RANTES, TNF-alfa, GRO-alfa, MCP-3, MIF e IL-1RA), sino (ii) también una mejor calidad de las proteínas correspondientes a causa de una inhibición del envejecimiento fisiológico de las proteínas durante el tiempo de incubación y (iii) además un enriquecimiento significativo de la proteína gelsolina. La gelsolina es una proteína ligante de actina y presente de forma ubicuitaria en todas las células animales (incluidas las humanas) y también de forma extracelular (por ejemplo, en el plasma sanguíneo), que fragmenta filamentos de actina en función de Ca²⁺ e impide una repolimerización y que tiene/realiza una función clave en la regulación de los procesos de formación y de degradación de filamentos de actina. La gelsolina fue descubierta e identificada en extractos citoplasmáticos y su presencia ubicuitaria y conservación filogenética en células libremente móviles habla a favor de su papel esencial como proteína regulatoria intracelular. Sólo más tarde se descubrió que la gelsolina está presente también en el plasma sanguíneo de mamíferos y que allí despolimeriza la actina. Esta llamada gelsolina plasmática (p-gelsolina, pGS) es una isoforma de la gelsolina citoplasmática (c-gelsolina, cGS) y se diferencia de esta, en cuanto a su estructura, en que en el extremo n-terminal presenta 23 aminoácidos adicionales. La función fisiológica de la gelsolina plasmática sigue siendo objeto de numerosos trabajos de investigación (DiNubriu, 2007 y la literatura citada allí). La gelsolina regula funciones celulares tan importantes como la motilidad celular, la fagocitosis, la apoptosis y la activación de trombocitos (Silacci y col. 2004, Trickey y col. 2004). En seres humanos con artritis reumatoide está disminuida la concentración plasmática de gelsolina (Osborn y col. 2008). También en otras enfermedades con degeneraciones de tejido y especialmente en la sepsis está disminuida la concentración plasmática de gelsolina (Suhler y col. 1997, Osborn y col. 2008, Lee y col. 2007). Los conocimientos presentes en el estado de la técnica indican que la gelsolina plasmática sirve de amortiguador para amortiguar las reacciones inflamatorias excesivas del cuerpo (DiNubile 2008).

Las proteínas elaboradas con el procedimiento según la invención, especialmente la gelsolina y las citoquinas, pueden (pero no tienen que) volver a aplicarse al paciente, junto con otros componentes del líquido situado en el recipiente, directamente, es decir, sin más manipulación – como por ejemplo, la centrifugación, la filtración estéril o el trasvase a otro recipiente. De esta manera, se evita una contaminación de la solución proteica y se minimiza el riesgo de una infección del paciente durante la administración de las proteínas.

En una variante del procedimiento según la invención, después de la incubación in vitro, las partículas de oro se separan del líquido corporal, por ejemplo del suero, y se desechan. Esto ofrece la ventaja de que se evitan completamente los efectos secundarios inducidos por oro durante o después de la administración de dicho líquido corporal, por ejemplo de este suero.

En una variante igualmente preferible del procedimiento según la invención, tanto las partículas de oro como las células corporales (por ejemplo, células sanguíneas) se separan del líquido corporal (por ejemplo, de la sangre) y se desechan. Los líquidos corporales humanos, autólogos, tratados de esta manera, y en especial los sueros, son tolerados excelentemente y no cabe esperar efectos secundarios.

Las partículas de oro empleadas en el procedimiento presentan preferentemente una estructura definida y/o un tamaño definido. Resultan especialmente adecuadas las micropartículas y/o nanopartículas con un tamaño de partículas entre 10 nanómetros y 500 micrómetros.

5 En las variantes del procedimiento según la invención en los que las partículas de oro han de separarse del líquido corporal, por ejemplo del suero, y desecharse después de la incubación in vitro, en el procedimiento se emplean preferentemente partículas de oro con un tamaño de aproximadamente 1 μ y además preferentemente en una cantidad de 10^3 a 10^4 partículas de oro por cada 10 ml. Para esta aplicación se han acreditado en la práctica recipientes (por ejemplo, una jeringa) con una capacidad de aprox. 10 ml.

10 En una forma de realización que se ha acreditado bien en la aplicación práctica, las partículas de oro existen en el recipiente en una cantidad de 0,3 mg por 1 ml de líquido corporal. Son adecuadas y están previstas básicamente concentraciones de 0,1 a 10 mg por 1 ml.

15 La estructura interior del recipiente preferentemente está libre de anticoagulantes tales como heparina, citrato, EDTA o CPDA, ya que en el marco de los trabajos en los que está basada esta invención sorprendentemente se encontró que en caso de la presencia de este tipo de sustancias se biosintetizan menos proteínas que en caso de su ausencia. Especialmente en el caso de sangre como líquido corporal y heparina como anticoagulante, en caso de la presencia de heparina, por ejemplo, como recubrimiento de la pared interior del recipiente, se obtiene una producción de citoquinas considerablemente menor que en caso de la ausencia de heparina y otros anticoagulantes.

20 Como recipiente entra en consideración especialmente una jeringa, porque esta no sólo puede servir de recipiente de incubación, sino al mismo tiempo también de instrumento de extracción para la obtención del líquido corporal y/o de instrumento de aplicación para la administración de las proteínas a un paciente.

25 Pero como recipiente entra en consideración también una bolsa que se pueda cerrar, porque especialmente en el caso de mayores volúmenes, esta puede manejarse y almacenarse de manera más flexible que una jeringa con un volumen comparable y porque se puede acoplar a una jeringa de forma técnicamente sencilla y segura, de manera que el llenado y vaciado puede realizarse a través de esta.

30 El procedimiento según la invención resulta especialmente adecuado para la elaboración (biosíntesis) y el enriquecimiento de proteínas de células sanguíneas. Por ello, como líquido corporal está prevista especialmente sangre.

35 Sorprendentemente, la proteína de efecto terapéutico, la gelsolina, se puede elaborar y enriquecer especialmente bien, es decir, en cantidades significativas, con el procedimiento según la invención. Por ello, el procedimiento según la invención está previsto especialmente para la obtención de gelsolina.

40 En cuanto a las condiciones de incubación para el recipiente lleno del líquido corporal, en la práctica se ha mostrado que un tiempo de incubación de 12 a 72 horas, preferentemente de 24 horas, a una temperatura de 20 °C a 41 °C, preferentemente de 37°, conduce a buenos resultados.

45 Una solución para el objetivo mencionado consiste también en la puesta a disposición de un recipiente para la biosíntesis in vitro y el enriquecimiento (inducción in vitro) de proteínas de efecto terapéutico en un líquido corporal, que se caracteriza porque el recipiente contiene partículas de oro y resulta adecuado para alojar, almacenar y volver a emitir una muestra de líquido corporal, y porque se puede acoplar a una aguja hueca (cánula, agujero de inyección) de tal forma que su contenido se puede inyectar por medio de dicha aguja hueca (cánula, aguja de inyección).

50 Con este recipiente es posible especialmente realizar el procedimiento de elaboración de proteína descrito anteriormente y aprovechar las ventajas que ofrece. Por medio de la aguja hueca acoplable, las proteínas elaboradas pueden ponerse directamente en el lugar de aplicación deseado, especialmente introducirse en un cuerpo humano o animal.

