

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 694**

51 Int. Cl.:

A61K 35/16 (2015.01)

A61P 19/00 (2006.01)

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 35/32 (2015.01)

A61K 31/728 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2013 PCT/EP2013/070085**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014 WO14049063**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2013 E 13780080 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2900247**

54 Título: **Composiciones que comprenden plasma tratado con solvente/detergente y ácido hialurónico para su uso en el tratamiento de trastornos musculoesqueléticos**

30 Prioridad:

26.09.2012 EP 12186027

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

23.04.2018

73 Titular/es:

BONE THERAPEUTICS S.A. (50.0%)

Rue Auguste Piccard 37

6041 Gosselies, BE y

ENRICO BASTIANELLI S.P.R.L. (50.0%)

72 Inventor/es:

BASTIANELLI, ENRICO y

ALBARANI, VALENTINA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 664 694 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden plasma tratado con solvente/detergente y ácido hialurónico para su uso en el tratamiento de trastornos musculoesqueléticos

5

Campo

La invención se refiere a formulaciones farmacéuticas y su uso para tratar enfermedades tal como enfermedades musculoesqueléticas, y más particularmente enfermedades óseas o de las articulaciones.

10

Antecedentes

Las enfermedades o trastornos musculoesqueléticos pueden afectar a los huesos, músculos, articulaciones, cartílago, tendones, ligamentos y otros tejidos conjuntivos que soportan y unen tejidos y órganos. Estas enfermedades se pueden desarrollar a lo largo del tiempo o pueden resultar, por ejemplo, por el uso excesivo del sistema musculoesquelético o de traumatismo. Las enfermedades musculoesqueléticas pueden ser difíciles de diagnosticar y/o tratar debido a la estrecha relación del sistema musculoesquelético con otros sistemas internos.

15

Un enfoque posible y prometedor para el tratamiento de enfermedades musculoesqueléticas y en particular de enfermedades óseas y enfermedades de las articulaciones es el trasplante de células madre mesenquimatosas (MSC) capaces de experimentar diferenciación osteogénica o condrogénica o de células que están comprometidas hacia el linaje osteoblástico o condroblástico.

20

Las MSC se han usado previamente para tratar trastornos óseos (Gangji et al. Expert Opin Biol Ther, 2005, vol. 5, 437-42). Sin embargo, aunque tales células madre relativamente no diferenciadas se pueden trasplantar, no están comprometidas hacia el linaje osteoblástico o condroblástico y, por tanto, una proporción considerable de las células madre así trasplantadas puede finalmente no contribuir a la formación del tejido deseado. Además, la cantidad de tales células madre obtenibles de cualquier tejido fuente posible es con frecuencia insatisfactoria.

25

La administración local de principios farmacéuticos activos, y en particular la administración localizada intra- o peri-ósea o intra- o peri-articular de tales, es de gran interés en enfermedades musculoesqueléticas, que ayuda a incrementar la concentración local y eficacia de los principios y evita potenciales efectos secundarios sistémicos. Por ejemplo, la inyección intra-articular de ácido hialurónico (AH) de alto peso molecular fue eficaz para restablecer la integridad mecánica de articulaciones afectadas por artrosis. Sin embargo, AH de alto peso molecular tiene la desventaja de no proporcionar un andamiaje completamente satisfactorio debido a la gelificación. En otro ejemplo, el implante de médula ósea en la zona osteonecrótica demostró efectos beneficiosos en pacientes que padecen osteonecrosis no traumática aséptica de la cabeza femoral (Gangji et al. 2005, anteriormente).

30

35

Por tanto, existe una necesidad continua para formulaciones farmacéuticas adicionales y/o mejoradas configuradas para la administración localizada, tal como administración intra-ósea, peri-ósea, intra-articular o peri-articular, o para administración intra-tendón, peri-tendón, intra-ligamento o peri-ligamento. Las formulaciones particularmente útiles deben mostrar o alcanzar consistencia de gel tras la administración, mediante lo cual los principios farmacéuticos activos incluidos en las formulaciones se retienen en el gel *in situ* y se liberan gradualmente del gel, es decir, liberación sostenida o lenta. Además, donde las formulaciones contienen células terapéuticas, la consistencia de gel puede proporcionar medio que apoya las células y puede asegurar la proximidad de las células y sustancias beneficiosas opcionales, tal como factores de crecimiento que estimulan la supervivencia, proliferación (propagación) y/o diferenciación de las células.

40

45

El plasma fresco congelado (PFC) se prepara en bancos de sangre en el mundo principalmente como un subproducto de preparación de concentrado de glóbulos rojos. Con vista a mejorar la seguridad del PFC, se ha desarrollado el tratamiento con solvente/detergente (S/D) de plasma en el curso de la década de 1980, produciendo un producto manufacturado en 1992. El tratamiento con S/D y el plasma tratado con S/D se describen, entre otros, en Horowitz et al. 1992; documentos US 4.764.369; EP 0 322 786; y US 2002/018777. El tratamiento con S/D de plasma altera las membranas de virus con envuelta lipídica, células y la mayoría de los protozoos, mientras que deja los factores de coagulación lábiles intactos. El tratamiento tiene una eficacia variable contra bacterias y es sustancialmente ineficaz contra virus sin envuelta lipídica. Comparado con el PFC, el plasma tratado con S/D muestra seguridad extremadamente alta con respecto a lesión pulmonar aguda relacionada con transfusión (TRALI), probabilidad significativamente menor de provocar reacciones alérgicas, y baja variación entre lotes en el nivel en plasma de factores de coagulación. El documento JP2011229508 (resumen) se refiere a una composición celular que comprende mioblastos esqueléticos embebidos en plasma que incluye gel.

50

55

60

El documento WO 2009/016451 se refiere al uso de una sustancia derivada de sangre homóloga o autóloga sola o en combinación con ácido hialurónico para tratar una enfermedad articular, dolor articular o piel. Park et al. 2009 se refiere a la combinación de fibrina y ácido hialurónico como un vehículo de administración de células para condrocitos de conejo con aplicaciones en reparación de cartílago.

65

Compendio

Los presentes inventores han encontrado formulaciones farmacéuticas que abordan uno o más de los problemas anteriormente mencionados en la técnica.

5 Un aspecto de la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende plasma tratado con solvente/detergente (plasma S/D) y ácido hialurónico o un derivado del mismo, en donde el derivado de ácido hialurónico es una sal de ácido hialurónico, un éster de ácido hialurónico con un alcohol de la serie alifática, heterocíclica o cicloalifática, o una forma sulfatada de ácido hialurónico.

10 Como se evidencia en la sección de ejemplos, las formulaciones que aplican los principios de la presente invención tienen la propiedad ventajosa de gelificar *in vitro* en contacto con líquidos corporales de sujetos, tal como sujetos humanos, especialmente suero o líquidos sinoviales, por ejemplo, de pacientes que padecen artrosis de rodilla o enfermedades óseas. Se muestra que tales formulaciones que aplican los principios de la presente invención
 15 gelifican *in vitro* en contacto con líquidos corporales tal como sangre completa, y por tanto, tienen la propiedad de gelificar *in situ* (coagulación *in situ*) cuando se ponen en contacto con líquidos corporales tal como sangre completa. Por ejemplo, la presente formulación puede proporcionar ventajosamente un medio natural de factores de crecimiento autólogos de la sangre completa. Las formulaciones muestran comportamiento de formación de gel particularmente bueno *in situ* (es decir, cuando se administran en un lugar o sitio determinado (por ejemplo, hueso, articulación, tendón o ligamento) del cuerpo de un sujeto), produciendo ventajosamente formulaciones viscosas. Por
 20 ejemplo, una vez inyectadas en defectos articulares, las presentes formulaciones permiten la gelificación *in situ* y restablecen los estados fisiológicos y reológicos de una articulación artrítica tal como una articulación artrítica de rodilla. Además, esta cualidad viscosa puede asegurar administración localizada y/o liberación sostenida de componentes de las formulaciones, es decir, del plasma S/D, que puede comprender sustancias biológicas beneficiosas tal como factores de crecimiento endógenos, y/o del glucosaminoglucano. La cualidad viscosa también puede permitir incorporar principio(s) farmacéutico(s) activo(s) adicional(es) (tal como, sin limitación, una composición celular, un compuesto farmacéutico activo, una proteína, un péptido, y/o una molécula orgánica pequeña) en las formulaciones, y de esta manera alcanzar administración localizada y/o liberación sostenida de
 25 tal(es) ingrediente(s). Los inventores también prevén que la cualidad viscosa pueda proteger los componentes de la formulación y/o ingrediente(s) farmacéutico(s) activo(s) adicional(es) incluidos en la misma del medio físico, mejorando de esta manera la estabilidad global (por ejemplo, estabilidad contra degradación enzimática) de los componentes e ingredientes *in vivo*. Los inventores postulan además que la cualidad viscosa puede permitir mejorar la función articular por una acción lubricante extendida en la articulación, restableciendo mejor de esta manera la integridad mecánica de la articulación. Los inventores también prevén que las formulaciones puedan permitir mejorar
 30 la cicatrización del hueso por una acción osteoinductora.

La formulación farmacéutica puede comprender típicamente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, solventes, soportes, diluyentes, etc.), particularmente excipientes compatibles con el modo pretendido
 40 de administración de la formulación, tal como en particular administración parenteral y preferiblemente intra-ósea, peri-ósea, intra-articular, o peri-articular de la formulación, o para administración intra-tendón, peri-tendón, intra-ligamento o peri-ligamento de la formulación.

La formulación farmacéutica se puede producir por un método que comprende combinar (por ejemplo, mezclar o incluir en un kit de partes) el plasma S/D y el glucosaminoglucano; tales métodos están abarcados en el presente
 45 documento. Por tanto, el glucosaminoglucano se puede indicar adecuadamente como exógeno o añadido de forma exógena al plasma S/D, o como proporcionado en adición al plasma S/D.

La formulación farmacéutica se puede configurar para la administración separada, simultánea o secuencial en cualquier orden del plasma S/D y el glucosaminoglucano y, cuando se incluyen, el/los principio(s) farmacéutico(s) activo(s) adicional(es). Según esto, la formulación farmacéutica puede ser una mezcla de todos sus constituyentes
 50 individuales, o puede ser una combinación, tal como un kit de partes, que comprende los constituyentes individuales por separado o que comprende mezcla(s) de dos o más, pero no todos de los constituyentes individuales. Por tanto, la formulación puede estar constituida como un kit de partes que comprende plasma S/D y un glucosaminoglucano.

La formulación farmacéutica se puede proporcionar en un dispositivo médico. Tal dispositivo médico ventajosamente permite la administración parenteral, tal como la administración intra-ósea, peri-ósea, intra-articular, o peri-articular, o para administración intra-tendón, peri-tendón, intra-ligamento o peri-ligamento de la formulación a un sujeto en
 55 necesidad de ello.

Preferiblemente, el plasma S/D puede ser plasma S/D humano, de modo que las formulaciones farmacéuticas que comprenden plasma S/D humano son particularmente adecuadas para la administración a sujetos humanos.

En ciertas formas de realización, el glucosaminoglucano se puede seleccionar del grupo que consiste en ácido hialurónico y derivados del mismo, un proteoglucano y derivados del mismo, un sulfato de condroitina, un sulfato de
 65 queratán, un quitosano y derivados del mismo, una quitina y derivados de la misma. La formulación puede comprender uno o más glucosaminoglucanos. La formulación puede, por tanto, comprender un glucosaminoglucano

o una mezcla de glucosaminoglucanos seleccionados del grupo que consiste en ácido hialurónico y derivados del mismo, un proteoglucano y derivados del mismo, un sulfato de condroitina, un sulfato de queratán, un quitosano y derivados del mismo, una quitina y derivados de la misma.

5 Sin limitación, la formulación farmacéutica puede comprender el glucosaminoglucano en una concentración que varía desde aproximadamente 0,10 mg/ml hasta aproximadamente 200 mg/ml, preferiblemente desde aproximadamente 1,0 mg/ml hasta aproximadamente 100 mg/ml, más preferiblemente desde aproximadamente 2,0 mg/ml hasta aproximadamente 50 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml o aproximadamente 40 mg/ml.

10 Típicamente, una inyección intra- o peri-ósea o una inyección intra- o peri-articular puede tener un volumen de entre aproximadamente 2 ml y aproximadamente 4 ml.

15 Donde el glucosaminoglucano muestra beneficio terapéutico por si mismo, se puede incluir en una cantidad terapéuticamente eficaz, tal como las cantidades ejemplares enumeradas en este párrafo.

En formas de realización particularmente preferidas, el glucosaminoglucano puede ser ácido hialurónico o un derivado del mismo.

20 Sin limitación, los derivados adecuados pueden ser sales de ácido hialurónico, tal como preferiblemente hialuronato de sodio. El ácido hialurónico o derivado del mismo puede tener una masa molecular baja (< 900 kDa) o alta (> 900 kDa). Particularmente preferidos pueden ser ácido hialurónico o derivados del mismo con masa molecular alta (> 900 kDa). Por ejemplo, el ácido hialurónico o derivado del mismo puede tener una masa molecular que varía desde aproximadamente 1×10^6 Da a aproximadamente 6×10^6 Da o más, tal como que varía desde aproximadamente 1×10^6 Da a aproximadamente 4×10^6 Da, tal como que varía desde aproximadamente $1,3 \times 10^6$ Da a aproximadamente 3×10^6 Da.

25 Sin limitación, la formulación farmacéutica puede comprender el ácido hialurónico o derivado del mismo en una concentración que varía desde aproximadamente 0,10 mg/ml hasta aproximadamente 200 mg/ml, preferiblemente desde aproximadamente 1,0 mg/ml hasta aproximadamente 100 mg/ml, más preferiblemente desde aproximadamente 2,0 mg/ml hasta aproximadamente 50 mg/ml.

30 En ciertas formas de realización, la formulación farmacéutica puede comprender uno o más otros ingredientes además del plasma S/D y el glucosaminoglucano. En otras formas de realización, el plasma S/D y el glucosaminoglucano pueden ser los únicos componentes de la formulación; por tanto, en tales formas de realización la formulación farmacéutica puede consistir en o consistir esencialmente en el plasma S/D y glucosaminoglucano. En aún formas de realización adicionales, la formulación farmacéutica puede comprender uno o más otros ingredientes además del plasma S/D y el glucosaminoglucano, pero tales ingredientes adicionales no son ingredientes farmacéuticos activos.

35 En ciertas formas de realización, la formulación farmacéutica puede comprender además ventajosamente uno o más ingredientes farmacéuticos activos.

