

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 984**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00	(2006.01)
A61L 26/00	(2006.01)
A61K 47/02	(2006.01)
A61K 47/18	(2007.01)
A61K 9/06	(2006.01)
A61K 47/34	(2007.01)
A61K 47/38	(2006.01)
A61K 35/14	(2015.01)
A61K 8/98	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2012 PCT/GB2012/052911**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2013 WO13076507**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2012 E 12795041 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2782555**

54 Título: **Gel de lisado de plaquetas**

30 Prioridad:

23.11.2011 GB 201120224
23.11.2011 GB 201120230
23.11.2011 GB 201120231
23.11.2011 GB 201120235

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.11.2019

73 Titular/es:

CELL THERAPY LIMITED (100.0%)
Institute of Life Sciences, First Floor, Room 137,
School of Medicine, Swansea University,
Singleton Park
Swansea SA2 8PP, GB

72 Inventor/es:

HOUZE, THOMAS AVERELL;
EVANS, MARTIN JOHN;
REGINALD, AJAN;
PIEPER, INA LAURA y
PERKINS, BRIAN LEE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 730 984 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

Gel de lisado de plaquetas

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un lisado de plaquetas y su uso para tratar una herida, una fisura anal, atrofia vaginal o una arruga.

10 **Antecedentes de la invención**

Aproximadamente el 15 % de los diabéticos tendrán una úlcera en su vida. Incidencia anual, basada en la población, del 1 % al 3,6 % en personas con diabetes tipo 1 o tipo 2. Para el año 2030, aproximadamente 13 millones de personas sufrirán una úlcera de pie diabético cada año. Las úlceras de pie preceden a más del 84 % de las amputaciones no traumáticas de miembros inferiores. Además, la mortalidad a 3 años después de una primera amputación se ha estimado en un 20-50 %. El coste promedio de curar una úlcera única es de 8.000 \$, el de una úlcera infectada es de 17.000 \$ y el de una amputación mayor es de 45.000 \$. El coste en exceso atribuido a las úlceras de pie y sus secuelas promedió 27.987 \$ por paciente durante un período de 2 años después de la presentación de la úlcera (American Diabetes Association; US Department of Health and Human Services; Diabetes Care; Journal of Clinical investigations; JAMA 293:217-228, 2005; Diabetes Care 22:157-162, 1999).

El flujo de sangre libre a un sitio de lesión proporciona acceso para la señalización de moléculas y nutrientes. La regulación de la proliferación y remodelación de la formación de colágeno requiere la coordinación de los procesos moleculares (por ejemplo, el equilibrio de la proteasa y el inhibidor de la proteasa). La respuesta inmunitaria e inflamatoria garantiza que las bacterias y los residuos se fagociten y se eliminen para evitar infecciones (J Invest Dermatol. Mayo de 2007;127(5):1018-29). Si no se trata, una úlcera diabética puede progresar desde un pequeño parche cutáneo irritado pero no roto a una herida potencialmente mortal que implica una muerte extensa de tejidos e infección. El tratamiento de la úlcera cutánea diabética puede incluir secar la herida, desbridar (extirpar) el tejido muerto y administrar antibióticos sistémicos. (American College of Foot and Ankle Surgeons; sitio web de Medscape; Clinical Diabetes Spring 2009 vol. 27 n.º 2 52-58).

Con respecto al uso de lisado de plaquetas en cosméticos, es bien sabido que una piel sana requiere una coordinación estrecha a nivel fisiológico, celular y molecular. Las tres funciones importantes requeridas para una piel sana y sostenida incluyen el funcionamiento de las células del tejido conectivo, la matriz extracelular (MEC) de la piel sana y la regulación molecular estricta del proceso de proliferación y remodelación.

El proceso para formar tejido nuevo requiere la acción y el equilibrio de una serie de factores que incluyen proteasas, inhibidores de tejidos y moléculas pro- y antiinflamatorias. La regulación coordinada de estos factores asegura que se genere tejido de colágeno permanente mientras el armazón temporal se degrada.