55 Las partículas de oro presentan preferentemente una estructura definida y/o un tamaño definido. Resultan especialmente adecuadas las micropartículas y/o nanopartículas (tamaño de partículas entre 10 nanómetros y 500 micrómetros). Una cantidad adecuada de partículas de oro en el recipiente se sitúa entre 0,1 mg y 10 mg por 1 ml de líquido corporal, preferentemente 0,3 mg por 1 ml de líquido corporal.

60 El recipiente es preferentemente una jeringa o una bolsa. La jeringa ofrece la ventaja de que no sólo puede servir de recipiente de incubación, sino al mismo tiempo también de instrumento de extracción para la obtención del líquido corporal y/o de instrumento de aplicación para la administración de las proteínas a un paciente. La bolsa ofrece la ventaja de que en el caso de mayores volúmenes puede ser manejada y almacenada de manera más flexible que una jeringa con un volumen comparable y, para el llenado y el vaciado, se puede acoplar a una jeringa.

65

Como recipiente resulta especialmente adecuada una jeringa usual en el mercado (por ejemplo, jeringas de 5 a 100 ml) sin realización especial en su espacio hueco interior. En el cilindro de jeringa se introducen las partículas de oro (por ejemplo, Gold Microcarriers de BioRad Laboratories, Cat. 165-2264).

5 La jeringa, especialmente la pared interior del cilindro de jeringa y la parte del émbolo de jeringa, que está situada dentro del cilindro, se componen preferentemente de una materia sintética, por ejemplo, de poliestireno, polietileno, polivinilcloruro, polipropileno (S-Monvette neutras, Sarstedt) o de una sustancia similar o mezclas de estas.

10 El recipiente resulta especialmente adecuado para la elaboración (biosíntesis) y el enriquecimiento de proteínas, especialmente de gelsolina, a partir de células sanguíneas. Por ello, como líquido corporal está prevista especialmente sangre.

15 Las proteínas elaboradas con el procedimiento según la invención en un líquido corporal pueden emplearse, junto al líquido corporal y las partículas de oro o sin las partículas de oro, como medicamento para el tratamiento de enfermedades.

20 Los líquidos corporales, especialmente sueros sanguíneos, enriquecidos en proteínas y especialmente enriquecidos en citoquininas y gelsolina, elaborados con el procedimiento según la invención, constituyen una alternativa segura, económica y rápida de elaborar y con pocos efectos secundarios, a los preparados medicamentosos convencionales comparables.

25 La presente invención se refiere a una sangre enriquecida en citoquininas y gelsolina para el uso como medicamento o para la elaboración de un medicamento, que se obtiene de tal forma que se aloja sangre en un recipiente que contiene partículas de oro, preferentemente partículas de oro con el tamaño de aproximadamente 1 μm y preferentemente en una cantidad de 10^3 a 10^4 partículas de oro por cada recipiente de 10 ml (o 0,3 mg de partículas de oro con un diámetro de 1 μm por cada 1 ml de sangre/recipiente), y esta mezcla de sangre y partículas de oro se incuba (por ejemplo durante 12 a 72 horas, preferentemente durante 24 horas y a entre 20 °C y 41 °C, preferentemente a 37 °C) y, a continuación, las partículas de oro y preferentemente (es decir, opcionalmente) se separan del líquido corporal, especialmente de la sangre, células sanguíneas y otros componentes insolubles y se desechan (preferentemente por centrifugación y/o filtración estéril).

35 La invención se refiere además al uso de sangre autóloga u homóloga y partículas de oro en combinación como medicamento o para la elaboración de un medicamento. Dicho de otra manera: objeto de la presente invención es también una mezcla de sustancias de sangre autóloga u homóloga y partículas de oro para el uso como medicamento, o un medicamento que comprende la mezcla de sustancias sangre autóloga u homóloga y partículas de oro, incluidas las proteínas enriquecidas en esta como combinación de sustancias activas.

40 Los medicamentos descritos permiten un tratamiento especialmente sencillo, económico, con pocos riesgos y efectivo.

45 Los medicamentos descritos resultan adecuados especialmente para el tratamiento de enfermedades degenerativas de tejidos, sobre todo de la artrosis y tendinosis. Sobre todo el medicamento incubado con partículas de oro y, a continuación, liberado de partículas resulta muy adecuado y previsto para el tratamiento de la artrosis y otras enfermedades asociadas con la degeneración de tejidos.

50 Una forma de realización especial de los medicamentos según la invención se caracteriza porque la sangre incubada con partículas de oro presenta después de la incubación un contenido en gelsolina que asciende al menos al doble del valor de sangre normalizado correspondiente para la gelsolina. El término "valor de sangre normalizado correspondiente para la gelsolina" corresponde en el presente contexto al valor normalizado en la medicina humana o la medicina veterinaria para la gelsolina en la sangre del grupo de pacientes que debe ser tratado con el medicamento. El grupo de pacientes se caracteriza por su pertenencia a una especie zoológica y raza, el sexo y la edad.

55 Este medicamento rico en gelsolina está previsto para el tratamiento de la artrosis que conlleva una falta de gelsolina en la sangre del paciente. La mezcla de sangre y oro incubada puede aplicarse en su totalidad o en partes. En caso de necesidad, antes de la administración al paciente (animal o humano) se puede someter además a una centrifugación y/o una filtración estéril, para separar de la sangre por ejemplo células y fragmentos celulares y de esta manera reducir al mismo tiempo también el volumen de inyección.

60 A continuación, la invención se describe en detalle con la ayuda de ejemplos de realización y figuras pertenecientes:

65 La figura 1 muestra: un análisis de espectroscopia MID-FTIR del perfil de proteínas en sueros sanguíneos de diferentes pacientes antes (T0) y después (T24) de la realización del procedimiento descrito, en comparación con controles. AZUL representa el perfil de proteínas para el momento T0, VERDE muestra el perfil de proteínas de las muestras tratadas con el procedimiento según la invención en el momento T24, ROT muestra el perfil de proteínas

de los sueros de control en el momento T24.