40 La aplicabilidad de la presente invención no está limitada a ningún principio farmacéutico activo o clase de principios farmacéuticos activos. El principio farmacéutico activo puede ser farmacológicamente activo él mismo, o se puede convertir en una especie farmacológicamente activa mediante un proceso químico o enzimático en el cuerpo, es decir, el principio farmacéutico activo puede ser un profármaco. Las presentes formulaciones farmacéuticas pueden ser particularmente útiles para principios farmacéuticos activos poco estables. Los ejemplos ilustrativos no limitantes de principios farmacéuticos activos poco estables incluyen péptidos y proteínas tal como factores de crecimiento, principios activos de tipo peptídico, anticuerpos y vacunas, ARN interferente pequeño (ARNip), ADN, hormonas, etc.

45 El término "principio farmacéutico activo" también abarca cualquier sal, éster, N-óxido o profármaco farmacéuticamente activo del compuesto o sustancia del título.

50 Además, se pueden incluir como el componente fármaco la combinación de dos o más principios farmacéuticos activos o combinaciones de dosis. En este caso, la liberación de cada principio activo puede ser idéntica o diferente tal como, por ejemplo, en caso de una combinación de dos principios activos en el que el primero se presenta como una forma de liberación inmediata y el segundo como una de liberación controlada. Similarmente, también se puede obtener una combinación de liberación inmediata y liberación controlada para el mismo principio activo, para proporcionar un efecto rápido y sostenido.

55 En ciertas formas de realización, la formulación farmacéutica puede comprender además suero. La adición de suero a la presente formulación puede permitir a un cierto nivel mejorar la gelificación de la formulación.

60 Por ejemplo, el suero puede ser alogénico o autólogo con respecto al sujeto que recibe la formulación. Preferiblemente, el suero puede ser suero humano, de modo que las formulaciones farmacéuticas que comprenden

además suero humano son particularmente adecuadas para la administración a sujetos humanos. Por ejemplo, la formulación puede contener suero y plasma S/D de modo que el valor calculado como (volumen de suero en la formulación)/(volumen de suero en la formulación + volumen de plasma S/D en la formulación) esté entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,40, preferiblemente entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 0,15, más preferiblemente aproximadamente 0,10.

En ciertas formas de realización, la formulación farmacéutica puede comprender además sangre completa o un componente fraccionado de sangre completa. La adición de sangre completa o dicho componente fraccionado, preferiblemente de sangre completa, a la presente formulación puede permitir al menos parcialmente mejorar la gelificación de la formulación.

Las presentes formulaciones que comprenden sangre completa o dicho componente fraccionado de la misma ventajosamente comprenden factores de crecimiento derivados de plaquetas útiles en medicina regenerativa, en particular, para la estimulación de la reparación de defectos de hueso, cartílago, tendón o ligamentos o para sustituir huesos, cartílagos, tendones o ligamentos dañados (Gobbi et al., 2009; Grimaud et al., 2002; Cole et al., 2010).

Por ejemplo, la sangre completa puede ser alogénica o autóloga con respecto al sujeto que recibe la formulación. Preferiblemente, la sangre completa puede ser sangre completa humana, de modo que las formulaciones farmacéuticas que además comprenden sangre completa humana son particularmente adecuadas para la administración a sujetos humanos. Por ejemplo, la formulación puede contener sangre completa y plasma S/D de modo que el valor calculado como (volumen de sangre completa en la formulación)/(volumen de sangre completa en la formulación + volumen de plasma S/D en la formulación) esté entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,40, preferiblemente entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 0,15, más preferiblemente aproximadamente 0,10.

En formas de realización preferidas, el uno o más ingredientes farmacéuticos activos se selecciona, cada uno independientemente, del grupo que consiste en: una composición celular, un compuesto farmacéutico activo, una proteína, un péptido, y una molécula orgánica pequeña.

Preferiblemente, la composición celular puede comprender células madre mesenquimatosas (MSC), osteoprogenitores, células osteoblásticas, osteocitos, células condroblásticas y/o condrocitos. La formulación farmacéutica, por tanto, permite la administración de tal composición celular. Esta cualidad viscosa de las presentes formulaciones farmacéuticas puede asegurar administración localizada de tal composición celular. La cualidad viscosa de las presentes formulaciones farmacéuticas puede asegurar la administración localizada de y medio de apoyo adecuado para las células administradas.

En particular preferiblemente, las células de la composición celular pueden ser células animales, preferiblemente células de animal de sangre caliente, más preferiblemente células de mamífero, tal como células humanas o células no humanas, y lo más preferiblemente células humanas.

En formas de realización adicionales, el compuesto farmacéutico activo puede ser una sustancia antiinflamatoria. En formas de realización preferidas, el compuesto farmacéutico activo puede ser un agonista de receptor alfa-2-adrenérgico. Preferiblemente, el agonista de receptor alfa-2-adrenérgico se puede seleccionar del grupo que consiste en clonidina y derivados de la misma.

En ciertas formas de realización, el agonista de receptor alfa-2-adrenérgico se puede seleccionar del grupo que consiste en clonidina y derivados de la misma, incluyendo 2,6-dimetilclonidina, 4-azidoclonidina, 4-carboxiclonidina-metil 3,5-diclorotirosina, 4-hidroxiclonidina, 4-yodoclonidina, alinidina, apraclonidina, cloretilclonidina, 4-isotiocianato de clonidina, 4-metilisotiocianato de clonidina, receptor de clonidina, sustancia que desplaza a clonidina, hidroxifenacetil aminoclonidina, N,N'-dimetilclonidina, p-aminoclonidina, y tiamenidina; imidazolidinas, incluyendo imidazolininas, impromidina, detomidina, medetomidina, dexmedetomidina, levamisol, losartano, lofexidina, miconazol, nafazolina, niridazol, nitroimidazoles, ondansetron, oximetazolina, fentolamina, tetramisol, tiamazol, tizanidina, tolazolina, trimetafán; imidazoles, incluyendo 4-(3-butoxi-4-metoxibencil) imidazolidin-2-ona, ácido urocánico, aminoimidazol carboxamida, antazolina, biotina, disulfuro de bis (4-metil-1-homo piperaciniiltiocarbonilo), carbimazol, cimetidina, clotrimazol, creatinina, dacarbazina, dexmedetomidina, econazol, enoximona, etimizol, etomidato, fadrozol, fluspirileno, idazoxán, mivazerol; guanidinas, incluyendo agmatina, betanidina, biguanidas, cimetidina, creatina, gabexato, guanetidina, sulfato de guanetidina, guanclorina, guanfacina, guanidina, guanoxabenz, impromidina, yodo-3 bencilguanidina, metilguanidina, mitoguazona, nitrosoguanidinas, pinacidil, robenidina, sulfaguanidina, zanamivir; alfa-metiinoreferina, azepexol, 5-bromo-6-(2 imidazolidina-2-ilamino) quinoxalin, fumarato de formoterol, indoramina, 6-alil-2-amino-5,6,7,8-tetrahidro4H-tiazolo [4,5-d]acepina diHCl, nicergolina, rilmenidina, y xilazina.

En ciertas formas de realización, la formulación farmacéutica puede comprender además una o más sustancias con propiedades osteogénicas, osteoinductoras y/o osteoconductoras. En formas de realización preferidas, tales sustancias se pueden seleccionar del grupo que comprende o consiste en un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), preferiblemente FGF-2, un factor de crecimiento transformante beta (TGFB), preferiblemente TGFB-1, factor

de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), interleucina-8 (IL-8), una proteína morfogenética ósea (BMP), por ejemplo una cualquiera o más de BMP-2, BMP-4, BMP-6 y BMP-7, hormona paratiroidea (PTH), proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrp) y factor de células madre (SCF).

5 Por tanto, en ciertas formas de realización, la proteína farmacéutica activa puede ser un factor de crecimiento, preferiblemente un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en un FGF, un TGFB, PDGF, IL-8, una BMP, PTH, PTHrp y SCF, más preferiblemente un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en FGF-2, TGFB-1, PDGF, IL-8, BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, PTH, PTHrp y SCF.

10 Preferiblemente, la formulación farmacéutica se puede configurar para la administración parenteral, tal como inyección parenteral, más preferiblemente para administración intra-ósea, peri-ósea, intra-articular o peri-articular, tal como inyección intra-ósea, peri-ósea, intra-articular o peri-articular, o para administración intra-tendón, peri-tendón, intra-ligamento o peri-ligamento, tal como, inyección intra-tendón, peri-tendón, intra-ligamento o peri-ligamento.

15 Un aspecto relacionado se refiere a la formulación farmacéutica como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento (incluyendo a lo largo de la presente especificación medidas terapéuticas y/o preventivas) de una enfermedad musculoesquelética. Preferiblemente, dicha enfermedad musculoesquelética puede ser una enfermedad ósea o una enfermedad de articulaciones. Alternativamente o además, dicha enfermedad musculoesquelética puede afectar los tendones y/o ligamentos.

20 También se pretende el uso de la formulación farmacéutica como se ha descrito anteriormente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad musculoesquelética, preferiblemente una enfermedad ósea o una enfermedad de las articulaciones. Alternativamente o además, dicha enfermedad musculoesquelética puede afectar los tendones y/o ligamentos.

25 También se pretende un método para tratar una enfermedad musculoesquelética, preferiblemente una enfermedad ósea o una enfermedad de las articulaciones (alternativamente o además, dicha enfermedad puede afectar los tendones y/o ligamentos), en un sujeto en necesidad de tal tratamiento, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de la formulación farmacéutica como se ha descrito anteriormente.

30 Ampliando estos hallazgos, los presentes inventores han advertido el uso de las formulaciones anteriormente mencionadas como un excipiente farmacéutico, más preferiblemente, como un excipiente farmacéutico de liberación sostenida o liberación lenta. Según esto, un aspecto relacionado proporciona el uso de una formulación que comprende plasma S/D y un glucosaminoglucano como un excipiente farmacéutico, preferiblemente como un excipiente farmacéutico en una formulación farmacéutica configurada para la administración parenteral, más preferiblemente para administración intra-ósea, peri-ósea, intra-articular o peri-articular, o para administración intra-tendón, peri-tendón, intra-ligamento o peri-ligamento.

35 Por tanto, también se divulga una formulación que comprende plasma S/D y un glucosaminoglucano para uso como un excipiente farmacéutico, más preferiblemente para uso como un excipiente farmacéutico de liberación sostenida o liberación lenta, preferiblemente para uso como un excipiente farmacéutico para el tratamiento de una enfermedad musculoesquelética, preferiblemente una enfermedad ósea o una enfermedad de las articulaciones (alternativamente o además, dicha enfermedad puede afectar los tendones y/o ligamentos). Se divulga además el uso de una formulación que comprende plasma S/D y un glucosaminoglucano para la fabricación de un excipiente farmacéutico, más preferiblemente un excipiente farmacéutico de liberación sostenida o liberación lenta, preferiblemente para la fabricación de un excipiente farmacéutico para el tratamiento de una enfermedad musculoesquelética, preferiblemente una enfermedad ósea o una enfermedad de las articulaciones (alternativamente o además, dicha enfermedad puede afectar los tendones y/o ligamentos). Aun más se proporciona un método para tratar una enfermedad musculoesquelética, preferiblemente una enfermedad ósea o una enfermedad de las articulaciones (alternativamente o además, dicha enfermedad puede afectar los tendones y/o ligamentos) en un sujeto en necesidad de tal tratamiento, que comprende administrar a dicho sujeto una formulación que comprende plasma S/D y un glucosaminoglucano como un excipiente farmacéutico, más preferiblemente un excipiente farmacéutico de liberación sostenida o liberación lenta.

40 Preferiblemente, el plasma S/D puede ser plasma S/D humano, de modo que las formulaciones farmacéuticas que comprenden plasma S/D humano son particularmente adecuadas para la administración a sujetos humanos.

45 También se divulga en el presente documento el uso de plasma S/D como un excipiente farmacéutico, preferiblemente como un excipiente farmacéutico en una formulación farmacéutica configurada para la administración parenteral, más preferiblemente, para administración intra-ósea, peri-ósea, intra-articular o peri-articular, o para administración intra-tendón, peri-tendón, intra-ligamento o peri-ligamento.

50 Por tanto, se divulga además plasma S/D para uso como un excipiente farmacéutico, más preferiblemente para uso como un excipiente farmacéutico de liberación sostenida o liberación lenta, preferiblemente para uso como un excipiente farmacéutico para el tratamiento de una enfermedad musculoesquelética, preferiblemente una

enfermedad ósea o una enfermedad de las articulaciones (alternativamente o además, dicha enfermedad puede afectar los tendones y/o ligamentos). Se divulga además en el presente documento el uso de plasma S/D para la fabricación de un excipiente farmacéutico, más preferiblemente de un excipiente farmacéutico de liberación sostenida o liberación lenta, preferiblemente para la fabricación de un excipiente farmacéutico para el tratamiento de una enfermedad musculoesquelética, preferiblemente una enfermedad ósea o una enfermedad de las articulaciones (alternativamente o además, dicha enfermedad puede afectar los tendones y/o ligamentos). Aun más se proporciona un método para tratar una enfermedad musculoesquelética, preferiblemente una enfermedad ósea o una enfermedad de las articulaciones (alternativamente o además, dicha enfermedad puede afectar los tendones y/o ligamentos) en un sujeto en necesidad de tal tratamiento, que comprende administrar a dicho sujeto plasma S/D como un excipiente farmacéutico, más preferiblemente como un excipiente farmacéutico de liberación sostenida o liberación lenta.

Preferiblemente, el plasma S/D puede ser plasma S/D humano, de modo que las formulaciones farmacéuticas que comprenden plasma S/D humano son particularmente adecuadas para la administración a sujetos humanos.

También se divulga en el presente documento el uso de las formulaciones anteriormente mencionadas como un suplemento de medio de cultivo celular. Según esto, un aspecto relacionado proporciona el uso de una formulación que comprende plasma S/D y un glucosaminoglucano como un suplemento de medio de cultivo celular. Tales formulaciones pueden permitir ventajosamente obtener células o cultivos celulares con propiedades mejoradas.