40 *Funcionamiento de las células del tejido conectivo*

Las células de la piel, tales como fibroblastos y queratinocitos, se requieren para sintetizar, mantener y proporcionar la matriz extracelular (MEC) que funciona como el marco estructural de la piel. Es especialmente importante que los fibroblastos, que producen la mayoría del colágeno en la piel, se mantengan sanos y elásticos [1]. Las soluciones basadas en plaquetas y factores de crecimiento mejoran la curación de heridas mediante el aumento de la concentración local de factores beneficiosos [2, 3]. Las terapias actuales son invasivas o aceleran mínimamente el proceso de curación de heridas. Un apósito avanzado, como el gel hidrocólicoide, tiene una mejora limitada con respecto a la gasa tradicional no adherente en el tratamiento de las úlceras diabéticas [6]. Los avances tecnológicos en la curación de heridas también se han limitado en los últimos 15 años, con poca mejora en cuanto a los resultados del año de vida ajustado por la calidad del paciente (QALY, por sus siglas en inglés) [7].

En la piel sana, las fibrillas de colágeno tipo I sanas en la dermis proporcionan estabilidad mecánica y sitios de unión para los fibroblastos. Los receptores (integrinas) en la superficie de los fibroblastos se adhieren al colágeno (y otras proteínas en la matriz extracelular dérmica). La maquinaria del citoesqueleto (microfilamentos de actina-miosina, no mostrados) dentro de los fibroblastos tira de la matriz de colágeno sana, que a su vez ofrece resistencia mecánica. La tensión mecánica dinámica que se crea promueve el ensamblaje de armazones intracelulares (microtúbulos/filamentos intermedios, que no se muestran), que empujan hacia afuera para hacer que los fibroblastos se estiren. Este estiramiento es necesario para que los fibroblastos produzcan niveles normales de colágeno y proteasas.

Matriz extracelular de la piel sana (MEC)

Un equilibrio saludable de colágeno sano (la proteína más abundante en la MEC), elastina, ácido hialurónico, proteoglicanos, fibronectina y laminina es necesario para una piel saludable y sin arrugas. Estos componentes crean un armazón para apoyar la piel y darle una textura distribuida uniformemente [8].

Regulación molecular estricta del proceso de proliferación y remodelación.

La formación de tejido nuevo requiere la acción y el equilibrio de una serie de factores que incluyen proteasas, inhibidores de tejidos y moléculas pro- y antiinflamatorias. La regulación coordinada de estos factores asegura que se genere tejido de colágeno permanente; que las moléculas dañadas se escindan y se eliminen, y la salud general del tejido conectivo [9].

Todos los colágenos fibrilares consisten en tres cadenas polipeptídicas enrolladas entre sí en una configuración de triple hélice. La triple hélice soluble, que se denomina procolágeno, se ensambla dentro de los fibroblastos. El procolágeno se secreta a partir de los fibroblastos, y los extremos peptídicos se eliminan mediante dos enzimas en el espacio extracelular [10]. La eliminación de los extremos produce colágeno, que se ensambla espontáneamente (es decir, madura) en fibras grandes que se entrecruzan enzimáticamente. Este entrecruzamiento es necesario para el soporte estructural normal [11]. El colágeno tipo I sufre una degradación natural mediante degradación enzimática; sin embargo, esta degradación en la piel humana es extremadamente lenta [12]. Los seres humanos expresan solo cuatro enzimas que son capaces de iniciar la degradación del colágeno tipo I [13].

Estas colagenasas son miembros de una familia de enzimas de degradación de proteínas de la matriz, denominadas metaloproteinasas de matriz (MMP, de sus siglas en inglés) [14]. Las MMP son responsables de la degradación fisiológica de varias proteínas de la matriz extracelular [12]. De las cuatro colagenasas que se expresan en seres humanos, solo la colagenasa intersticial (MMP-1) está implicada en el recambio normal de colágeno de la piel [14]. En pieles jóvenes sanas, la expresión de MMP-1 es extremadamente baja, cerca del límite de detección mediante los métodos de medición más sensibles.