- La figura 2 muestra: los resultados de un análisis multiplex de las proteínas:
- 5 GS = gelsolina
 - IL-4 = interleucina-4
 - IL-10 = interleucina-10
 - IL-13 = interleucina-13
 - IL-1Ra = antagonista de receptor de interleucina-1
 - IL-1 β = interleucina-1 β
 - 10 TNF- α = factor de necrosis tumoral alfa
 - G-CSF = Granulocyte-Colony Stimulating factor (factor de estimulación de colonización de granulocitos)
 - GM-CSF = Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating factor (factor de estimulación de colonización de granulocitos y macrófagos)
 - 15 IFN-g = Interferon Gamma (interferón gama)
 - SCGF- β = Hematopoietic Stem cell growth factor (factor de crecimiento de células madre hematopoyéticas)
 - MIP-1a = Macrophage inflammatory protein-1a (proteína inflamatoria de macrófagos 1a)
 - MIP-1 β = Macrophage inflammatory protein-1 β (proteína inflamatoria de macrófagos 1 β)
 - 20 VEGF = Vascular endothelial growth factor (factor de crecimiento endotelial vascular)
 - IL-18 = interleucina-18
 - MCP-3 = Macrophage chemotactic protein (proteína quimiotáctica de macrófagos)
 - SDF-a = Stromal derived factor (factor derivado del estroma)
 - FGF básico = Fibroblast growth factor (factor de crecimiento de fibroblastos)
 - 25 GRO α = Growth-regulated oncogene alpha (oncogén alfa de crecimiento regulado) en muestras de sangre en el momento T0 ("T0") y al cabo de 24 horas de incubación por una parte sin más tratamiento ("control") y, por otra parte, con tratamiento o bien según WO9909051 ("h"), o bien, según el procedimiento descrito ("invención").
 - 30 la figura 3 muestra: la documentación gráfica del grado hinchazón de todos los caballos examinados antes o después del tratamiento según la invención en los momentos de examen posterior correspondientes
 - la figura 4 muestra: la documentación gráfica de la cojera de todos los caballos examinados, antes o después del tratamiento según la invención en los momentos de examen posterior correspondientes
 - 35 la figura 5 muestra: KOOS-score (evaluación KOOS) antes y después del tratamiento en pacientes con gonartrosis
 - 40 la figura 6 muestra: la formación de derrame y la concentración de gelsolina en el líquido sinovial en una paciente con gonartrosis, en su evolución: después de la 1ª (T1), la 2ª (T2) o la 3ª inyección (T3)
 - 45 la figura 7 muestra: la liberación de proteoglicano de explantes/preparados de cartílago-hueso después de un tratamiento de choques.

Ejemplo 1: Comprobación de la elaboración de proteínas en una muestra de sangre según el procedimiento descrito y en un recipiente descrito, por medio del procedimiento de espectroscopia MID-FTIR y análisis multiplex

Respectivamente dos muestras de sangre de la cantidad de 9 ml de 11 pacientes distintos (nº 1 a 11) se recibieron en un recipiente descrito, en concreto, una jeringa de 9 ml llenada previamente con 2,7 mg de partículas de oro (con un diámetro de 1 μ m). La misma cantidad de muestra de sangre del mismo origen (paciente) se recibieron en una jeringa de 9 ml idéntica sin contenido de partículas de oro. Las muestras se analizaron en diferentes momentos, en concreto, en un momento T0 inmediatamente después de la extracción de sangre y en el momento T24 después de la incubación durante 24 horas a 37 °C.

Por medio de una espectroscopia infrarroja por transformadas de Fourier en el intervalo infrarrojo medio (espectro espectral de 4.000 cm^{-1} a 400 cm^{-1}), abreviada por espectroscopia MID-FTIR (por ejemplo, el procedimiento AquaSpec de la empresa Micro-Biolytics GmbH/Esslingen) se analizaron las muestras.

El principio de medición de la espectroscopia infrarroja por transformadas de Fourier está basado en la irradiación de una sustancia con ondas electromagnéticas, durante lo que son absorbidos determinados intervalos de frecuencia. Dado que, energéticamente, la radiación infrarroja se encuentra en el intervalo del nivel de oscilaciones de enlaces de moléculas, la absorción conduce a una estimulación de oscilaciones de los enlaces. Esta se vuelve visible en

forma de desviaciones en el espectro medido (diagrama). Dado que las energías o frecuencias necesarias para ello son características para los enlaces correspondientes, de esta manera también es posible identificar materiales y aclarar estructuras.

5 La espectroscopia FTIR resulta adecuada especialmente para el análisis de cambios estructurales de reacción inducida en una macromolécula biológica. Con ella, se pueden examinar sistemas biológicos, especialmente líquidos proteicos acuosos. Durante ello, la muestra ni se altera ni se destruye y se puede trabajar bajo condiciones nativas de la biomolécula, es decir que se puede medir el "estado real", porque no se requiere ni la fijación ni otro tipo de tratamiento de las muestras.

10 Dado que todos los componentes moleculares de la proteína poseen bandas de absorción en el intervalo espectral infrarrojo, es posible observar casi todas las zonas de una proteína y obtener información detallada sobre la estructura de la proteína.

15 El procedimiento de espectroscopia MID-FTIR permite el reconocimiento y la cuantificación automatizados y reproducibles de cambios de la conformación de proteínas y la determinación de la concentración de proteínas. Se pueden detectar incluso concentraciones muy pequeñas de proteínas muy reducidas (hasta menos de 0,1 mg/ml) y los menores cambios de conformación.

20 Durante la realización del procedimiento en el marco de la presente invención, se analizaron las muestras de sangre con y sin partículas de oro en el estado "real" en una célula de medición espectroscópica (célula de transmisión) de alta precisión, biocompatible y adecuada para muestras acuosas. Usando calibraciones internas, de cada muestra medida se determinó automáticamente la concentración de la proteína disuelta y la estructura secundaria (hélice alfa, hoja plegada beta) de esta.

25 Los resultados de esta medición están representados gráficamente en la figura 1. Muestran que las muestras incubadas según la invención en presencia de partículas de oro tienen un comportamiento biológico distinto a las muestras de control. Los valores de medición de todas las muestras en el momento T0 están señalados con color azul y se encuentran en su mayor parte en el cuadrante superior izquierdo. Los valores de medición después de la realización del procedimiento según la invención con una duración de incubación de 24 horas están señalados con color verde y se encuentran en su mayor parte en el o cerca del cuadrante inferior izquierdo. Esto indica que el envejecimiento fisiológico de proteínas en el marco de la incubación de sangre se inhibe mediante la adición de oro. Los valores de medición de las muestras de control después de una duración de incubación de 24 horas están señalados con color rojo y se encuentran en su mayor parte en el cuadrante superior derecho. Este desplazamiento hacia la derecha indica un envejecimiento de la estructura de proteína.

35 Con un procedimiento de análisis multiparamétrico (sinónimo: análisis multiplex) sobre la base de micropartículas codificadas de forma distinguible (por ejemplo, el BioPlex™ 2200-System de la empresa BioRad Laboratories, Múnich) se determinaron cuantitativamente las siguientes proteínas en las muestras con el procedimiento según la invención ("invención"), el procedimiento según el documento WO9909051 ("h") y los controles correspondientes sin tratamiento en los momentos T0 y T24:

45 gelsolina (GS), interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10), interleucina-13 (IL-13), interleucina-1, antagonista de receptor (IL-1Ra), interleucina-1 β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-a), factor de estimulación de colonización de granulocitos (G-CSF), factor de estimulación de colonización de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interferón gama (IFN-g), factor de crecimiento de células madre hematopoyéticas (SCGF- β), proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1a), proteína inflamatoria de macrófagos 1 β (MIP-1 β), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interleucina-18 (IL-18), proteína quimiotáctica de macrófagos (MCP-3), factor derivado del estroma (SDF-a), factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF), oncogén alfa de crecimiento regulado (GROa).

Estas proteínas juegan papeles importantes en la degeneración de tejido y la reparación de tejido.