A lo largo de este aspecto de la invención y cualquiera de sus formas de realización, el plasma S/D puede ser preferiblemente plasma S/D de mamífero, más preferiblemente plasma S/D humano. También a lo largo de este aspecto de la invención y cualquiera de sus formas de realización, el suero puede ser suero de mamífero, más preferiblemente suero humano. También preferiblemente, el plasma S/D puede ser plasma S/D de mamífero y el suero puede ser suero de mamífero, o el plasma S/D puede ser plasma S/D humano y el suero puede ser suero humano. El plasma y/o suero humanos pueden ser particularmente ventajosos para la administración a sujetos humanos. También a lo largo de este aspecto de la invención y cualquiera de sus formas de realización, la sangre completa puede ser sangre completa de mamífero, más preferiblemente sangre completa humana. También preferiblemente, el plasma S/D puede ser plasma S/D de mamífero y la sangre completa puede ser sangre completa de mamífero, o el plasma S/D puede ser plasma S/D humano y la sangre completa puede ser sangre completa humana. El plasma y/o la sangre completa humanos pueden ser particularmente ventajosos para la administración a sujetos humanos.

También se divulgan en el presente documento formulaciones farmacéuticas como se enseña anteriormente, y los correspondientes usos de las mismas, en donde el glucosaminoglucano se omite de las formulaciones. Por tanto, tales formulaciones pueden, en particular, comprender plasma S/D (preferiblemente plasma S/D humano) y uno cualquiera o más componentes como se enseña anteriormente, en particular, uno cualquiera o más de: el suero, la sangre completa o el componente fraccionado de la misma, el uno o más principios farmacéuticos activos (tal como, cada uno independientemente, seleccionado del grupo que consiste en la composición celular, el compuesto farmacéutico activo, la proteína, el péptido, y la molécula orgánica pequeña). Tales formulaciones también pueden mostrar comportamiento formador de gel satisfactorio.

Los anteriores y aspectos adicionales y formas de realización preferidas de la invención se describen en las siguientes secciones y en las reivindicaciones adjuntas. La invención se define en las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra una vista de rayos X de reparación/formación de tejido óseo 4 semanas después de la administración de una formulación que contiene plasma S/D, IL-8 y CaCl_2 a un sitio de defecto óseo en un modelo de ratón inmunocompetente de osteotomía calvaria. La reparación del hueso se puede ver claramente (áreas mineralizadas) en los ratones tratados (B) comparados con controles sin IL-8 (A).

La figura 2 proporciona el análisis microscópico del tejido recién formado mostrado en la figura 1B, a 20 aumentos (A) y 40 aumentos. Cuatro semanas después de la administración de una formulación que contiene plasma S/D, IL-8 y CaCl_2 a un sitio de defecto óseo en un modelo de ratón inmunocompetente de osteotomía calvaria, la matriz de colágeno vacía presenta áreas amplias de osteoide mineralizado y sin mineralizar y un gran número de vasos.

Descripción de formas de realización

Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes tanto singulares como plurales a menos que el contexto claramente dicte otra cosa.

Los términos "comprender", "comprende" y "compuesto de" como se usan en el presente documento son sinónimos con "incluir", "incluye" o "contener", "contiene", y son inclusivos o abiertos y no excluyen miembros, elementos o etapas de método adicionales, no enumerados. Los términos también abarcar "consistir en" y "consistir esencialmente en".

La enumeración de intervalos numéricos por puntos finales incluye todos los números y fracciones subsumidas en los intervalos respectivos, así como los puntos finales enumerados.

5 El término "aproximadamente" como se usa en el presente documento cuando se hace referencia a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal, y similar, se pretende que abarque variaciones de y desde el valor especificado, en particular variaciones de +/- 10% o menos, preferiblemente +/- 5% o menos, más preferiblemente +/- 1% o menos y aún más preferiblemente +/- 0,1% o menos de y desde el valor especificado en tanto que tales variaciones sean apropiadas para cumplir en la invención divulgada. Se debe entender que el valor al que dicho modificador "aproximadamente" se refiere es él mismo especialmente, y preferiblemente, divulgado.

10 Mientras que el término "uno o más", tal como uno o más miembros de un grupo de miembros, está claro por sí, por medio de ejemplificación adicional, el término abarca entre otros una referencia a uno cualquiera de dichos miembros, o cualesquiera dos o más de dichos miembros, tal como, por ejemplo, cualesquiera ≥ 3 , ≥ 4 , ≥ 5 , ≥ 6 o ≥ 7 etc. de dichos miembros, y hasta todos dichos miembros.

15 A menos que se especifique de otra manera, todos los términos usados en la divulgación de la invención, incluyendo términos técnicos y científicos, tienen el significado que comúnmente entiende un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Mediante dirección adicional, se pueden incluir definiciones de términos para apreciar mejor la enseñanza de la presente invención.

20 Las técnicas generales en cultivo celular y usos de medio se esbozan, entre otros, en Large Scale Mammalian Cell Culture (Hu et al. 1997. Curr Opin Biotechnol 8: 148); Serum-free Media (K. Kitano. 1991. Biotechnology 17: 73); o Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr Opin Biotechnol 2: 375, 1991).

25 Los términos "formulación farmacéutica", "composición farmacéutica", o "preparación farmacéutica" se pueden usar de forma intercambiable en el presente documento. Asimismo, los términos "formulación", "composición" o "preparación" se pueden usar de forma intercambiable en el presente documento.

30 El término "plasma" es como se define convencionalmente. El plasma habitualmente se obtiene de una muestra de sangre completa, a la que se proporciona o pone en contacto con un anticoagulante (por ejemplo, heparina, citrato, oxalato o EDTA). Posteriormente, los componentes celulares de la muestra de sangre se separan del componente líquido (plasma) por una técnica apropiada, típicamente por centrifugación. El término "plasma", por tanto, se refiere a una composición que no forma de parte de un cuerpo humano o animal.

35 Los términos "plasma tratado con solvente/detergente", "plasma tratado con S/D" o "plasma S/D", en general se refieren a plasma descelularizado obtenible u obtenido por un método que comprende las etapas de: (a) tratar plasma con un solvente y un detergente y (b) filtrar el plasma tratado con solvente/detergente.

40 El plasma que se va a tratar en la etapa (a) puede ser cualquier plasma definido convencionalmente tal como plasma reciente, plasma fresco congelado, plasma congelado descongelado o crioprecipitado, criosobrenadantes o concentrados de plasma congelado, así como productos de dilución de los mismos. El plasma se obtiene habitualmente de una muestra de sangre completa, o de una muestra obtenida por aféresis.

45 Los solventes tal como fosfatos de di- o trialquilo y detergentes se describen en el documento US 4.764.369. El solvente usado para preparar plasma S/D preferiblemente es un fosfato de dialquilo o un fosfato de trialquilo, ambos tienen grupos alquilo que contienen de 1 a 10 átomos de carbono, especialmente de 2 a 10 átomos de carbono. Ejemplos ilustrativos de solventes pueden incluir fosfato de tri-(n-butilo), fosfato de tri-(t-butilo), fosfato de tri-(n-hexilo), fosfato de tri-(2-etilhexilo), o fosfato de tri-(n-decilo). Un solvente preferido es fosfato de tri-(n-butilo).
50 También se pueden emplear mezclas de diferentes fosfatos de trialquilo, así como fosfatos que tienen grupos alquilo de diferentes cadenas alquílicas, por ejemplo, fosfato de etilo y di-(n-butilo). Similarmente, se pueden emplear los respectivos fosfatos de dialquilo incluyendo esos de diferentes mezclas de grupos alquilo de fosfato de dialquilo. Además, se pueden emplear mezclas de fosfatos de di- y trialquilo.

55 El solvente tal como fosfato de di- o trialquilo para uso en la etapa de tratamiento (a) preferiblemente se emplea en una cantidad que varía desde aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, y preferiblemente desde aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml. Manifestado de forma diferente, los fosfatos de di- o trialquilo para uso en la etapa de tratamiento (a) preferiblemente se emplean en una cantidad que varía desde aproximadamente el 0,001% p/v hasta aproximadamente el 10% p/v, y preferiblemente desde aproximadamente el 0,01% p/v hasta aproximadamente el 1% p/v.

60 El detergente usado para preparar plasma S/D preferiblemente es un detergente no tóxico. Los detergentes no iónicos contemplados incluyen los que dispersan a la temperatura predominante al menos el 0,1% en peso de la grasa en una solución acuosa que contiene las mismas cuando se introduce 1 gramo de detergente por 100 ml de solución en la misma. Los ejemplos ilustrativos de detergentes pueden incluir derivados de polioxietileno de ácidos grasos, ésteres parciales de anhídridos de sorbitol, por ejemplo, esos productos conocidos comercialmente como

“Tween 80”, “Tween 20” y “polisorbato 80” y detergentes acuosos solubles en aceite no iónicos tal como el vendido comercialmente bajo el nombre comercial “Triton X 100” (alquilfenol oxietilado). También se contempla desoxicolato de sodio, así como los “Zwittergents” que son detergentes dipolares sintéticos conocidos como “sulfobetainas” tal como sulfonato de N-dodecil-N,N-metil-2-amonio-1 etano y sus congéneres o detergentes no iónicos tal como octil-beta-D-glucopiranosido.

La cantidad de detergente puede variar desde aproximadamente el 0,001% v/v hasta aproximadamente el 10% v/v, preferiblemente desde aproximadamente el 0,01% v/v hasta el 1,5% v/v.

El tratamiento con solvente y detergente preferiblemente se efectúa a una temperatura entre -5°C y 70°C, preferiblemente entre 0°C y 60°C. El tiempo de tal tratamiento (contacto) es al menos 1 minuto, preferiblemente al menos 1 hora y en general de 4 a 24 horas. El tratamiento normalmente es eficaz a presión atmosférica, aunque se pueden emplear también presiones subatmosféricas y superatmosféricas.

Normalmente, después del tratamiento, el solvente tal como fosfato de triálquilo y el detergente se eliminan. El solvente y el detergente se pueden eliminar por cualquier técnica adecuada para separar el solvente y detergente del plasma. Cuando se emplea un detergente no iónico con el solvente tal como un fosfato de triálquilo, se pueden eliminar por: (1) diafiltración usando membranas microporosas tal como TEFLON que retienen las proteínas del plasma; (2) absorción de los componentes del plasma deseados en soportes cromatográficos o cromatográficos de afinidad; (3) precipitación, por ejemplo, precipitación salina de proteínas del plasma; (4) liofilización, etc.

Los solventes tal como fosfato de dialquilo o fosfato de triálquilo se pueden eliminar como sigue: (a) la eliminación del factor antihemofílico (AHF) se puede efectuar por precipitación de AHF con glicina 2,2 molar y cloruro de sodio 2,0 M (b) la eliminación de fibronectina se puede efectuar uniendo la fibronectina a una columna de gelatina insolubilizada y lavando la fibronectina unida libre de reactivo.

La etapa de filtrado (b) en general se realiza con un filtro de 1 µm para eliminar células y restos, seguido por filtración estéril usando un filtro de 0,2 µm.

En virtud de un ejemplo preferido, como se describe por Horowitz et al., 1992 (Blood, 3, 826-831), el plasma S/D se puede preparar como sigue: se puede descongelar PFC rápidamente y se puede tratar con agitación durante 4 horas con fosfato de tri-(n-butilo) (TNBP) al 1% (v/v) y polioxietileno-p-t-octilfenol (Triton X-100) al 1% (v/v) a 30°C. Después del tratamiento, se pueden añadir aceites comestibles tal como aceite de soja (al 5% v/v) o aceite de ricino, mezclar suavemente durante 30 minutos, y se puede eliminar por centrifugación a 10.000g durante 20 minutos. El plasma clarificado se puede aplicar a una columna de resina Waters Prep C18 de modo que la proporción de plasma respecto al volumen de la columna es 6 veces y el tiempo de contacto puede ser 3 minutos. El eluato de la columna se puede filtrar en un filtro de 0,2 µm.

Por ejemplo, el plasma S/D está comercialmente disponible como Octaplas® (Octapharma AG, Lachen, Suiza).

El término “plasma S/D” abarca plasma que comprende una concentración o actividad reducida de inhibidor de plasmina, tal como un nivel de inhibidor de plasmina igual a o menor de 0,06 UI/ml o igual a o menor de 0,50 UI/ml, por ejemplo, un nivel de inhibidor de plasmina entre 0,20 y 0,30 UI/ml, más específicamente entre 0,22 y 0,25 UI/ml.

Cuando se compara con el plasma fresco congelado (PFC), el plasma S/D puede contener una cantidad y/o actividad reducida de uno o más de inhibidor de plasmina, proteína S, factor XI, factor V, factor VIII, factor X, α2 antiplasmina, anti-tripsina, factor de von Willebrand (vWF) y proteasa que corta el factor de von Willebrand (VWF_{CP}) también conocida como desintegrina y metaloproteinasas con un motivo trombospondina de tipo 1, miembro 13 (ADAMTS-13), factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), interleucina-8 (IL-8), interleucina-10 (IL-10) (Benjamin y McLaughlin, 2012, Svae et al., 2007; Beeck y Hellstern, 1998; Doyle et al., 2003; Mast et al., 1999, Theusinger et al., 2011) y/o puede comprender una cantidad y/o actividad aumentada de factor VII (Doyle et al., 2003).

El plasma S/D se puede usar directamente en las presentes formulaciones farmacéuticas. También se pueden almacenar apropiadamente para uso posterior (por ejemplo, para periodos de tiempo más cortos, por ejemplo, hasta aproximadamente 1-2 semanas, a una temperatura por encima de los respectivos puntos de congelación de plasma o suero, pero por debajo de la temperatura ambiente, esta temperatura será habitualmente aproximadamente de 4°C a 5°C; o para tiempos más largos por almacenamiento congelado, habitualmente entre aproximadamente -70°C y aproximadamente -80°C).

El plasma S/D se puede inactivar por calor como se sabe en la técnica, particularmente para eliminar el complemento. Donde las presentes formulaciones farmacéuticas emplean plasma S/D autólogo al sujeto que se va a tratar, puede ser innecesario inactivar por calor el plasma S/D. Donde el plasma S/D es al menos parcialmente alogénico al sujeto que se va a tratar, puede ser ventajoso inactivar por calor el plasma S/D.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender plasma S/D que es autólogo al sujeto que se va a tratar. El término “autólogo” con referencia al plasma S/D indica que el plasma S/D se obtiene del mismo

5 sujeto que se va a poner en contacto o tratar con el plasma S/D. Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender plasma S/D que es "homólogo" o "alogénico" al sujeto que se va a tratar, es decir, obtenido de uno o más (reunido) sujetos diferentes del sujeto que se va a poner en contacto o tratar con el plasma S/D. Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender una mezcla de plasma S/D autólogo y homólogo (alogénico) como se ha definido anteriormente. Preferiblemente, las formulaciones farmacéuticas pueden comprender plasma S/D que es "alogénico" para el sujeto que se va a tratar. Ventajosamente, el plasma S/D alogénico está comercialmente disponible y por tanto es una fuente ilimitada de plasma.