Una vez escindido mediante MMP-1, el colágeno se deshace, luego el colágeno deshecho, llamado gelatina, luego sufre una mayor degradación mediante otros miembros de la familia de las MMP, llamados gelatinasas. Estas gelatinasas también se expresan en niveles muy bajos en la piel normal [14, 15]. Además, la piel expresa inhibidores naturales de estas MMP. Estos inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de matriz (TIMP, de sus siglas en inglés) actúan además para retardar la degradación del colágeno. Por lo tanto, el colágeno tipo I en la piel humana es muy estable, y requiere de aproximadamente 30 años en promedio para ser reemplazado [1, 12].

Arrugas

Las arrugas son causadas por las expresiones faciales habituales, el envejecimiento, el daño solar, el hábito de fumar, la hidratación deficiente y otros factores. Bajo estrés, los fibroblastos producen menos moléculas de la MEC y más moléculas que rompen la matriz existente. Esto conduce a un mal funcionamiento adicional de las células del tejido conectivo en un circuito de retroalimentación.

Mal funcionamiento de las células del tejido conectivo

Existe una relación delicada entre la tensión mecánica, la síntesis de colágeno y la fragmentación del colágeno mediante la colagenasa (COLasa) en la piel humana. En la piel humana envejecida, las uniones de los fibroblastos a las integrinas se pierden y las fibrillas de colágeno fragmentadas no proporcionan una estabilidad mecánica suficiente para mantener la tensión mecánica normal. La tensión mecánica reducida hace que los fibroblastos se colapsen y los fibroblastos colapsados producen menos procolágeno y más colagenasa (COLasa). La reducción de la producción de colágeno y el aumento de la fragmentación del colágeno catalizada por la colagenasa dan como resultado una reducción adicional de la tensión mecánica, lo que provoca una pérdida continua de colágeno [1].

Degradación de la MEC existente

Las moléculas de la MEC existentes, especialmente las fibras de colágeno, se descomponen a través de daños físicos, químicos o proteolíticos, dejando colágeno y otros fragmentos moleculares en toda la MEC.

La lenta tasa de rotación de colágeno tipo I permite la acumulación de modificaciones dependientes de la edad que afectan sus funciones. Estas alteraciones incluyen la formación de nuevos enlaces cruzados procedentes de los azúcares [14]. De manera importante, estos enlaces cruzados no son capaces de descomponerse y eliminarse de manera eficaz durante el lento proceso normal de la rotación mediada por MMP, lo que provoca la acumulación de colágeno fragmentado dentro de la matriz extracelular a medida que la piel envejece [15, 16]. Los enlaces entrecruzados evitan la eliminación completa de los fragmentos de colágeno. Los fragmentos no se pueden reparar ni incorporar en fibrillas de colágeno recién fabricadas y, por lo tanto, causan defectos en las matrices tridimensionales de colágeno. Estos defectos afectan la integridad estructural y mecánica de la dermis y, por lo tanto, alteran de forma perjudicial su función. La acumulación de colágeno fragmentado se encuentra en el corazón de los cambios relacionados con la edad en la apariencia de la piel humana [1].

Señalización molecular desregulada

5 Los fibroblastos colapsados y la MEC degradada aumentan de manera desproporcionada la concentración de las metaloproteasas de matriz en los inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMP) en el sitio de la arruga, lo que impide la regeneración del tejido [1, 10-20].

10 Las especies reactivas de oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés), un subproducto del envejecimiento inducido por el medio ambiente y el envejecimiento intrínseco, causan una cascada de reacciones bioquímicas dentro de la piel, que dan como resultado la producción de metaloproteinasas de matriz (MMP) y citocinas proinflamatorias. Las MMP, segregadas mediante fibroblastos y queratinocitos, disminuyen la formación de colágeno y mejoran la degradación del colágeno, contribuyendo a la degradación de la matriz dérmica [19].

Terapias actuales para las arrugas

15 Los tratamientos actuales en el mercado fallan, no recrean el aspecto juvenil con resultados duraderos. Su objetivo es tratar los síntomas de las arrugas sin abordar las causas fundamentales. Las toxinas relajan temporalmente los músculos de la cara que estiran la piel, pero no reparan la matriz extracelular subyacente. Botox® y Dysport® pueden dar como resultado una "cara congelada", con problemas para tragar, hablar y respirar. Los rellenos (tales como ácido hialurónico, colágeno, ácido poli-L-láctico e hidroxilapatita) "llenan los huecos" por un período breve, pero no devuelven a la piel la fisiología normal ni evitan el ciclo degenerativo.