55 Los resultados de este análisis están representados en la tabla 1 y representados gráficamente en la figura 2.

60 Demuestran que en las muestras ("invención"), al cabo de 24 horas se ha producido un considerable aumento de la concentración de gelsolina (factor 10), mientras que en las muestras de comparación ("control-T24" y "h-T24") no se detectó ningún enriquecimiento en gelsolina, sino más bien una disminución de gelsolina. También las concentraciones del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-a), de la proteína quimiotáctica de macrófagos (MCP-3) y del oncogén alfa de crecimiento regulado (GROa) eran notablemente (TNF-a: factor 30-40, MCP-3: Factor 20-30) o al menos claramente (GROa: factor 2) más elevadas en las muestras tratadas según la invención "invención" que en las muestras de comparación ("Control-T24" y "h-T24").

Ejemplo 2: Estudios de la eficacia del medicamento en animales

A) Hinchazón de partes blandas

5 En el marco de un estudio clínico prospectivo, 8 caballos con una hinchazón pronunciada de partes blandas a causa de tendinosis (alteraciones degenerativas en tendones en la zona de las apófisis) se trataron con el medicamento según la invención.

10 Para la elaboración del medicamento, un recipiente en forma de una jeringa que contenía partículas de oro se llenó con sangre del animal correspondiente y se incubó durante 24 horas a una temperatura del rango de 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, estaba acabado el medicamento en forma de la sangre situada en la jeringa con las proteínas sintetizadas y enriquecidas entretanto, especialmente citoquinas y gelsolina, así como con las partículas de oro, y se podía emplear de forma directa e inmediata.

15 Dado que el medicamento se elaboró dentro de una jeringa, se pudo administrar al animal correspondiente por inyección sin trasvase y, por tanto, sin los riesgos de contaminación y pérdida de material.

20 Para el presente estudio, en el momento T0, para cada caballo se elaboraron cuatro dosis de medicamento de este tipo, es decir, cuatro jeringas que contenían partículas de oro se llenaron con sangre del animal correspondiente y se incubaron durante 24 horas a una temperatura del rango de 37 °C.

25 Estas inyecciones de medicamento se administraron al caballo correspondiente en un intervalo de una semana respectivamente. La primera administración se realizó en el momento T24, la segunda, la tercera y la cuarta al cabo de la semana 1, de la semana 2 y de la semana 3. Las jeringas que contenían el medicamento para la segunda, la tercera y la cuarta aplicaciones se almacenaron a menos 20 °C hasta su uso.

El estado de hinchazón se comprobó al cabo de 1 semana, de 2 semanas, de 3 semanas, de 3 meses, de 6 meses y de 1 año y se valoró con la ayuda de una escala de 0 a 5 (0 = ausencia de hinchazón, 5 = hinchazón masiva).

30 En los 8 casos, ya al cabo de 3 semanas se detectó una reducción significativa de la hinchazón. Al cabo de 6 meses y también al cabo de un año, todos los caballos estaban completamente libres de hinchazón. En el marco de los tratamientos no se detectó ningún tipo de efectos secundarios.

35 Los resultados de este estudio están representados gráficamente en la figura 3.

B) Cojeras

40 En otro estudio de caballos, a 11 caballos con el síntoma clínico de enfermedad de la cojera (12 extremidades afectadas) se trataron con el medicamento según la invención. Las causas médicas de las cojeras eran en seis casos alteraciones degenerativas de cartílago (n=6) dentro de/en articulaciones y, en seis casos, enfermedades de partes blandas (n=6).

45 Para la elaboración del medicamento, a su vez, por cada caballo, cuatro recipientes en forma de jeringas que contenían partículas de oro se llenaron con sangre del animal correspondiente y se incubaron durante 24 horas a una temperatura del rango de 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, en principio estaba acabado el medicamento en forma de la sangre situada en la jeringa con las proteínas sintetizadas y enriquecidas entretanto, especialmente citoquinas y gelsolina, así como con las partículas de oro. Para minimizar el volumen de inyección, en un procedimiento de centrifugación subsiguiente, se separaron partes corpusculares mediante centrifugación durante 10 minutos a 5.000 rev./min. Sólo los respectivos sobrenadantes se emplearon para las inyecciones.

50 Estas inyecciones de medicamento se administraron al caballo correspondiente en un intervalo de respectivamente una semana. La primera administración se realizó en el momento T24, la segunda, la tercera y la cuarta al cabo de la semana 1, de la semana 2 y de la semana 3. Las jeringas que contenían el medicamento para la segunda, la tercera y la cuarta aplicaciones se almacenaron a menos 20 °C hasta su uso.

55 La cojera se comprobó al cabo de 1, 2 y 3 semanas, de 3 y 6 meses y de 1 año y se valoró el grado de cojera con la ayuda de una escala de 0 a 4 (0 = ausencia de cojera, 5 = cojera masiva) según AAEP = "American Association of Equine Practitioners" (Asociación Americana de Veterinarios Equinos).

60 En los 12 casos, se detectó ya al cabo de 3 semanas una reducción significativa de la cojera. Al cabo de 6 meses y también al cabo de un año, todos los caballos estaban completamente libres de síntomas. En el marco de los tratamientos no se detectó ningún tipo de efectos secundarios.

65 Los resultados de este estudio están representados gráficamente en la figura 4.

Ejemplo 3: Elaboración de un recipiente con partículas de oro según la invención

Como partículas de oro se usó polvo de oro (tamaño de partículas 1 µm, empresa Bio-Rad Laboratories, Múnich). Las partículas de oro en primer lugar se esterilizaron de la manera recomendada por el fabricante: La cantidad necesaria de partículas de oro/polvo de oro, por ejemplo 30 mg, se mezcló con 1 ml de etanol al 70 %, se incubó durante 10 minutos removiendo ligeramente (mezclador, agitador de vórtice), al cabo de 1 minuto de depósito se centrifugó brevemente y, a continuación, se separó el sobrenadante. Después, las partículas de oro se lavaron tres veces con respectivamente 1 ml de Aqua bidest. Después del último ciclo de lavado con centrifugación final y separación del sobrenadante, las partículas de oro se resuspendieron en PBS estéril y se ajustaron a la concentración deseada, por ejemplo, 60 mg/ml). Bajo agitación constante, con una pipeta, se extrajeron 10 µl de la solución de partículas de oro y se pasaron a una S-Monovette – neutra/9ml (92 x 16 mm) de Sarstedt (REF 02.1726.001). La Monovette, en primer lugar, se abrió en un banco de trabajo estéril (cierre roscado), las 10 µl de solución de partículas de oro se aplicaron en la pared interior de la jeringa y, a continuación, se volvió a cerrar. Las Monovettes llenas se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso. Para el uso durante la realización del procedimiento descrito, las Monovettes preparadas de esta manera se llenaron con 9 ml de líquido corporal (por ejemplo, sangre) y se mezclaron con la solución de partículas de oro/PBS.