10 El término "suero" es como se define convencionalmente. El suero se puede obtener habitualmente de una muestra de sangre completa dejando primero que tenga lugar la coagulación en la muestra y posteriormente separando el coagulo así formado y componentes celulares de la muestra de sangre del componente líquido (suero) por una técnica apropiada, típicamente por centrifugación. La coagulación se puede facilitar por un catalizador inerte, por ejemplo, bolas de vidrio o polvo. Alternativamente, el suero se puede obtener de plasma eliminando el anticoagulante y la fibrina. El término "suero", por tanto, se refiere a una composición que no forma parte de un cuerpo humano o animal.

15 El suero se puede usar directamente en las formulaciones farmacéuticas como se enseña en el presente documento. También se pueden almacenar apropiadamente para uso posterior (por ejemplo, para periodos de tiempo más cortos, por ejemplo, hasta aproximadamente 1-2 semanas, a una temperatura por encima de los respectivos puntos de congelación de plasma o suero, pero por debajo de la temperatura ambiente, esta temperatura será habitualmente aproximadamente de 4°C a 5°C; o para tiempos más largos por almacenamiento congelado, habitualmente entre aproximadamente -70°C y aproximadamente -80°C).

20 El suero se puede inactivar por calor como se sabe en la técnica, particularmente para eliminar el complemento. Donde las presentes formulaciones farmacéuticas emplean suero autólogo para las células cultivadas en presencia del mismo, puede ser innecesario inactivar por calor el suero. Donde el suero es al menos parcialmente alogénico para las células cultivadas, puede ser ventajoso inactivar por calor el suero.

25 Opcionalmente, el suero también se puede esterilizar antes del almacenamiento o uso, usando filtros microbiológicos convencionales, preferiblemente con un tamaño de poro de 0,2 µm o menor.

30 En ciertas formas de realización, las formulaciones farmacéuticas pueden emplear suero que es autólogo para el sujeto que se va a tratar. El término "autólogo" con referencia al suero indica que el suero se obtiene del mismo sujeto que se va a poner en contacto con el suero. En ciertas formas de realización, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden emplear suero que es "homólogo" o "alogénico" para el sujeto que se va a tratar, es decir, obtenido de uno o más (reunido) sujetos diferentes del sujeto que se va a poner en contacto con el suero. En ciertas formas de realización, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención también pueden emplear una mezcla sueros autólogo y homólogo (alogénico) como se ha definido anteriormente.

35 El término "sangre completa" es como se define convencionalmente. Preferiblemente, la muestra es fácilmente obtenible por métodos mínimamente invasivos, lo que permite la retirada o aislamiento de sangre completa del sujeto. La sangre completa habitualmente se proporciona o pone en contacto con un anticoagulante (por ejemplo, heparina, citrato, oxalato o EDTA).

40 La sangre completa se puede usar directamente en las formulaciones farmacéuticas como se enseña en el presente documento. La sangre completa también se puede almacenar apropiadamente para uso posterior (por ejemplo, para periodos de tiempo más cortos, por ejemplo, hasta aproximadamente 1-4 semanas, a una temperatura por encima del punto de congelación de la sangre completa, pero por debajo de la temperatura ambiente, esta temperatura será habitualmente aproximadamente de 4°C a 5°C; o para tiempos más largos por almacenamiento congelado, habitualmente entre aproximadamente -70°C y aproximadamente -160°C, tal como entre aproximadamente -70°C y aproximadamente -80°C, tal como a aproximadamente -160°C).

45 En ciertas formas de realización, las formulaciones farmacéuticas pueden emplear sangre completa que es autóloga para el sujeto que se va a tratar. El término "autóloga" con referencia a sangre completa indica que la sangre completa se obtiene del mismo sujeto que se va a poner en contacto con la sangre completa. En ciertas formas de realización, las formulaciones farmacéuticas pueden emplear sangre completa que es "homóloga" o "alogénica" para el sujeto que se va a tratar, es decir, obtenida de uno o más (reunida) sujetos diferentes del sujeto que se va a poner en contacto con la sangre completa. En ciertas formas de realización, las formulaciones farmacéuticas también pueden emplear una mezcla de sangre completa autóloga y homóloga (alogénica) como se ha definido anteriormente.

50 En ciertas formas de realización, el glucosaminoglucano se puede seleccionar del grupo que consiste en ácido hialurónico y derivados del mismo, un proteoglucano y derivados del mismo, un sulfato de condroitina, un sulfato de queratán, un quitosano y derivados del mismo, una quitina y derivados de la misma.

Los términos “ácido hialurónico” o “AH” se pueden usar de forma intercambiable con “hialuronano” o “hialuronato”. El término “ácido hialurónico” se refiere a un polímero aniónico, no sulfatado de disacáridos compuesto de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, unidos a través de enlaces glucosídicos β -1,4 y β -1,3 alternantes. Los derivados del ácido hialurónico incluyen, pero no están limitados a sales de hialuronato tal como hialuronato de sodio o un éster de ácido hialurónico con un alcohol de la serie alifática, heterocíclica o cicloalifática, o una forma sulfatada de ácido hialurónico o una combinación de agentes que comprende ácido hialurónico.

El término “proteoglucano” se refiere a proteínas con una o más cadena(s) de glucosaminoglucano (GAG) unidas de forma covalente. El glucosaminoglucano puede ser un proteoglucano seleccionado de decorina, biglucano, testicano, fibromodulina, lumicano, versicano, perlecano, neurocano o agrecano.

El término “sulfato de condroitina” se refiere a un polímero de disacáridos compuesto de N-acetilgalactosamina y ácido glucurónico, cada uno de los cuales puede estar sulfatado en posiciones y cantidades variables. El sulfato de condroitina se puede seleccionar de condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato, condroitin-2,6-sulfato, condroitin-4,6-sulfato.

El término “sulfato de queratán” se puede usar de forma intercambiable con “queratosulfato” y se refiere a un polímero de disacáridos repetitivos -3Gal β 1-4GlcNAc β 1- que puede estar sulfatado en la posición de carbono 6 (C6) de cualquiera o ambos de los monosacáridos Gal o GlcNAc.

El término “quitosano” se refiere a un polímero lineal compuesto de D-glucosamina (unidad desacetilada) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) con unión β -(1-4) aleatoriamente distribuidas.

El término “quitina” se refiere a un polímero compuesto de N-acetilglucosamina con unión β -(1-4).

En ciertas formas de realización, la formulación farmacéutica comprende además uno o más principios farmacéuticos activos.

Tales principios farmacéuticos activos pueden abarcar, por ejemplo, composiciones celulares.

En ciertas formas de realización, la composición celular puede comprender células madre mesenquimatosas (MSC), osteoprogenitores, células osteoblásticas, osteocitos, células condroblásticas y/o condrocitos.

El término “célula madre mesenquimatosa” o “MSC”, como se usa en el presente documento, se refiere a una célula madre adulta, derivada del mesodermo que es capaz de generar células de linajes mesenquimatosos, típicamente de dos o más linajes mesenquimatosos, por ejemplo, linaje osteocítico (hueso), condrocítico (cartílago), miocítico (músculo), tendocítico (tendón), fibroblástico (tejido conjuntivo), adipocítico (grasa) y estromogénico (estroma medular). Las MSC se pueden aislar de, por ejemplo, médula ósea, hueso trabecular, sangre, cordón umbilical, placenta, saco vitelino fetal, piel (dermis), específicamente piel fetal y adolescente, periostio y tejido adiposo. Se han descrito MSC humanas, su aislamiento, expansión *in vitro* y diferenciación en, por ejemplo, la patente en EE UU No. 5.486.359; la patente en EE UU No. 5.811.094; la patente en EE UU No. 5.736.396; la patente en EE UU No. 5.837.539; o la patente en EE UU No. 5.827.740. Cualquier MSC descrita en la técnica y aislada por cualquier método descrito en la técnica puede ser adecuada en las presente formulaciones farmacéuticas.

El término MSC también abarca la progenie de MSC, por ejemplo, progenie obtenida mediante proliferación (propagación) *in vitro* o *ex vivo* de MSC obtenidas de una muestra biológica de un sujeto animal o humano.

Las MSC preferibles tienen el potencial de generar células de al menos el linaje osteogénico (hueso) tal como, por ejemplo, osteoprogenitores y/o pre-osteoblastos y/u osteoblastos y/u osteocitos, etc. o de al menos el linaje condrogénico (cartílago) tal como, por ejemplo, células condrogénicas y/o condroblastos y/o condrocitos, etc.

El término “célula madre” se refiere en general a una célula no especializada o relativamente menos especializada y competente para proliferación, que es capaz de autorrenovación, es decir, puede proliferar sin diferenciación, y que o cuya progenie puede dar lugar a al menos un tipo celular relativamente más especializado. El término abarca células madre capaces de autorrenovación sustancialmente ilimitada, es decir, en donde la progenie de una célula madre o al menos parte de la misma sustancialmente retiene el fenotipo no especializado o relativamente menos especializado, el potencial de diferenciación y la capacidad de proliferación de la célula madre materna, así como células madre que muestra autorrenovación limitada, es decir, en donde la capacidad de la progenie o parte de la misma para proliferación adicional y/o diferenciación está demostrablemente reducida comparada con la célula materna. Mediante ejemplo y no limitación, una célula madre puede dar lugar a descendientes que se pueden diferenciar a lo largo de uno o más linajes para producir células cada vez relativamente más especializadas, en donde tales descendientes y/o células cada vez relativamente más especializadas pueden ellas mismas ser células madre como se ha definido en el presente documento, o incluso producir células terminalmente diferenciadas, es decir, células completamente especializadas, que pueden ser post-mitóticas.

El término “célula madre adulta” como se usa en el presente documento se refiere a una célula madre presente en u obtenida de (tal como aislada de) un organismo en el estadio fetal o después del nacimiento, tal como, por ejemplo, después de alcanzar la edad adulta.

5 Como se usa en el presente documento “osteoprogenitores” puede comprender particularmente osteoprogenitores tempranos y tardíos. “Células osteoblásticas” puede abarcar particularmente, pre-osteoblastos, osteoblastos y osteocitos, y el término puede indicar, más preferiblemente, pre-osteoblastos y osteoblastos. Todos estos términos son bien conocidos por sí y como se usan en el presente documento y típicamente se pueden referir a células que tienen un fenotipo osteogénico, y que pueden contribuir a, o son capaces de desarrollarse a células que pueden contribuir a, la formación de material óseo o matriz ósea.

Mediante dirección adicional y no limitación, los osteoprogenitores y células osteoblásticas, así como poblaciones celulares que comprenden osteoprogenitores y/o células osteoblásticas pueden mostrar las siguientes características:

- 15 a) las células comprenden expresión de Runx2, un factor de transcripción multifuncional que regula la diferenciación de osteoblastos y la expresión de muchos genes de proteína de matriz extracelular durante la diferenciación de osteoblastos;
- 20 b) las células comprenden expresión de al menos uno de los siguientes: fosfatasa alcalina (ALP), más específicamente ALP del tipo hueso-hígado-riñón; y más preferiblemente también comprenden expresión de uno o más marcadores óseos adicionales tal como osteocalcina (OCN), propéptido amino-terminal de procolágeno de tipo 1 (P1NP), osteonectina (ON), osteopontina (OP) y/o sialoproteína de hueso (BSP), y/o una o más proteínas de matriz ósea adicionales tal como decorina y/o osteoprotegerina (OPG);
- 25 c) las células sustancialmente no expresan CD45 (por ejemplo, menos de aproximadamente el 10%, preferiblemente menos de aproximadamente el 5%, más preferiblemente menos de aproximadamente el 2% de las células puede expresar CD45);
- 30 d) las células muestran evidencia de capacidad para mineralizar los alrededores externos, o sintetizar matriz extracelular que contiene calcio (por ejemplo, cuando se exponen a medio osteogénico; véase Jaiswal et al. J Cell Biochem, 1997, vol. 64, 295-312). La acumulación dentro de las células y el depósito en proteínas de matriz se puede medir convencionalmente, por ejemplo, cultivando en $^{45}\text{Ca}^{2+}$, lavando y volviendo a cultivar, y después determinando cualquier radioactividad presente dentro de las células o depositada en la matriz extracelular (documento US 5.972.703), o usando un ensayo de mineralización basado en rojo alizarina (véase, por ejemplo, Gregory et al. Analytical Biochemistry, 2004, vol. 329, 77-84);
- 35 e) las células sustancialmente no se diferencian hacia ninguna de células de linaje adipocítico (por ejemplo, adipocitos) o linaje condrocítico (por ejemplo, condrocitos). La ausencia de diferenciación hacia tales linajes celulares se puede ensayar usando condiciones de inducción de diferenciación estándar establecidas en la técnica (por ejemplo, véase, Pittenger et al. Science, 1999, vol. 284, 143-7), y métodos de ensayo (por ejemplo, cuando se inducen, los adipocitos típicamente se tiñen con aceite rojo O mostrando acumulación de lípidos; los condrocitos típicamente se tiñen con azul alcian o safranina O). Carecer sustancialmente de propensión hacia diferenciación adipogénica y/o condrogénica puede significar típicamente que menos del 20%, o menos del 10%, o menos del 5%, o menos del 1% de las células ensayadas mostraría signos de diferenciación adipogénica o condrogénica cuando se aplica el ensayo respectivo.

45 Las células pueden comprender además la expresión de uno o más factores de reclutamiento celular tal como IL6 y/o VEGF.

Como se usa en el presente documento, “células condroblásticas” pueden comprender particularmente condroblastos, es decir, células de cartílago jóvenes (no maduras, inmaduras) activas en la secreción de matriz extracelular. Se considera que los condroblastos surgen por diferenciación de células madre mesenquimatosas. El término “condrocito” más específicamente se refiere a una célula de cartílago madura necesaria para el mantenimiento de la matriz cartilaginosa. Estos términos se conocen bien por sí y como se usan en el presente documento típicamente se pueden referir a células que tienen un fenotipo condrogénico, y que pueden contribuir a, o son capaces de desarrollarse a células que pueden contribuir a, la formación de cartílago o matriz cartilaginosa.

55 Mediante dirección adicional y no limitación, los condrocitos articulares humanos pueden mostrar características de expresión celular como se resumen en Diaz-Romero et al. 2005 (J Cell Physiol, vol. 202(3), 731-42), por ejemplo, pueden expresar integrinas y otras moléculas de adhesión (CD49a, CD49b, CD49c, CD49e, CD49f, CD51/61, CD54, CD106, CD166, CD58, CD44), tetraspaninas (CD9, CD63, CD81, CD82, CD151), receptores (CD105, CD119, CD130, CD140a, CD221, CD95, CD120a, CD71, CD14), ectoenzimas (CD10, CD26), y otras moléculas de superficie (CD90, CD99). Durante el cultivo en monocapa, los condrocitos pueden aumentar ciertos marcadores considerados como distintivos para células madre mesenquimatosas (CD10, CD90, CD105, CD166). Por tanto, tales marcadores también pueden ser expresados por las células condroblásticas menos maduras.

65 En donde se dice que una célula es positiva para (o expresa o comprende la expresión de) un marcador particular, esto significa que el experto en la materia concluirá la presencia o evidencia de una señal distinta, por ejemplo, detectable con anticuerpo o detección por transcripción inversa reacción en cadena de la polimerasa, para ese

marcador cuando se lleva a cabo la medida apropiada, comparado con controles adecuados. Donde el método permite la evaluación cuantitativa del marcador, las células positivas pueden generar de media una señal que es significativamente diferente del control, por ejemplo, pero sin limitación, al menos 1,5 veces mayor que tal señal generada por células control, por ejemplo, al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces mayor o incluso mayor.

La expresión de los marcadores específicos de células anteriores se puede detectar usando cualquier método inmunológico adecuado conocido en la técnica, tal como inmunocitoquímica o adsorción de afinidad, análisis por inmunotransferencia, FACS, ELISA, etc., o por cualquier ensayo bioquímico adecuado de actividad enzimática (por ejemplo, para ALP), o por cualquier técnica adecuada de medir la cantidad del ARNm del marcador, por ejemplo, transferencia Northern, RT-PCR semicuantitativa o cuantitativa, etc. Se conocen datos de secuencias para marcadores enumerados en esta divulgación y se pueden obtener de bases de datos públicas tal como GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

La presente formulación farmacéutica puede comprender una o más sustancias con propiedades osteogénicas, osteoinductoras y/o osteoconductoras. En formas de realización preferidas, tal sustancia se puede seleccionar del grupo que comprende o consiste en un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), preferiblemente FGF-2, un factor de crecimiento transformante beta (TGFB), preferiblemente TGFB-1, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), interleucina-8 (IL-8), una proteína morfogenética ósea (BMP), por ejemplo, una o más de BMP-2, BMP-4, BMP-6 y BMP-7, hormona paratiroidea (PTH), proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrp), y factor de células madre (SCF). Cualquiera de tal sustancia puede estar incluida en una composición farmacéutica a una concentración suficiente para alcanzar su(s) efecto(s) osteogénico(s), osteoinductor(es) y/o osteoconductor(es) cuando se administra a un sujeto, en la medida en que se evitan efectos secundarios indeseados.

Típicamente, pero sin limitación, cualquiera de tal sustancia puede estar comprendida en la formulación farmacéutica a una concentración entre 0,01 ng/ml y 1 mg/ml, por ejemplo, de 0,1 ng/ml a 100 µg/ml, por ejemplo, de 1 ng/ml a 50 µg/ml.

El término "osteoinductor" se refiere a la capacidad de un componente tal como un factor de crecimiento peptídico para reclutar células inmaduras tal como células madre, MSC y estimular esas células a diferenciarse a pre-osteoblastos y osteoblastos maduros, formando de esta manera tejido óseo. Las presentes composiciones farmacéuticas pueden comprender además un componente con propiedades osteoinductoras tal como una proteína o péptido osteoinductor, por ejemplo, una proteína morfogenética ósea, tal como BMP-2, BMP-7 o BMP-4; un hidrogel o biopolímero tal como ácido hialurónico o derivados del mismo, colágeno, fibrinógeno, osteonectina, u osteocalcina. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas pueden comprender además ácido hialurónico o derivados del mismo, colágeno o fibrinógeno.

El término "osteoconductor" se refiere a la capacidad de un componente para servir como un andamiaje sobre el que las células óseas pueden unirse, migrar, crecer y producir hueso nuevo. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además un componente con propiedades osteoconductoras, por ejemplo, un andamiaje o matriz o superficie osteoconducora tal como, sin limitación, fosfato tricálcico, hidroxiapatita, combinación de hidroxiapatita/partículas de fosfato tricálcico (HA/TCP), gelatina, poli-ácido láctico, poli-ácido láctico glicólico, ácido hialurónico, quitosano, poli-L-lisina, o colágeno.

Como se ha mencionado anteriormente, las formulaciones farmacéuticas según la presente invención pueden comprender componentes útiles en la reparación de heridas y defectos del hueso. Las formulaciones farmacéuticas pueden comprender un andamiaje o matriz con propiedades osteoconductoras. Las formulaciones farmacéuticas se pueden combinar con matriz ósea desmineralizada (DBM) u otras matrices para hacer el compuesto osteogénico, así como osteoconductor y osteoinductor. Métodos similares usando células de médula ósea autólogas con DBM alogénica dieron buenos resultados (Connolly et al. 1995. Clin Orthop 313: 8-18).

Las formulaciones farmacéuticas según la presente invención pueden incluir además o ser coadministradas con un factor bioactivo complementario o proteína osteoinductora tal como proteína morfogenética ósea, tal como BMP-2, BMP-7 o BMP-4, o cualquier otro factor de crecimiento. Otros potenciales componentes acompañantes incluyen fuentes inorgánicas de calcio o fosfato adecuadas para ayudar en la regeneración del hueso (documento WO 00/07639). Si se desea, se puede administrar una preparación celular en una matriz o material soporte para proporcionar regeneración de tejido mejorada. Por ejemplo, el material puede ser un hidrogel, o un biopolímero, tal como gelatina, colágeno, ácido hialurónico o derivados del mismo, osteonectina, fibrinógeno, u osteocalcina. Se pueden sintetizar biomateriales según técnicas estándar (por ejemplo, Mikos et al., Biomaterials 14:323, 1993; Mikos et al., Polymer 35:1068, 1994; Cook et al., J. Biomed. Mater. Res. 35:513, 1997).

Las formulaciones que aplican los principios de la invención ventajosamente muestran comportamiento formador de gel particularmente bueno, produciendo ventajosamente formulaciones viscosas. En ciertas formas de realización, las formulaciones con formulaciones formadoras de gel.

Los términos “formador de gel”, “una fase” o “monofásico” se pueden usar de forma intercambiable en el presente documento. La relación “formulación formadora de gel” como se pretende a lo largo de esta especificación se refiere a la capacidad de la formulación para formar un material sólido de tipo gelatinoso (gel), por ejemplo, con un comportamiento pseudoplástico. Por ejemplo, las presentes formulaciones farmacéuticas ventajosamente forman un gel cuando sus componentes se combinan o cuando sus componentes se combinan con o se exponen a materiales y/o condiciones que conducen a la formación de gel, por ejemplo, pero sin limitación, cuando se disuelven o dispersan en líquido sinovial, suero o una composición celular.

El término “viscosidad” en general es una medida de la resistencia de un fluido que se deforma ya sea por tensión de corte o esfuerzo de tracción. Las presentes formulaciones farmacéuticas pueden tener una viscosidad de al menos 10 Pa.s, por ejemplo, las presentes formulaciones farmacéuticas pueden tener una viscosidad que varía desde aproximadamente 30 Pa.s hasta aproximadamente 500 Pa.s, por ejemplo, desde aproximadamente 50 Pa.s hasta aproximadamente 250 Pa.s, a temperatura ambiente cuando se aplica una velocidad de corte de $0,560 \text{ s}^{-1}$.

Las composiciones que representan los principios de la invención pueden adquirir su consistencia gelatinosa particularmente en presencia de iones calcio divalentes (Ca^{2+}). Los tejidos animales, tal como preferiblemente tejidos de mamífero, tal como más preferiblemente tejidos humanos, incluyendo líquidos corporales tal como líquido sinovial, contienen Ca^{2+} extracelular, típicamente a una concentración entre 1 mM y 3 mM. Además, la concentración de Ca^{2+} es alta en tejidos óseos, donde se almacena principalmente como cristal de fosfato de calcio en forma de hidroxiapatita.

En consecuencia, en ciertas formas de realización no se necesita añadir Ca^{2+} a las presentes composiciones farmacéuticas, ya que, tras su administración, tal como en tejido óseo o de articulación, el Ca^{2+} encontrado en el sitio de administración facilitará la coagulación/gelificación de las composiciones.

En ciertas otras formas de realización, se puede añadir Ca^{2+} a las presentes composiciones farmacéuticas, por ejemplo, para aumentar su coagulación/gelificación *in situ* (por ejemplo, donde la concentración de Ca^{2+} encontrada en el sitio de administración se encuentra o espera que sea inadecuada para facilitar sola la coagulación/gelificación de las composiciones), o para alcanzar algún grado de coagulación/gelificación *in vitro* antes de su administración (por ejemplo, para mejorar la capacidad de inyección y/o integridad del producto). En tales formas de realización, el Ca^{2+} se puede añadir típicamente en las composiciones farmacéuticas a una concentración entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM, preferiblemente entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM, más preferiblemente entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 20 mM, o entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 40 mM, por ejemplo, entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 30 mM o entre aproximadamente 30 mM y aproximadamente 40 mM.

En ciertas formas de realización, los productos pretendidos para administración intra-articular o peri-articular pueden incluir entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 40 mM, tal como entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 30 mM de Ca^{2+} . En ciertas otras formas de realización, los productos pretendidos para administración intra-ósea o peri-ósea pueden incluir entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 20 mM de Ca^{2+} .

El Ca^{2+} se puede incluir adecuadamente en las composiciones farmacéuticas mediante la adición en las mismas de una cantidad adecuada de sal(es) de calcio farmacéuticamente aceptable(s), preferiblemente sal(es) de calcio soluble(s). Tales sales de Ca^{2+} pueden estar formadas con ácidos inorgánicos u orgánicos. Los ejemplos de tales sales incluyen cloruro de calcio (CaCl_2), glicerofosfato de calcio, fosfato de calcio, hidrogenocarbonato de calcio, citrato de calcio, sulfato de calcio, lactato de calcio, gluconato de calcio, ascorbato de calcio, y mezclas de las mismas. Particularmente preferida es CaCl_2 , que muestra ventajosamente buena solubilidad y se tolera bien en soluciones inyectables.

Las formulaciones farmacéuticas pretendidas en el presente documento pueden incluir entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml de CaCl_2 , preferiblemente entre aproximadamente 2 mg/ml y aproximadamente 4 mg/ml de CaCl_2 . En ciertas formas de realización, los productos pretendidos para administración intra-articular o peri-articular pueden incluir entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml de CaCl_2 , preferiblemente entre aproximadamente 2 mg/ml y aproximadamente 5 mg/ml, más preferiblemente aproximadamente 4 mg/ml de CaCl_2 . En ciertas otras formas de realización, los productos pretendidos para administración intra-ósea o peri-ósea pueden incluir entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml de CaCl_2 , preferiblemente entre aproximadamente 2 mg/ml y aproximadamente 5 mg/ml, más preferiblemente aproximadamente 2 mg/ml de CaCl_2 .

En ciertas formas de realización, las formulaciones farmacéuticas se pueden configurar para administración parenteral, tal como inyección parenteral, más preferiblemente para administración intra-ósea, peri-ósea, intra-articular o peri-articular, tal como inyección intra-ósea, peri-ósea, intra-articular o peri-articular, o para administración intra-tendón, peri-tendón, intra-ligamento o peri-ligamento, tal como inyección intra-tendón, peri-tendón, intra-ligamento o peri-ligamento.

Las formulaciones farmacéuticas o kit de partes como se enseña en el presente documento se pueden configurar para administración local. Las presentes formulaciones farmacéuticas o kits de partes se pueden configurar para la administración parenteral, es decir, incluyendo una o más de administración intra-ósea, peri-ósea, intra-articular, peri-articular, intramuscular, subcutánea, intravenosa, intracisternal, intra-tendón, peri-tendón, intra-ligamento o periligamento, tal como incluyendo una o más de administración intra-ósea, peri-ósea, intra-articular, peri-articular, intramuscular, subcutánea, intravenosa, e intracisternal.

Preferiblemente, las formulaciones farmacéuticas o kit de partes como se enseña en el presente documento se configuran para la administración intra-ósea o peri-ósea. La administración o distribución intra-ósea en general se refiere a un método por el cual se administra un tratamiento, directa o indirectamente, en el hueso (trabecular o cortical). La administración o distribución peri-ósea en general se refiere a un método por el cual se administra un tratamiento en los alrededores de un hueso (especialmente alrededor del sitio de fractura/daño).

Particularmente preferido, las formulaciones farmacéuticas o kits de partes como se enseña en el presente documento se configuran para administración intra-articular o peri-articular. La administración o distribución intra-articular en general se refiere a un método por el cual se administra un tratamiento, directa o indirectamente, en la cápsula sinovial de una articulación articulante. La administración o distribución peri-articular en general se refiere a un método por el cual se administra un tratamiento en los alrededores de la cápsula sinovial de una articulación articulante y/o el hueso subcondral.

Además, las formulaciones farmacéuticas o kits de partes como se enseña en el presente documento se pueden configurar para administración intra-tendón o peri-tendón. Además, las formulaciones farmacéuticas o kits de partes como se enseña en el presente documento se pueden configurar para administración intra-ligamento o periligamento.

Un aspecto relacionado se refiere a la formulación farmacéutica como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento (que incluye a lo largo de la presente especificación medidas terapéuticas y/o preventivas) de una enfermedad musculoesquelética.

El término “enfermedad musculoesquelética”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tipo de enfermedad ósea, enfermedad muscular, enfermedad de articulaciones, o condrodistrofia, cuyo tratamiento se puede beneficiar de la administración de la presente formulación farmacéutica a un sujeto que tiene la enfermedad. El término también abarca enfermedades que afectan tendones y/o ligamentos). En particular, tal enfermedad se puede caracterizar, por ejemplo, por formación de hueso y/o cartilago disminuida o resorción excesiva de hueso y/o cartilago, por número, viabilidad o función disminuida de osteoblastos u osteocitos presentes en el hueso y/o condroblastos o condrocitos presentes en el cartilago, masa ósea y/o masa de cartilago disminuida en un sujeto, adelgazamiento del hueso, fuerza o elasticidad del hueso comprometida, etc.