Ejemplo 4: Estudios de eficacia de medicamento en el ser humano

En el marco de un estudio prospectivo de corte longitudinal, por un médico aprobado fueron tratados en total 9 pacientes o 13 articulaciones con gonartrosis demostrada por radiografía. Según la clasificación de Kellgren-Lawrence (Kallgren J.H. y Lawrence J.S.: "Radiological Assessment of Osteo-Arthrosis", Ann. rheum. Dis. (1957), 16, 494 a 501), el grado de artrosis se clasificó en el grado 3 a 4. Todos los pacientes recibieron en un intervalo de una semana respectivamente cuatro inyecciones intraarticulares con el suero autólogo según la invención, tratado primero con otro y a continuación liberado de partículas. En caso de la existencia de un derrame intraarticular, este se eliminó mediante punción respectivamente antes de la inyección, se documentó la cantidad extraída por punción y para se congeló en 1 ml de Aliquots a menos 20 °C para su siguiente procesamiento. La documentación del resultado clínico del tratamiento se realizó con el sistema de valoración por puntos validado (sinónimo: evaluación) "KOOS" (Roos E.M, Roos H.P., Lohmander L.S., Ekdhahl C., Beynon B.D.: "Knee Injury and Osteoarthritis, Outcom Score (KOOS – development of a selfadministered outcome measure", J. Orthop. Sports Phys. Ther. 1998), 28:88-96) antes del tratamiento, así como 1, 3, 6 y 12 meses después del tratamiento. El número de puntos máximo alcanzable era de 100. Cuanto mayor fuera el número de puntos, mejor era el resultado alcanzado. Los resultados están representados gráficamente en la figura 5.

La valoración de la evaluación KOOS con respecto a los parámetros 'síntomas' y 'actividad deportiva' mostró al cabo de 3 y 6 meses una clara mejora de la sintomática clínica (véase la figura 5).

En una paciente se mostró inicialmente la formación de un derrame considerable. El derrame se eliminó por punción respectivamente antes del tratamiento de inyecciones, se documentó en cuanto a la cantidad de derrame y se examinaron los líquidos de punción sinovial en cuanto a la concentración de gelsolina. Dado que la concentración de gelsolina depende del grado de dilución de la formación de derrame, la concentración de gelsolina se refirió a la concentración de urea (Kraus y col.: Urea as a Passive Transport Marker for Arthritis Biomarker Studies, ARTHRITIS & RHEUMATISM tomo 46, nº 2, febrero de 2002, páginas 420 a 427). Los resultados están representados gráficamente en la figura 6.

Mediante la aplicación intraarticular del suero elaborado, es decir, de la sangre después de la incubación con partículas de oro y la eliminación subsiguiente de (todas) las partículas se consiguió incrementar notablemente la concentración de gelsolina intraarticular (véase la figura 6). Al mismo tiempo se produjeron una reducción de la cantidad de derrame (véase la figura 6) y, durante la siguiente evolución se produjo una clara mejora de la sintomática clínica.

Este estudio justifica por tanto el uso del medicamento para el tratamiento de la artrosis.

Ejemplo 5: Comprobación del efecto condroprotector del medicamento según la invención en el modelo de impacto de artíligo in vitro

La influencia de las sobrecargas mecánicas sobre el artíligo articular en el marco de la aparición de una artrosis es bien conocido. Existen también modelos in vitro bien establecidos y validados que examinan la influencia de la carga mecánica en explantes de cartíligo/hueso, por ejemplo el modelo de Huser y Davies (Huser C.A. y Davies M.E.: "Validation of an vitro single-impact load model of the initiation of osteoarthritis-like changes in articular cartilage", J Orthop Res., Apr 2006; 24(4):725-732). Un buen indicador para el comienzo de una degeneración de cartíligo en este tipo de modelos es la medición del contenido de proteoglicano en el medio de cultivo de las muestras de cartíligo/hueso examinadas.

En el transcurso de las investigaciones que han conducido a la presente invención, en un estudio de experimentos en animales, en el mini-cerdo "Göttinger Minipig", en 6 animales con jeringas de 9 ml que contenían respectivamente

10³ partículas de oro por animal se tomaron respectivamente 4 muestras (de 9 ml) de sangre y se incubaron según el procedimiento según la invención durante 24 h a 37 °C. A continuación del tiempo de incubación, las muestras de sangre se centrifugaron en los cilindros de jeringa y por cada jeringa (o cilindro de jeringa), el sobrenadante se

5 Paralelamente a la extracción de las muestras de sangre, a los animales correspondientes se tomaron bajo condiciones asépticas muestras de cartílago/hueso de las cabezas de fémur correspondientes y se recortaron formando bloques de 8x8x10 mm (largo/ancho/altura). El cartílago estaba intacto macroscópicamente en todos los explantes.

10 Hasta el uso en el ensayo de carga de choque (ensayo de impacto) se guardaron bloques de muestra de cartílago/hueso en el medio DMEM con la adición de 10 % de suero humano (SH), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de gentamicina y 1,25 U/ml de anfotericina B.

15 En el mismo día de la extracción de muestra se realizó el ensayo de carga de choque (ensayo de impacto). Para ello, respectivamente un bloque de muestra de cartílago – hueso/explante se dispuso en condiciones estériles en una torre de caída libre cilíndrica (“drop tower”) de polimetilmetacrilato con las medidas de 33 cm de altura y 4 cm axialmente a una distancia por debajo del émbolo de choque. El émbolo de choque tenía la forma de un cilindro con las medidas 5 cm de altura y 3,94 cm de diámetro, y su peso era de 493 g. El émbolo de choque estaba unido, a través de una rosca, al disco de choque en sí (“pieza de impacto”) que presentaba un peso de 7 g, una altura/grosor de 1 cm y un diámetro de 0,6 cm. La carga de choque/el impacto se realizaba una vez por bloque de muestra de cartílago – hueso en la “drop tower” mediante la caída libre del émbolo de choque con disco de choque (impactor) sobre la muestra desde 15cm de altura. La carga de choque era de 0,736 J sobre una superficie de cartílago de 28.3 mm².

25 Los bloques de muestra de cartílago – hueso/explantes se dividieron en 3 grupos:

- explantes sin tratamiento de choques = “controles no impactados” = “controles 0”)
- explantes con tratamiento de choques = “controles impactados” = “controles de choques”
- 30 • explantes con tratamiento de choques e incubación subsiguiente con el suero sanguíneo elaborado según la invención, enriquecido con proteínas

A continuación del tratamiento de choques, los preparados de hueso y cartílago tratados así como los controles 0 se lavaron 3 veces con PBS y se trasladaron a placas de cultivo de 12 well. En cada explante se aplicaron 3 ml del medio de tratamiento correspondiente y se incubó bajo condiciones estandarizadas (37 °C, 5 % de CO₂) en la incubadora. El medio de cultivo se cambió cada 72 horas.

El suero sanguíneo enriquecido con proteínas, elaborado según la invención, se añadió a los explantes del grupo de explantes correspondiente el día 0 y el día 7.

40 Los días 2, 7 y 14, en todas las preparaciones de ensayo se midió el contenido de proteoglicano en el medio de cultivo. Para ello, se usó Blyscan Gylcosaminoglycan Assay de la empresa Biocolor Ltd., (Carrickfergus, UK). Los resultados están representados en el gráfico de la figura 7. El contenido de proteoglicano se indica como concentración media de glycosaminoglicano (GAG) en µg/ml.