Los ejemplos no limitantes de enfermedades musculoesqueléticas pueden incluir trastornos locales o sistémicos, tal como cualquier tipo de osteoporosis u osteopenia, por ejemplo, primaria, postmenopáusica, senil, inducida por corticoides, inducida por bifosfonatos, e inducida por radioterapia; cualquier osteonecrosis secundaria mono- o multisitio; cualquier tipo de fractura, por ejemplo, fractura no consolidada, de consolidación defectuosa, con retraso de consolidación o compresión, afecciones que requieren fusión de huesos (por ejemplo, fusiones espinales y reconstrucción), fracturas maxilofaciales, defecto óseo congénito, reconstrucción ósea, por ejemplo, después de lesión traumática o cirugía de cáncer, y reconstrucción de hueso craneofacial; artritis traumática, defecto focal de cartilago y/o articulación, artritis degenerativa focal; artrosis, artritis degenerativa, gonartrosis, y coxartrosis; osteogénesis imperfecta; cáncer de hueso osteolítico; enfermedad de Paget, trastornos endocrinológicos, hipofosfatemia, hipocalcemia, osteodistrofia renal, osteomalacia, enfermedad ósea adinámica, hiperparatiroidismo, hiperparatiroidismo primario, hiperparatiroidismo secundario; enfermedad periodontal; enfermedad de Gorham-Stout y síndrome de McCune-Albright; artritis reumatoide; espondiloartropatías, incluyendo espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, artropatía enteropática, y espondiloartritis indiferenciada y artritis reactiva; lupus eritematoso sistémico y síndromes relacionados; esclerodermia y trastornos relacionados; síndrome de Sjogren; vasculitis sistémica, incluyendo arteritis de células gigantes (enfermedad de Horton), arteritis de Takayasu, polimialgia reumática, vasculitis asociada con ANCA (tal como granulomatosis de Wegener, poliangeitis microscópica y síndrome de Churg-Strauss), síndrome de Behcet, y otras poliarteritis y trastornos relacionados (tal como poliarteritis nodosa, síndrome de Cogan y enfermedad de Buerger); artritis que acompaña otras enfermedades inflamatorias sistémicas, incluyendo amiloidosis y sarcoidosis; artropatías de cristal, incluyendo gota, enfermedad de pirofosfato de calcio dihidrato, trastornos o síndromes asociados con depósito articular de cristales de fosfato de calcio u oxalato de calcio; condrocalcinosis y artropatía neuropática; síndrome de Felty y síndrome de Reiter; enfermedad de Lyme y fiebre reumática.

El término “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un compuesto activo o principio farmacéutico activo que inhibe o retrasa en un sujeto el inicio de un trastorno buscado por un investigador, veterinario, médico u otro profesional sanitario. El término “cantidad terapéuticamente eficaz” como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de un compuesto activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o médica en un sujeto que busca un investigador, veterinario, médico u otro profesional

sanitario, que puede incluir, entre otros, alivio de los síntomas de la enfermedad o afección que se trata. Se conocen métodos en la técnica para determinar las dosis terapéutica y profilácticamente eficaces para las presentes formulaciones o formulaciones farmacéuticas.

5 En el contexto de la presente invención una “dosis terapéuticamente eficaz” significa una cantidad de un principio farmacéutico activo que cuando se administra produce una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un paciente con una enfermedad musculoesquelética tal como una enfermedad ósea o una enfermedad de las articulaciones (alternativamente o además, dicha enfermedad puede afectar a los tendones y/o ligamentos).

10 Las dosis terapéuticamente eficaces apropiadas de un compuesto farmacéutico activo o principio farmacéutico activo en la presente formulación las puede determinar un médico cualificado con la debida consideración a la naturaleza del compuesto farmacéutico activo o principio farmacéutico activo, el estado y gravedad de la enfermedad, y la edad, tamaño y estado del paciente.

15 Sin limitación, una dosis típica de, por ejemplo, el glucosaminoglucano que se va a administrar puede variar desde aproximadamente 2 mg a 400 mg del glucosaminoglucano por inyección. Por ejemplo, la dosis que se va a administrar puede variar desde aproximadamente 4 mg a 300 mg del glucosaminoglucano por inyección, por ejemplo, desde aproximadamente 8 mg a 200 mg del glucosaminoglucano por inyección. Preferiblemente, la dosis que se va a administrar varía desde aproximadamente 8 mg a 160 mg del glucosaminoglucano por inyección.

20 Sin limitación, una dosis típica de, por ejemplo, la composición celular que se va a administrar puede variar desde aproximadamente $0,05 \times 10^6$ células a 5×10^9 células por inyección. Por ejemplo, la dosis que se va a administrar puede variar desde aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células a 1×10^9 células por inyección. Preferiblemente, la dosis que se va a administrar varía desde aproximadamente 4×10^6 células a 250×10^6 células por inyección.

25 Se reconoce que los tratamientos de la invención pueden comprender la administración de una única dosis terapéuticamente eficaz o la administración de múltiples dosis terapéuticamente eficaces de formulaciones o formulaciones farmacéuticas.

30 Excepto cuando se indica, “sujeto” o “paciente” se usan de forma intercambiable y se refiere a animales, preferiblemente animales de sangre caliente, más preferiblemente vertebrados, incluso más preferiblemente mamíferos, aún más preferiblemente primates y específicamente incluye pacientes humanos y mamíferos no humanos y primates. Los pacientes preferidos son sujetos humanos.

35 Como se usa en el presente documento, una frase tal como “un sujeto en necesidad de tratamiento” incluye sujetos que se beneficiarían de tratamiento de una afección determinada, particularmente de una enfermedad musculoesquelética tal como una enfermedad ósea o una enfermedad de las articulaciones (alternativamente o además, dicha enfermedad puede afectar a los tendones y/o ligamentos). Tales sujetos pueden incluir, sin limitación, los que han sido diagnosticados con dicha afección, los propensos a desarrollar dicha afección y/o de los que se dice que dicha afección se va a prevenir.

40 Los términos “tratar” o “tratamiento” abarcan tanto el tratamiento terapéutico de una enfermedad o afección ya desarrollada, así como medidas profilácticas o preventivas, en donde el fin es prevenir o reducir las posibilidades de incidencia de una afección indeseada, tal como prevenir las probabilidades de evolución de la enfermedad o afección. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, sin limitación, alivio de uno o más síntomas o de uno o más marcadores biológicos, disminución del nivel de la enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (es decir, sin empeoramiento), retraso o ralentización de la evolución de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad, y similares. “Tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia comparado con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

45 Las presentes formulaciones farmacéuticas pueden comprender además de los componentes particularmente especificados en el presente documento uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes farmacéuticos aceptables adecuados dependen de la forma farmacéutica y las identidades de los principios activos y los puede seleccionar el experto en la materia (por ejemplo, mediante referencia a Handbook of Pharmaceutical Excipients 6ª Edición 2009, eds. Rowe et al.). Como se usa en el presente documento, “soporte” o “excipiente” incluye cualquiera de solventes, diluyentes, tampones (tal como, por ejemplo, solución salina tamponada neutra o solución salina tamponada con fosfato), solubilizantes, coloides, medios de dispersión, vehículos, rellenos, agentes quelantes (tal como, por ejemplo, EDTA o glutatión), aminoácidos (tal como, por ejemplo, glicina), proteínas, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, saborizantes, aromatizantes, espesantes, agentes para alcanzar un efecto prolongado, recubrimientos, agentes antifúngicos, conservantes, estabilizantes, antioxidantes, agentes de control de la tonicidad, agentes que retrasan la absorción, y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas se conoce bien en la técnica. Tales materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la actividad de los principios farmacéuticamente activos.

65

La naturaleza precisa del soporte u otro material dependerá de la vía de administración. Por ejemplo, la formulación debe estar en la forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, sin pirógenos y que tenga pH, isotonicidad y estabilidad adecuados.

5 Las formulaciones pueden comprender sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a condiciones fisiológicas, tal como agentes de ajuste de pH y tamponantes, conservantes, agentes complejantes, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, fosfato de sodio, hidróxido de sodio, cloruro de hidrógeno, alcohol bencílico, parabenos, EDTA, oleato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaureato sorbitano, oleato de trietanolamina, etc. Preferiblemente, el valor de pH de la formulación está en el intervalo de pH fisiológico, tal como particularmente el pH de la formulación está entre aproximadamente 5 y aproximadamente 9,5, más preferiblemente entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8,5, incluso más preferiblemente entre aproximadamente 7 y aproximadamente 7,5. La preparación de tales formulaciones farmacéuticas está en la capacidad normal de un experto en la materia.

15 Otro aspecto se refiere al uso de las formulaciones anteriormente mencionadas como un excipiente farmacéutico, más preferiblemente como un excipiente farmacéutico de liberación sostenida o liberación lenta.

20 Los términos "liberación sostenida", "liberación lenta" o "liberación prolongada", como se usan en el presente documento, se refieren en sentido amplio a la liberación de un compuesto de una formulación durante un periodo de tiempo extendido, prolongado o aumentado comparado con la liberación de dicho compuesto de una formulación de referencia tal como una formulación conocida en el estado de la técnica. Como se usa en el presente documento, la liberación sostenida se refiere a la liberación prolongada de uno o más de los componentes de las formulaciones, es decir, del plasma S/D, que puede comprender sustancias biológicas beneficiosas tal como factores de crecimiento endógenos, y del glucosaminoglucano, de la composición celular, o del uno o más compuestos farmacéuticos activos, y opcionalmente de uno o más principio(s) farmacéutico(s) activo(s) adicional(es). Por ejemplo, se sabe del estado de la técnica que la semivida de ácido hialurónico de alto peso molecular en la articulación es aproximadamente de 6 a 8 horas. La liberación sostenida, como se usa en el presente documento, por tanto, se refiere a la liberación extendida de un glucosaminoglucano tal como ácido hialurónico de las presentes formulaciones, por ejemplo, liberación durante uno o más días, tal como durante 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, o durante una o más semanas tal como durante 1,5 semanas, 2 semanas, 3 semanas, o durante uno o más meses. Estos términos, por tanto, también pueden abarcar específicamente liberación extendida, liberación retrasada o liberación controlada.

35 Ejemplos

Ejemplo 1: Comparación entre plasma tratado con solvente/detergente (plasma S/D) humano y plasma fresco congelado (PFC) humano. Características composicionales de formulaciones ejemplares

40 La monografía del producto del plasma S/D, es decir, Octaplas® de Octapharma AG (Lachen, Suiza) proporciona una comparación entre las características de composición de plasma S/D y plasma fresco congelado (PFC) humano, como se muestra en la tabla 1. Según esta información, los productos tienen a un gran nivel composiciones de proteína de plasma comparables; el plasma S/D puede mostrar nivel significativamente menor de inhibidor de plasmina.

45 **Tabla 1:** Características composicionales de plasma S/D, en particular Octaplas®, y plasma fresco congelado (PFC) basado en la monografía del producto Octaplas®

Parámetro	Plasma S/D (n=12) Media (min-max)	PFC intervalos de referencia
Proteína total (mg/ml)	55 (54-57)	48-64
Albumina (mg/ml)	2 (30-34)	28-41
Fibrinógeno (mg/ml)	2,5 (2,4-2,6)	1,45-3,85
IgG (mg/ml)	9,65 (9,15-10,10)	6,60-14,50
IgA (mg/ml)	2,00 (1,80-2,05)	0,75-4,20
IgM (mg/ml)	1,25 (1,20-1,30)	0,40-3,10
Factor V (UI/ml)	0,78 (0,75-0,74)	0,54-1,45
Factor VII (UI/ml)	1,08 (0,90-1,17)	0,62-1,65
Factor X (UI/ml)	0,78 (0,75-0,80)	0,68-1,48
Factor XI (UI/ml)	0,99 (0,91-1,04)	0,42-1,44
Proteína C (UI/ml)	0,85 (0,81-0,87)	0,58-1,64
Proteína S (UI/ml)	0,64 (0,55-0,71)	0,56-1,68
Inhibidor de plasmina (UI/ml)	0,23 (0,20-0,27)	0,72-1,32

5 Revisando la composición del plasma S/D, en particular Octaplas®, y plasma fresco congelado, Svae et al. 2007 concluyeron que no había reducciones críticas en las actividades de factores de coagulación e inhibidores naturales producidas por el proceso de fabricación, incluyendo el tratamiento S/D, mientras que la proteína S y el inhibidor de plasmina pudieron mostrar una disminución del 35% y el 76%, respectivamente (Beeck & Hellstern 1998). Doyle et al. 2003 describieron niveles significativamente menores de proteína S (38%), inhibidor de plasmina (78%), así como factor XI (13%) y factor V (13%), y niveles significativamente aumentados de factor VII (15%) en plasma S/D comparando 16 lotes de Octaplas® con 48 unidades no apareadas de PFC.

10 Se hace referencia a la tabla 1 de Svae et al. 2007 que presenta las características composicionales de 12 lotes consecutivos de Octaplas® frente a 12 unidades aleatorias de PFC en cuarentena. Mientras que la mayoría de los componentes no estaban significativamente alterados, la siguiente tabla 2 reproduce esos componentes de la tabla 1 de Svae et al. 2007 que mostraron diferencias significativas (valor P < 0,05, prueba de la t para datos independientes).

15 **Tabla 2:** Diferencias composicionales entre plasma S/D, es decir, Octaplas®, y PFC, basado en la tabla 1 de Svae et al. 2007

Parámetro	Intervalo normal	Octaplas®	PFC en cuarentena	Valor P
Fibrinógeno (mg 100 ml ⁻¹)	145-385	249 (246-253)	257 (231-283)	< 0,05
Factor VII (UI 100 ml ⁻¹)	62-165	108 (105-112)	95 (84-105)	< 0,05
Factor XI (UI 100 ml ⁻¹)	42-144	99 (97-101)	113 (101-125)	< 0,05
Actividad de proteína S (UI 100 ml ⁻¹)	56-168	64 (61-66)	103 (93-112)	< 0,001
Inhibidor de plasmina (UI 100 ml ⁻¹)	72-132	23 (22-25)	104 (101-107)	< 0,001

20 Además, Theusinger et al. 2011 (Br. J. Anaesth., 106(4):505-11) estudiaron las concentraciones relativas de factores hemostáticos y citoquinas en plasma S/D, es decir, Octaplas®, y plasma fresco congelado (n=25). Observaron que el contenido en factores de coagulación era similar para plasma S/D y PFC, pero el plasma S/D contenía menos factor V, factor de von Willebrand (vWF), y proteasa que corta el factor de von Willebrand (vWFCP, ADAMTS-13). Las concentraciones de citoquinas (TNF α , IL-8 e IL-10) eran significativamente mayores en PFC.

25 Además, el proceso S/D puede llevar a pérdidas del factor V lábil, factor VIII, las actividades de inhibidor de serina proteasa (serpin) de α 1-antitripsina y α 2-antiplasmina, pero no antitrombina (Benjamin & McLaughlin 2012; Mast et al. 1999). La pérdida del factor VIII se asocia con una disminución en el factor von Willebrand (vWF) de alto peso molecular). En un estudio de Sachs et al. 2005 muestras de plasma S/D (n=5) dieron negativas para anticuerpos específicos de granulocitos, así como HLA de clase I y clase II.

30 La tabla 3 proporciona una visión de conjunto de distinciones demostrables entre plasma S/D, es decir, Octaplas®, y plasma fresco congelado, detectadas en los estudios anteriormente mencionados.

35 **Tabla 3:** Diferencias ejemplares entre plasma S/D, es decir, Octaplas®, y plasma fresco congelado

Parámetro	Octaplas®	PFC	Referencias
Actividad de proteína S	Reducido	Normal	Octapharma AG sitio web Doyle et al. 2003 Benjamin & McLaughlin 2012
Factor V*	Reducido	Normal	Doyle et al. 2003 Theusinger et al. 2011 Benjamin & McLaughlin 2012
Factor VIII*	Reducido	Normal	Doyle et al. 2003
Factor X	Reducido	Normal	Benjamin & McLaughlin 2012
α 2-antiplasmina	Reducido	Normal	Benjamin & McLaughlin 2012
Antitripsina	Reducido	Normal	Mast et al. 1999
vWF	Reducido	Normal	Theusinger et al. 2011
ADAMTS-13	Reducido	Normal	Theusinger et al. 2011
Citoquinas (TNF α , IL-8, IL-10)	Reducido	Normal	Theusinger et al. 2011
Presencia de solvente, detergente	TNBP 2 μ g/ml (max), Triton X-100 5 μ g/ml (max)	-	Octapharma AG sitio web
Excipiente	Citrato de sodio dihidrato	-	Octapharma AG sitio web
	Dihidrogenofosfato de sodio dihidrato, glicina		

En conclusión, se han documentado numerosas diferencias composicionales entre plasma S/D humano y plasma fresco congelado. Una característica particularmente marcada del plasma S/D puede ser un nivel reducido de inhibidor de plasmina frente a PFC, tal como un nivel de inhibidor de plasmina igual a o menor de 0,60 UI/ml o igual a o menor de 0,50 UI/ml, por ejemplo, un nivel de inhibidor de plasmina entre 0,20 y 0,30 UI/ml, más específicamente entre 0,22 y 0,25 UI/ml.

Comportamiento de coagulación

Los experimentos posteriores emplearon los siguientes tipos de plasma humano: plasma S/D, es decir, Octaplas®, plasma procesado en un tubo heparinizado, plasma procesado en un tubo que contenía EDTA o plasma procesado en un tubo con citrato. El plasma se preparó como sigue: la sangre se recogió directamente en los tubos correspondientes, es decir, tubos heparinizados, con EDTA o con citrato y los tubos se centrifugaron a 1500g durante 10 minutos a temperatura ambiente para recoger el plasma como sobrenadante. Puesto que el plasma S/D es plasma descelularizado por filtración, los otros tipos de plasma se filtraron, donde así se indica, a través de un filtro de 0,2 µm para asegurar la ausencia de células, tal como plaquetas, o restos. El volumen de la reacción de mezcla fue 250 µl o 500 µl. Cada constituyente y la mezcla se mantuvieron a 37°C. El tiempo de coagulación se determinó a 37°C para una mezcla que contenía el respectivo tipo de plasma, el 10 o 20% v/v de suero, y el 2,5 o 5% v/v de CaCl₂ (0,546 M). El tiempo de coagulación se midió por observación visual opcionalmente durante o después de la agitación del tubo. Se ensayaron cinco muestras. Los resultados se resumen en la tabla 4.

No hubo distinción en los resultados obtenidos para el 2,5% y el 5% de CaCl₂ y para el 10 o el 20% de suero.

Tabla 4: Comportamiento de coagulación de plasma S/D, es decir, Octaplas® frente a otros tipos de plasma

Plasma	Sin filtrar (n=5)		Filtrado (n=5)	
	Tiempo medio de coagulación (s)	DE	Tiempo medio de coagulación (s)	DE
Plasma S/D	588	62	594	91
Heparinizado	ND (> 1h)	/	ND (> 1h)	/
con EDTA	804	465	1320	659
con citrato	384	271	816	343

No se observó formación de coágulo con plasma heparinizado, sin filtrar o filtrado (descelularizado). La filtración del plasma S/D no mostró diferencias significativas en el tiempo de coagulación (p = 0,7780, prueba de la t para datos emparejados) mientras que se observó un aumento significativo para el plasma con EDTA (p = 0,0053, prueba de la t para datos emparejados) y para el plasma con citrato (p = 0,0143, prueba de la t para datos emparejados). Sin embargo, la formación de coágulo con plasma S/D fue aproximadamente el 50% hasta más del 100% más rápida comparado con plasma con citrato y plasma con EDTA, respectivamente. En consecuencia, el plasma S/D, ejemplificado por Octaplas®, se diferencia de otros tipos de plasma con respecto a propiedades de coagulación.

Una característica marcada del plasma S/D, particularmente plasma S/D descelularizado, puede ser, por tanto, un tiempo de coagulación reducido. Por ejemplo, el tiempo de coagulación puede ser menor que o igual a 700 segundos, o menor que o igual a 600 segundos, tal como entre 500 y 700 segundos, o entre 550 y 600 segundos, cuando se mide a 37°C en una mezcla que comprende plasma S/D humano descelularizado, el 10 o el 20% v/v de suero y el 2,5 o 5% v/v de CaCl₂ (0,546 M).

Ejemplo 2: Formación de gel por plasma tratado con solvente detergente (S/D) humano (Octaplas®) y ácido hialurónico (AH)

Formación de coágulo/gel por Octaplas® y AH

Se ensayó el comportamiento de plasma S/D humano, en particular Octaplas® en combinación con líquido sinovial de pacientes artríticos (n=2). El líquido sinovial se puso en contacto a una proporción 1:1 v/v con una formulación según una forma de realización de la presente invención que comprende Octaplas®, ácido hialurónico (hialuronato de sodio 10 mg/ml, peso molecular de 1,8-2.10⁶ Da, proporcionado por Contipro, República Checa) y CaCl₂. Se ensayaron tres concentraciones de CaCl₂, es decir, CaCl₂ 0, 2 y 4 mg/ml. La formación de gel se evaluó visualmente después de diferentes puntos de tiempo (20-30 min, 1h, 2h) usando un temporizador. La viscosidad se evaluó midiendo el tiempo necesario para que las soluciones alcanzaran una escala definida en la pared del envase cuando el tubo de reacción se dio la vuelta. La prueba se realizó dos veces en líquido sinovial de dos pacientes artríticos.

La incubación de una formulación que incluye CaCl₂ 4 mg/ml con líquido sinovial indujo la formación de un gel que era más viscoso comparado con un gel obtenido poniendo en contacto líquido sinovial con una formulación que incluye CaCl₂ 2 mg/ml. Tras poner en contacto la formulación sin CaCl₂ con líquido sinovial, no se observó formación de coágulo.

Formación de coágulo/gel por OctaplasLG AB® y AH en presencia de líquido sinovial

Se ensayó el comportamiento de plasma S/D humano, en particular OctaplasLG AB® en combinación con líquido sinovial de pacientes artrósicos (n=5). El líquido sinovial se puso en contacto a una proporción 1:2 (v/v) con una formulación según una forma de realización de la presente invención que comprende OctaplasLG AB®, AH (hialuronato de sodio 10 mg/ml, peso molecular de 2-3.10⁶ Da, proporcionado por HTL Biotechnology, Francia), clorhidrato de clonidina (HCl) (200 µg/ml, comprado de PCAS laboratory, Finlandia) y CaCl₂ (4 mg/ml, Calciclo®, proporcionado por Sterop Group, Bélgica) para mimetizar el estado clínico. La formación de coágulo/gel de evaluó visualmente después de 30 minutos a 37°C (incubador humidificado, CO₂ al 5%).

Una vez en contacto con líquido sinovial, esta formulación formó un coágulo en 30 minutos.

En otro experimento, se ensayaron tres concentraciones de CaCl₂ (es decir, CaCl₂ 0, 2 y 4 mg/ml) en la formulación mencionada anteriormente. La prueba se realizó dos veces en líquido sinovial de pacientes artrósicos (n=2). La incubación de una formulación que incluye CaCl₂ 4 mg/ml o 2 mg/ml con líquido sinovial indujo la formación de un gel de la misma viscosidad. Sin embargo, tras mezclar una formulación sin CaCl₂ con líquido sinovial, no se observó formación de coágulo. La dosis de CaCl₂ 2 mg/ml (14 mM), por tanto, se eligió en la formulación final.

En conclusión, en este experimento, se requería Ca²⁺ para la formación de coágulo en presencia de líquido sinovial. Puede ser necesario añadir Ca²⁺ a una formulación que ilustra la presente invención en particular cuando se encuentra o espera que no esté presente a niveles adecuados en tejidos de articulaciones.

Formación de coágulo/gel por OctaplasLG AB® y AH en presencia de sangre completa

Se investigó el efecto gelificante de OctaplasLG AB® con AH en combinación con sangre completa de un donante sano (n=1) para evaluar su potencial para formar una matriz que incluye factores de crecimiento derivados de plaquetas. En este estudio se ensayó el comportamiento de una formulación que comprende OctaplasLG AB®, AH (hialuronato de sodio 4 mg/ml, peso molecular de 2-3.10⁶ Da, proporcionado por HTL Biotechnology, Francia) y CaCl₂ (2 mg/ml, Calciclo®, proporcionado por Sterop Group, Bélgica) en combinación con sangre completa recogida en tubos con citrato (#VF054SBCS07, Venosafe, Terumo). El tiempo de coagulación se midió por observación visual después de agitación del tubo/homogenización de la solución.

Los resultados mostraron que una vez en contacto con sangre con citrato a una proporción 1:1 (v/v), esta formulación formó un coágulo en 15 minutos a 37°C (incubador humidificado, CO₂ al 5%).

Formación de coágulo/gel por Octaplas® y AH comparado con otros tipos de plasma

Se ensayó la consistencia de varias formulaciones. Las formulaciones contenían ácido hialurónico (hialuronato de sodio, peso molecular de 2-3.10⁶ Da, proporcionado por HTL Biotechnology, Francia), CaCl₂ y Octaplas® o el mismo volumen de los siguientes tipos de plasma humano (sin filtrar): plasma procesado en un tubo heparinizado, plasma procesado en tubo que contiene EDTA, o plasma procesado en un tubo con citrato (véase la tabla 5 para la composición de las formulaciones).

Tabla 5: Composición de las formulaciones

	Volumen	Solución madre	Concentración final
Plasma	950 o 900 µl	100%	95 o 90%
CaCl ₂	50 o 100 µl	80,3 mg/ml	4 u 8 mg/ml
ácido hialurónico	NA	NA	4 a 20 mg/ml

Se añadió suero humano preparado de sangre periférica a una proporción 1:1 v/v al producto y se incubó a 37°C con agitación. La consistencia se observó visualmente después de 30 minutos, 1 h y 24 h.

La tabla 6 proporciona una evaluación semicuantitativa de la gelificación con varios tipos de plasma. Después de 1 hora, la formulación que contiene Octaplas® mostró una consistencia viscosa, incluso consistencia gelificada. La formulación que contiene plasma heparinizado permanecía líquida después de 1 hora (Tabla 6). la formulación que contiene Octaplas® era más viscosa que las formulaciones que contenían plasma procesado en un tubo que contenía EDTA o plasma procesado en tubo con citrato (tabla 6). En consecuencia, la formulación que contiene Octaplas® era más viscosa que las formulaciones que contienen otros tipos de plasma.

Tabla 6: Gelificación con Octaplas® frente a otros tipos de plasma (sin filtrar) en presencia de AH

Plasma	Consistencia después de 30 min	Consistencia después de 1 h	Consistencia después de 24 h
Octaplas®	Viscosa +++	Viscosa +++	Viscosa ++
Plasma heparinizado	Líquida	Líquida	Líquida

Plasma con EDTA	Viscosa +	Viscosa +	ND
Plasma con citrato**	Viscosa +	Viscosa +	ND

* Octaplas® es plasma filtrado, es decir, plasma sin constituyentes/componentes celulares

** Resultados obtenidos después de agitación

Formación de coágulo/gel por Octaplas® en presencia o ausencia AH

- 5
- Se comparó la consistencia entre formulaciones que contenían Octaplas®, CaCl₂ y suero, con o sin ácido hialurónico (hialuronato de sodio, peso molecular de 2-3.10⁶ Da, proporcionado por HTL Biotechnology, Francia). Se preparó una formulación sin ácido hialurónico a 37°C mezclando los siguientes componentes: 2 ml de Octaplas®, 222 µl de suero, y 22 µl de solución madre de CaCl₂ 30 mg/ml (preparada de sal CaCl₂ de Sigma en agua). Se preparó una
- 10 formulación con ácido hialurónico a 37°C mezclando los siguientes componentes: AH 8 mg/ml previamente disuelto en 2 ml de Octaplas®, 222 µl de suero, y 22 µl de solución madre de CaCl₂ 30 mg/ml (preparada de sal CaCl₂ de Sigma en agua). El tiempo de coagulación se midió por observación visual y agitación del tubo. La prueba se realizó una vez.
- 15 Tras inspección visual, se formó un coágulo o fase gelificada en ambas formulaciones. La formulación con AH, sin embargo, contenía perceptiblemente menos fase líquida y se pudo manipular sin cambios. Por el contrario, el coágulo sin AH se rompió y liberó líquido tras la manipulación del coágulo.

Formulación de administración celular basada en plasma S/D y AH

- 20 Una formulación ejemplar, no limitante adecuada para administración intra-ósea de células a un sujeto humano comprende, consiste esencialmente en o consiste en plasma S/D humano, particularmente Octaplas®, AH 20 mg/ml, una composición celular que comprende células madre mesenquimatosas (MSC) autólogas o alogénicas aisladas de médula ósea humana o una composición celular que comprende células osteoblásticas, y CaCl₂ 20 mg/ml. La
- 25 formulación se administra a un sitio de defecto óseo en el paciente.