45 El análisis de la liberación de proteoglicano muestra que en los tres grupos, a saber, los controles 0 y los dos explantes/preparados de cartílago-hueso tratados con choques/impactados aumenta con el tiempo la cantidad de proteoglicano.

50 En los explantes/preparados de cartílago-hueso tratados con el suero sanguíneo enriquecido con proteínas, elaborados según la invención, este aumento sin embargo es sólo poco más fuerte que en los controles no impactados (controles 0), mientras los explantes (preparados de cartílago-hueso) tratados con choques/impactados presentan, sin tratamiento con suero correspondiente, un aumento muchísimo mayor.

55 Este ensayo demuestra por tanto el efecto condroprotector del medicamento según la invención.

Tabla 1: Procedimiento de análisis multiparamétrico

Proteína	T0	Control T24	h T24	Inv T24
GS	1990	1798	1634	21260
IL-4	1	6	7	6
IL-10	5	444	438	447
IL-13	2	2	2	2
IL-1Ra	1	5130	5387	603
IL-1β	1	808	854	798
TNF-a	4	78	56	2444

ES 2 658 269 T3

G-CSF	6	1454	1367	1890
GM-CSF	10	53	45	49
IFN-g	34	302	312	320
SCGF-β	64	800	800	1000
MIP-1a	1	4500	4400	4300
MIP-1β	84	2330	2100	2150
VEGF	154	286	290	282
IL-18	27	524	520	540
MCP-3	1	56	80	1019
SDF-a	64	780	852	993
FGF básico	31	73	79	62
GROa	40	2460	2800	4800

REIVINDICACIONES

- 5 1. Sangre enriquecida con citoquina y gelsolina para el uso como medicamento, que se obtiene de tal forma que se recoge sangre en un recipiente que contiene partículas de oro y que se incuba esta mezcla de sangre y partículas de oro.
2. Sangre para el uso según la reivindicación 1, **caracterizada porque** se incuba y, a continuación, las partículas de oro se separan de la sangre y se desechan.
- 10 3. Sangre para el uso según la reivindicación 1, **caracterizada porque** partículas de oro y células de sangre y/u otros componentes insolubles se separan de la sangre y se desechan.
- 15 4. Sangre para el uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada porque** las partículas de oro presentan un tamaño de aprox. 1 μm .
5. Sangre para el uso según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada porque** las partículas de oro están presentes en una cantidad de 10^3 a 10^4 partículas de oro por recipiente de 10 ml o de 0,3 mg de partículas de oro con un diámetro de 1 μm por 1 ml de sangre/recipiente.
- 20 6. Sangre para el uso según una de las reivindicaciones 1 a 5, para el uso en el tratamiento de la artrosis.