Ejemplo 3: Formación de gel por plasma S/D humano tal como Octaplas® y una composición celular

Formación de coágulo/gel por Octaplas® y medio de cultivo celular que contiene Ca²⁺

- 30 Se ensayó la formación de coágulo para varias formulaciones sin células, pero que comprenden plasma S/D humano, en particular Octaplas®, un medio de cultivo convencional (que contiene CaCl₂) y suero humano. Se ensayaron diferentes condiciones para verificar la formación de coágulo a 37°C tal como Octaplas® a diferentes concentraciones, por ejemplo, el 5%, v/v, el 7,5%, v/v o el 10%, v/v; diferentes medios de cultivo convencionales, por
- 35 ejemplo, DMEM, MEM, PBS o PBS más CaCl₂; y la ausencia o presencia de suero al 5 o el 10% v/v. La formación de un coágulo se observó visualmente cuando se combinaron Octaplas®, un medio de cultivo convencional (que contiene CaCl₂) y suero en ausencia de células.
- 40 Se pudo concluir que la presencia de suero, así como la presencia de calcio en el medio de cultivo parecen necesarias para la formación de coágulo en ausencia de células.

Formación de coágulo/gel por Octaplas® y una composición celular

- 45 Se sembraron MSC de médula ósea a 57000 células/cm² en botellas de plástico en medio de cultivo convencional (DMEM) que contenía plasma S/D, en particular Octaplas®, al 5% v/v, al 10% v/v, o al 15% v/v. Las botellas se colocaron directamente a 37°C en un incubador con CO₂ al 5%. La gelificación del medio se observó en menos de una hora a 37°C. El medio celular que contenía plasma S/D humano, en particular Octaplas®, cambió la consistencia de líquida a gelificada (gel) en 30 minutos después del contacto.
- 50 Los datos anteriores muestran la capacidad de una formulación que comprende plasma S/D y células en medio de cultivo celular que contiene Ca²⁺ para gelificar en comparación con un cultivo celular en medio de cultivo celular que contiene Ca²⁺ con suero, es decir, en condiciones de cultivo celular convencionales, de las que en general se sabe que permanecen líquidas.

55 Formación de coágulo/gel por Octaplas®, otros tipos de plasma y una composición celular

- Se evaluó la consistencia de una composición de cultivo celular con diferentes tipos de plasma humano - Octaplas®, plasma procesado en un tubo heparinizado, plasma procesado en un tubo que contiene EDTA, o plasma procesado en un tubo con citrato.
- 60 Se sembraron 57000 células/cm² de células osteoprogenitoras cultivadas de células de médula ósea en una botella T25 de plástico en 6 ml de medio de cultivo (85% v/v) suplementado con el 15% v/v de los respectivos plasmas a 37°C. Los resultados se resumen en la tabla 7. El medio permaneció líquido con plasma heparinizado (tabla 7). No se observó diferencia en este experimento inicial entre Octaplas®, plasma con EDTA y plasma con citrato (tabla 7).

Tabla 7: Tiempo de gelificación/coagulación para los diferentes tipos de plasma ensayados en presencia de células

Plasma (sin filtrar)	Tiempo de gelificación**
Octaplas®*	< 15 min
Plasma heparinizado	> 1 h (sin gelificación)
Plasma con EDTA	< 15 min
Plasma con citrato	< 15 min

* Octaplas® es plasma filtrado, es decir, plasma sin constituyentes/componentes celulares

5 ** Se ensayaron tres cultivos para cada tipo de plasma

Formulación de administración celular basada en plasma S/D

10 Una formulación ejemplar, no limitante adecuada para administración intra-ósea de células a un sujeto mamífero comprende, consiste esencialmente en o consiste en plasma S/D, particularmente Octaplas®, una composición celular que comprende células madre mesenquimatosas (MSC) autólogas o alogénicas aisladas de médula ósea o una composición celular que comprende células osteoblásticas, y CaCl₂ 2-8 mg/ml. La formulación se administra a un sitio de defecto óseo en un modelo de ratón de osteotomía calvaria.

15 **Ejemplo 4: Formación de gel por plasma S/D humano tal como Octaplas®**

20 Una formulación farmacéutica ejemplar, no limitante que comprende plasma S/D y un principio farmacéutico activo, en donde la formulación es adecuada para uso terapéutico em defectos óseos, consiste esencialmente en o consiste en plasma S/D, particularmente Octaplas®, un factor de crecimiento (IL-8 a 30 µg/ml) y CaCl₂ 2-8 mg/ml. La formulación se administra a un sitio de defecto óseo en un modelo de ratón desnudo de osteotomía calvaria. 4 semanas después de la administración de la formulación, la reparación del hueso se puede ver claramente en los ratones tratados comparados con control sin IL-8 (véase la figura 1 y 2).

25 **Lista de referencias**

Bibliografía no de patentes

30 Beeck H, Hellstern P. In vitro characterization of solvent/detergent-treated human plasma and of quarantine fresh frozen plasma. Vox Sang. 1998;74 Supl 1:219-23.

Benjamin RJ, McLaughlin LS. Plasma components: properties, differences, and uses. Transfusion. Mayo 2012;52 Supl 1:9S-19S.

35 Burgess WH, Maciag T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. Annu Rev Biochem. 1989;58:575-606.

Cole, B.J., Seroyer, S.T., Filardo, G., Bajaj, S., Fortier, L.A., 2010. Platelet-Rich Plasma. Sports Health 2, 203-210.

40 Doyle S, O'Brien P, Murphy K, Fleming C, O'Donnell J. Coagulation factor content of solvent/detergent plasma compared with fresh frozen plasma. Blood Coagul Fibrinolysis. Abr 2003;14(3):283-7.

45 Frescaline G, Boudierlique T, Huynh MB, Papy-Garcia D, Courty J, Albanese P. Glycosaminoglycans mimetics potentiate the clonogenicity, proliferation, migration and differentiation properties of rat mesenchymal stem cells. Stem Cell Res. Mar 2012;8(2):180-92.

Gobbi, A., Bathan, L., 2009. Biological approaches for cartilage repair. J Knee Surg 22, 36-44.

50 Grimaud, E., Heymann, D., Redini, F., 2002. Recent advances in TGF-beta effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF-beta in cartilage disorders. Cytokine Growth Factor Rev. 13,241-257.

Hausser HJ, Brenner RE. Low doses and high doses of heparin have different effects on osteoblast-like Saos-2 cells in vitro. J Cell Biochem. Abr 2004 1;91(5):1062-73.

55 Hellstern P, Solheim BG. The Use of Solvent/Detergent Treatment in Pathogen Reduction of Plasma. Transfus Med Hemother. 2011;38(1):65-70.

Horowitz B, Bonomo R, Prince AM, Chin SN, Brotman B, Shulman RW. Solvent/detergent-treated plasma: a virus-inactivated substitute for fresh frozen plasma. Blood. 1 Feb 1992;79(3):826-31.

Lyon M, Rushton G, Gallagher JT. The interaction of the transforming growth factor-betas with heparin/heparan sulfate is isoform-specific. *J Biol Chem.* 18 Jul 1997;272(29):18000-6.

5 Mast AE, Stadanlick JE, Lockett JM, Dietzen DJ. Solvent/detergent-treated plasma has decreased antitrypsin activity and absent antiplasmin activity. *Blood.* 1 Dic 1999;94(11):3922-7.

10 McCaffrey TA, Falcone DJ, Brayton CF, Agarwal LA, Welt FG, Weksler BB. Transforming growth factor-beta activity is potentiated by heparin via dissociation of the transforming growth factor-beta/alpha 2-macroglobulin inactive complex. *J Cell Biol.* Jul 1989;109(1):441-8.

Park SH, Cui JH, Park SR, Min BH. Potential of fortified fibrin/hyaluronic acid composite gel as a cell delivery vehicle for chondrocytes. *Artif Organs.* Jun 2009;33(6):439-47.

15 Sachs UJ, Kauschat D, Bein G. White blood cell-reactive antibodies are undetectable in solvent/detergent plasma. *Transfusion.* Oct 2005;45(10):1628-31.

Svae TE, Frenzel W, Heger A, Romisch J. Quality differences between solvent/detergent plasmas and fresh-frozen plasma. *Transfus Med.* Agosto 2007;17(4):318-20.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación farmacéutica que comprende plasma tratado con solvente/detergente (plasma S/D) y ácido hialurónico o un derivado del mismo, en donde el derivado de ácido hialurónico es una sal de ácido hialurónico, un éster de ácido hialurónico con un alcohol de la serie alifática, heterocíclica o cicloalifática, o una forma sulfatada de ácido hialurónico.
- 10 2. La formulación farmacéutica según la reivindicación 1, en donde la formulación farmacéutica comprende el ácido hialurónico o derivado del mismo en una concentración que varía desde aproximadamente 0,10 mg/ml hasta aproximadamente 200 mg/ml.
- 15 3. La formulación farmacéutica según la reivindicación 1, en donde la formulación farmacéutica se produce por un método que comprende combinar el plasma S/D y el ácido hialurónico o derivado del mismo.
- 20 4. La formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el plasma S/D es plasma S/D humano.
- 25 5. La formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además uno o más glucosaminoglucanos adicionales.
- 30 6. La formulación farmacéutica según la reivindicación 5, en donde uno de los glucosaminoglucanos adicionales es un sulfato de condroitina.
- 35 7. La formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además uno o más principios farmacéuticos activos.
- 40 8. La formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además suero, preferiblemente suero humano.
- 45 9. La formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además sangre completa o un componente fraccionado de sangre completa, preferiblemente en donde la sangre completa es sangre completa humana.
- 50 10. La formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el uno o más principio farmacéutico activo se selecciona, cada uno independientemente, del grupo que consiste en: una composición celular, un compuesto farmacéutico activo, una proteína, un péptido, y una molécula orgánica pequeña.
- 55 11. La formulación farmacéutica según la reivindicación 10, en donde la composición celular comprende células madre mesenquimatosas (MSC), osteoprogenitores, células osteoblásticas, osteocitos, células condroblásticas y/o condrocitos.
- 60 12. La formulación farmacéutica según la reivindicación 10, en donde el compuesto farmacéutico activo es un agonista del receptor alfa-2 adrenérgico, preferiblemente el agonista del receptor alfa-2 adrenérgico se selecciona del grupo que consiste en clonidina y derivados de la misma.
- 65 13. La formulación farmacéutica según la reivindicación 10, en donde la proteína o péptido farmacéuticamente activo es un factor de crecimiento, preferiblemente un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), un factor de crecimiento transformante beta (TGFB), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), interleucina-8 (IL-8), una proteína morfogenética ósea (BMP), hormona paratiroidea (PTH), proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrp), y factor de células madre (SCF); más preferiblemente un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en FGF-2, TGFB-1, PDGF, IL-8, BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, PTH, PTHrp y SCF.
14. La formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que está configurada para la administración parenteral, preferiblemente para la administración intra-ósea, peri-ósea, intra-articular o peri-articular, o para la administración intra-tendón, peri-tendón, intra-ligamento o peri-ligamento.
15. La formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso en el tratamiento de una enfermedad musculoesquelética, preferiblemente en donde la enfermedad musculoesquelética es una enfermedad ósea o una enfermedad de las articulaciones.
16. El uso de una formulación que comprende plasma S/D y ácido hialurónico o un derivado del mismo como un excipiente farmacéutico, en donde el derivado de ácido hialurónico es una sal de ácido hialurónico, un éster de ácido hialurónico con un alcohol de la serie alifática, heterocíclica o cicloalifática, o una forma sulfatada de ácido hialurónico.

- 5
17. El uso según la reivindicación 16, en donde la formulación comprende el ácido hialurónico o derivado del mismo en una concentración que varía desde aproximadamente 0,10 mg/ml hasta aproximadamente 200 mg/ml.
18. El uso según la reivindicación 16, en donde la formulación se produce por un método que comprende combinar el plasma S/D y el ácido hialurónico o derivado del mismo.
- 10
19. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde el plasma S/D es plasma S/D humano.
20. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en donde la formulación comprende además uno o más glucosaminoglucanos adicionales.
- 15
21. El uso según la reivindicación 20, en donde uno de los glucosaminoglucanos adicionales es un sulfato de condroitina.
- 20
22. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, en donde la formulación farmacéutica está configurada para la administración parenteral, preferiblemente para la administración intra-ósea, peri-ósea, intra-articular o peri-articular, o para la administración intra-tendón, peri-tendón, intra-ligamento o periligamento.

Fig. 1

A



B

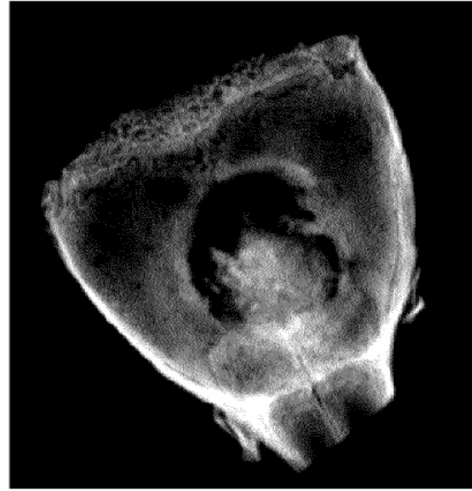
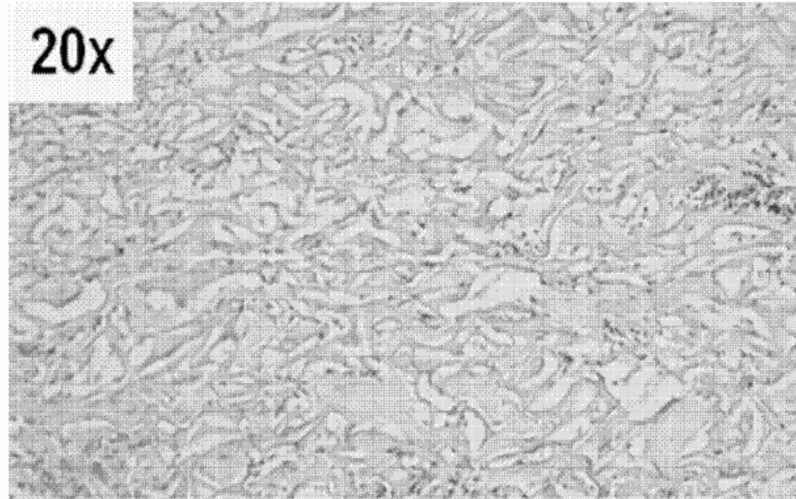


Fig. 2

A



B