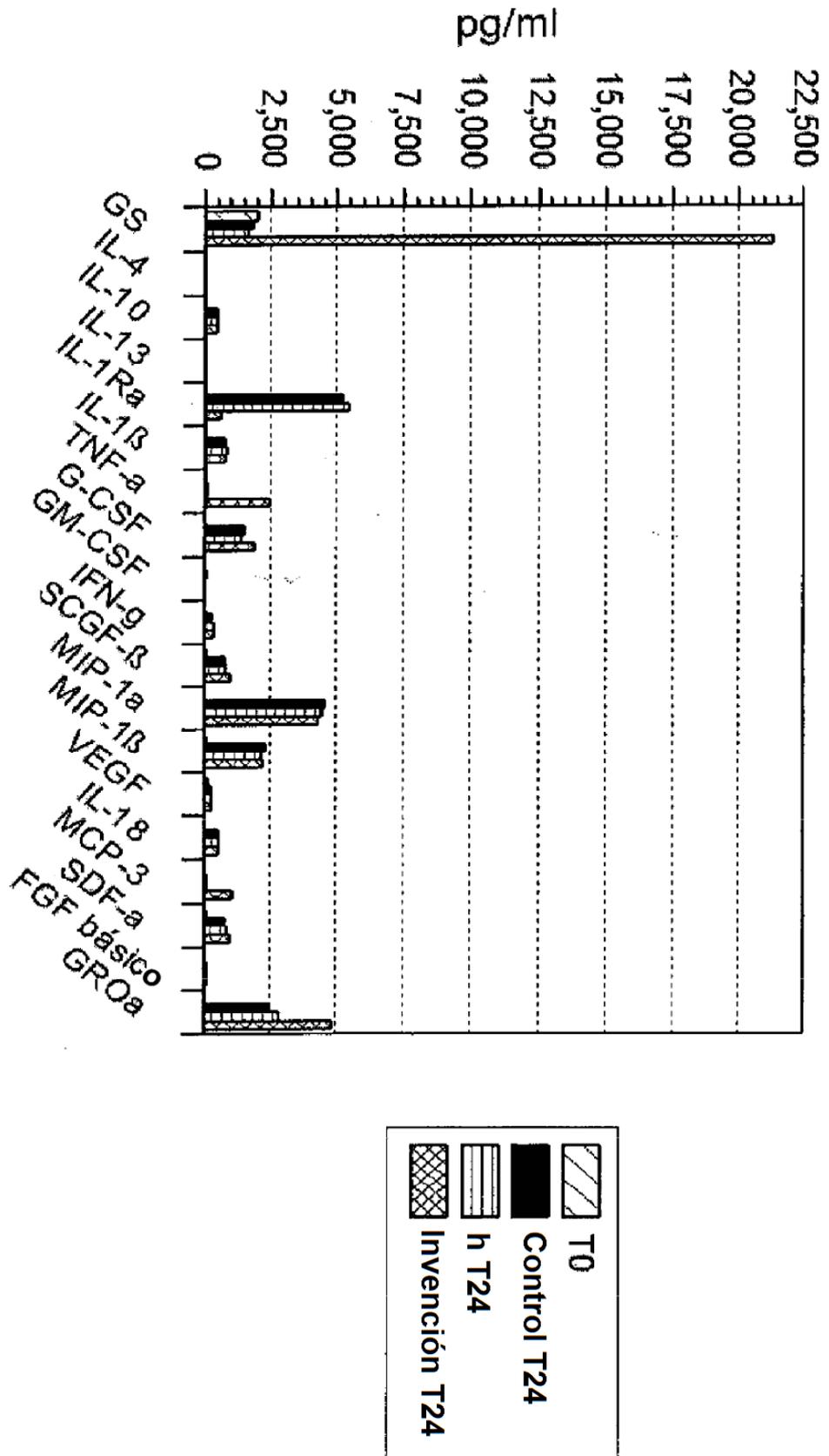


Fig. 2

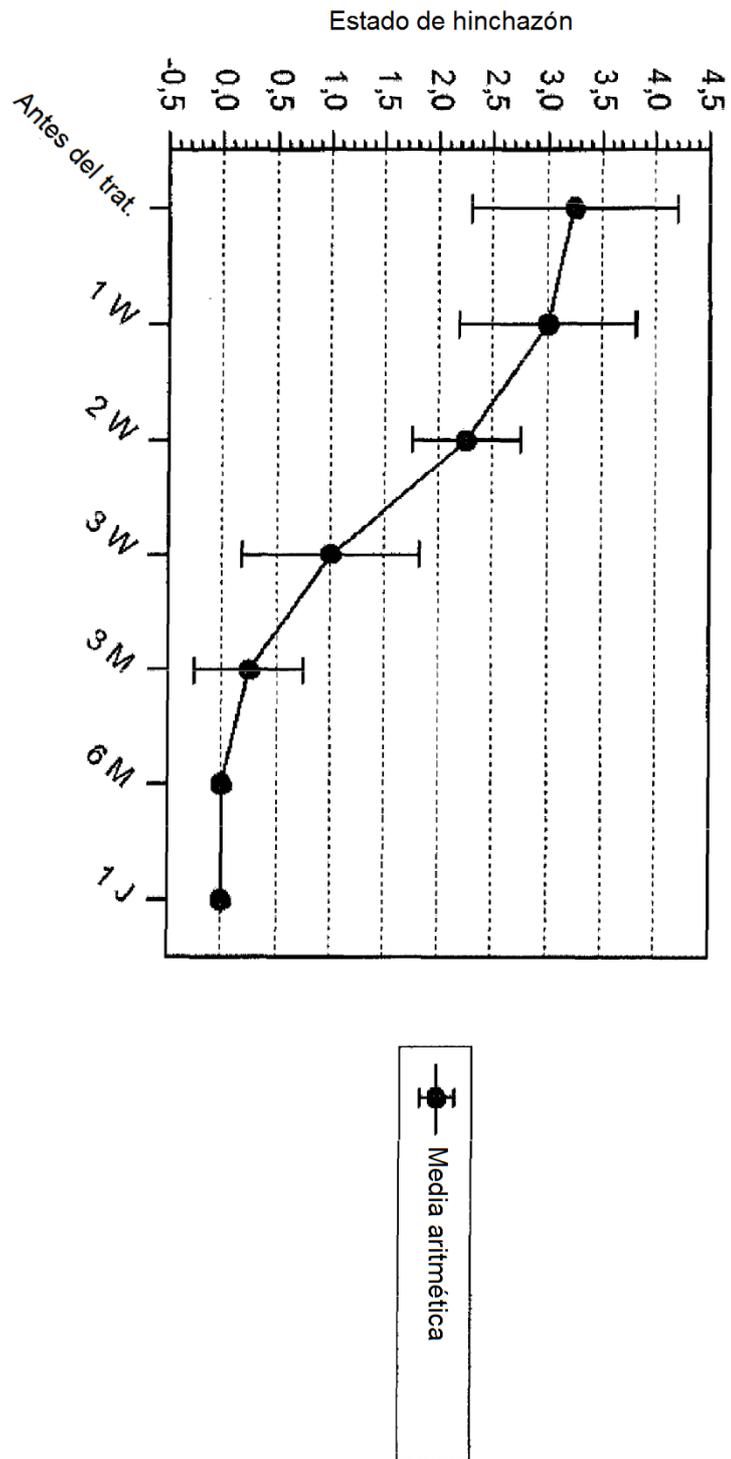
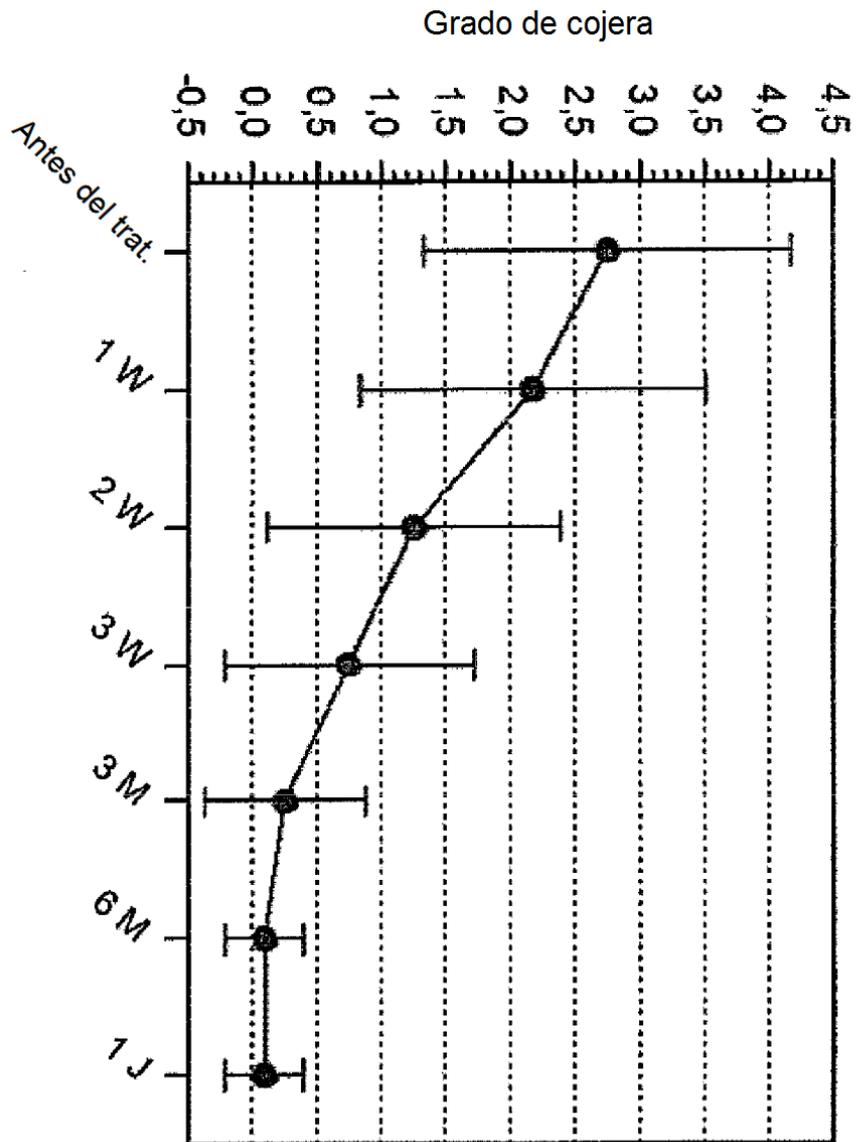


Fig. 3



Media aritmética

Fig. 4

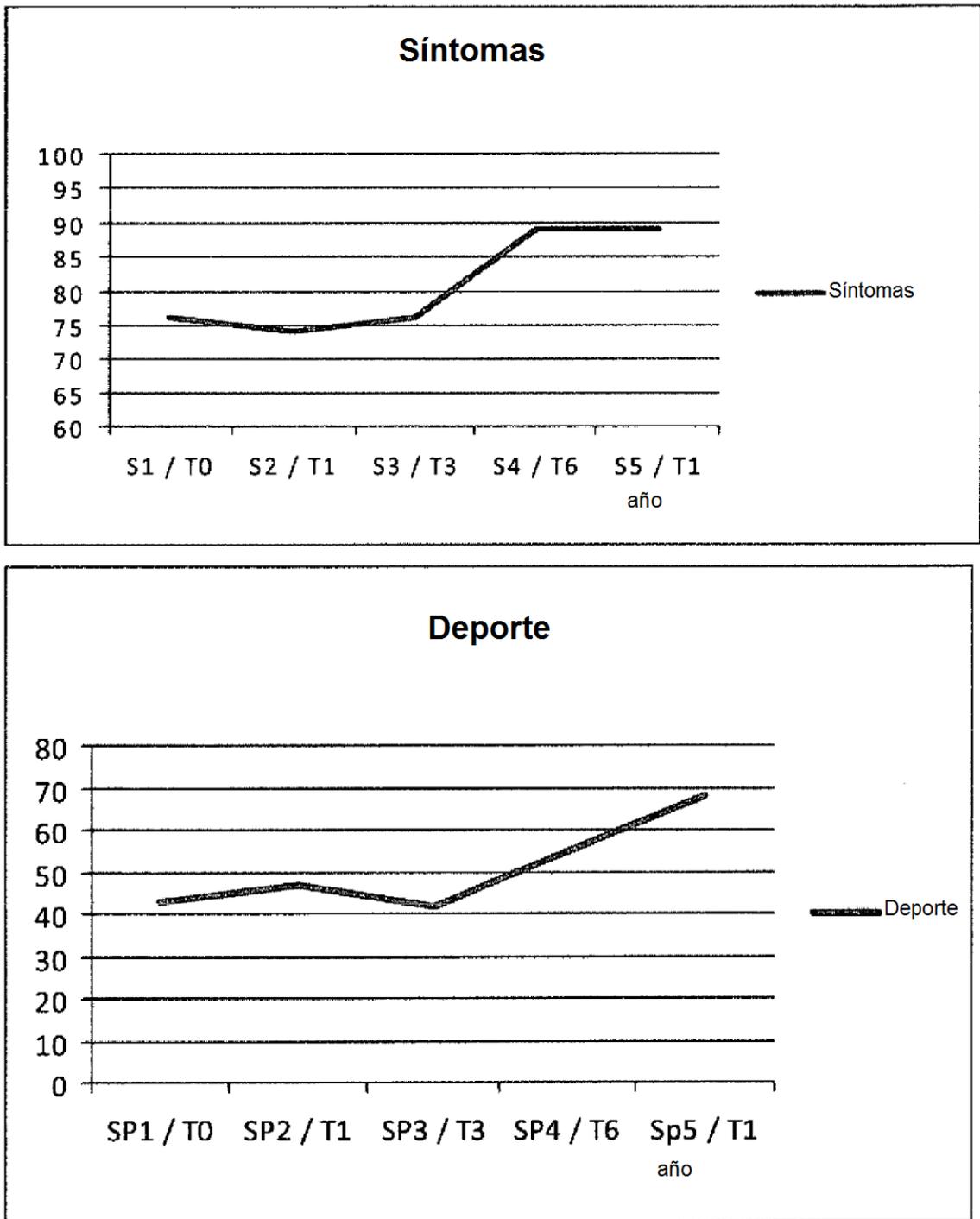


Fig. 5

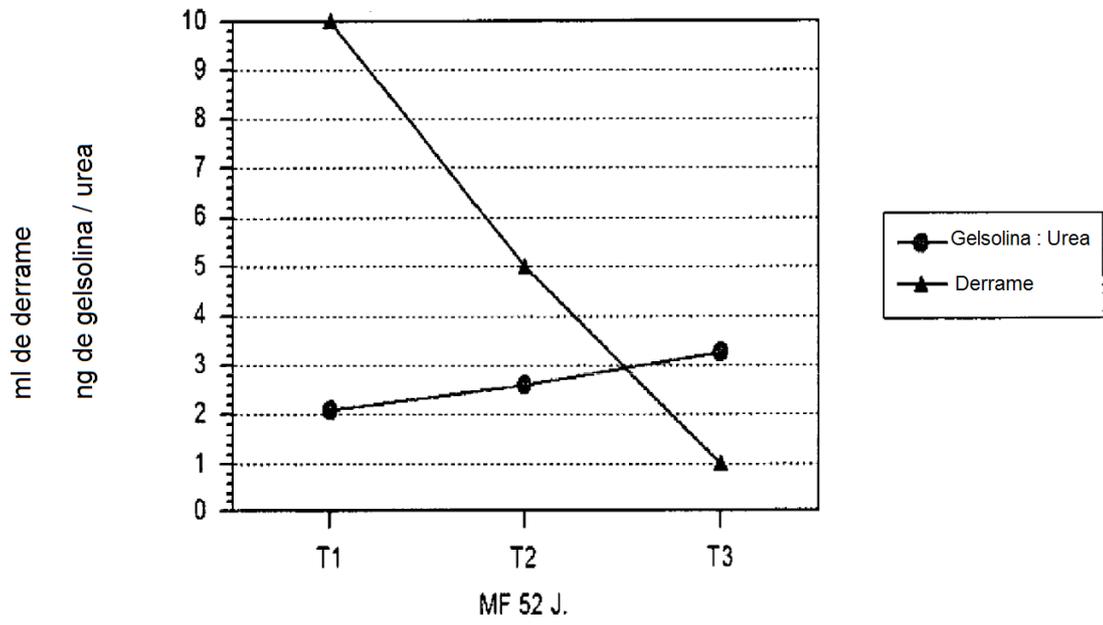


Fig.6

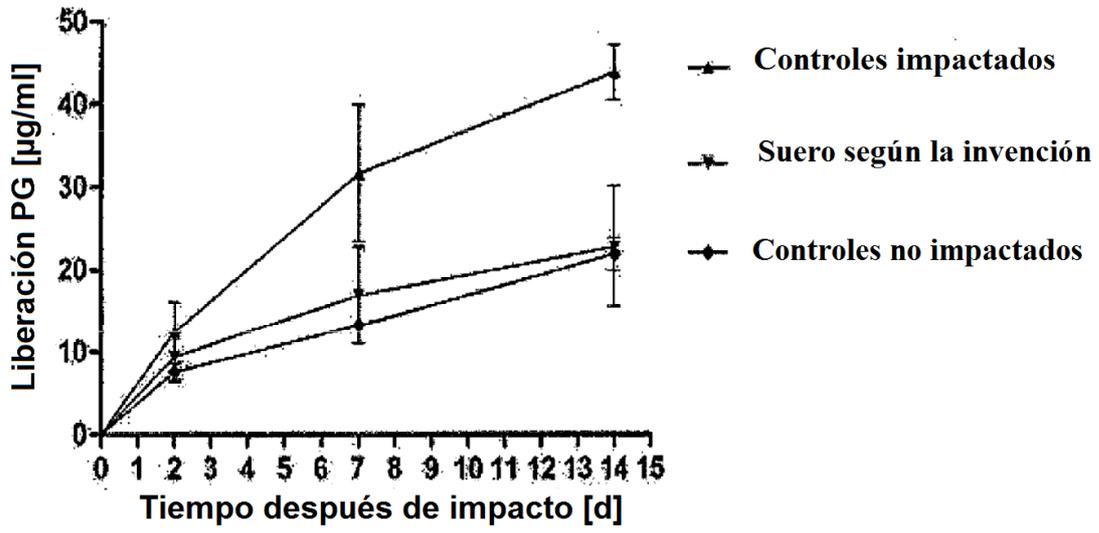


Fig. 7