20

Los avances tecnológicos en cosmética han sido limitados en los últimos 30 años, con avances esporádicos en la última década. Las terapias inyectables de primera y segunda generación tienen un tiempo de inicio rápido, pero una duración limitada del efecto.

25

Terapias de lisado de plaquetas

30 Existen varios problemas de larga duración que afectan la adaptación y el uso ampliamente generalizado del lisado de plaquetas (PL, de sus siglas en inglés) en la clínica. Los principales problemas han sido, pero no se limitan a, los siguientes: las muestras procedentes de donantes corren el riesgo de contaminación durante el procesamiento; la calidad de las plaquetas varía de un paciente a otro en términos de recuento y capacidad para segregar factores de crecimiento beneficiosos que hacen que las preparaciones sean inconsistentes; hay una necesidad de cuantificación de plaquetas en los kits de consultorios médicos; la preparación terapéutica introduce una alta variabilidad paciente por paciente que afecta la eficacia debido a las diferencias intrínsecas en el recuento de plaquetas; los métodos actuales son inconvenientes, los médicos deben centrifugar la sangre para aislar las plaquetas de la sangre, y la variabilidad de este proceso, que puede durar entre 25 y 30 minutos, introduce de nuevo errores; y los procesos actuales no son rentables con un coste estimado de 130 \$ por tratamiento (Plateltex). La invención es una solución no obvia para estos problemas persistentes y de larga duración.

35

40 El documento WO 2010/064267 desvela lisado de plaquetas y composiciones bioadhesivas del mismo para el tratamiento de la mucositis. El documento US 5 457 093 desvela formulaciones de gel que contienen factores de crecimiento. Ranzato et al., British Journal of Dermatology, 2008, 159: 537-545 desvela que el lisado de plaquetas estimula la reparación de heridas de los queratinocitos HaCaT. El documento EP 2 574 350 desvela usos médicos de membranas poliméricas liofilizadas que contienen derivados de la sangre. El documento WO 2013/005053 desvela células progenitoras de linaje mesodérmico y su uso en terapia. El documento US 2010/278783 desvela el método de preparación de células autólogas y el método de uso para terapia.

45

Descripción de las figuras

50 La Figura 1 muestra un diagrama de flujo del protocolo utilizado para producir una composición farmacéutica de la invención.

Las Figuras 2 y 3 muestran que la invención proporciona un producto rentable y diferenciado que es conveniente, consistente y compatible con cGMP

55 Las Figuras 4 a 7 muestran que resuelve la necesidad persistente y de larga duración de proporcionar un producto de cuidado de heridas consistente, de calidad controlada, conveniente de utilizar y rentable.

Sumario de la invención

60 La invención proporciona un método para producir una composición farmacéutica que comprende un lisado de plaquetas como se define a continuación. La composición farmacéutica producida utilizando el método puede aplicarse terapéuticamente a heridas, tales como heridas ulceradas, fisuras anales, atrofia vaginal o arrugas.

65 El método comprende una forma más eficaz de lisar plaquetas, ya que liberan sus factores de crecimiento en solución como un lisado de plaquetas. El método también comprende formular el lisado de plaquetas en una composición farmacéutica de la invención.

La composición de la invención se puede liofilizar para producir un polvo estabilizado y liofilizado que contiene estos factores de crecimiento y que se puede utilizar para la aplicación terapéutica en la curación de heridas, pero también para otras aplicaciones terapéuticas en las que existe una mayor necesidad de suministro de factores de crecimiento naturales.

5 En particular, la invención proporciona un método para producir una composición farmacéutica que comprende lisado de plaquetas que comprende (a) someter a una población de plaquetas a al menos un ciclo de congelación-descongelación, en donde la parte de congelación de cada ciclo se lleva a cabo a una temperatura menor que o igual a aproximadamente $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$, y (b) mezclar el lisado de plaquetas con al menos un polímero farmacéuticamente aceptable y al menos una especie química con carga positiva farmacéuticamente aceptable de manera que la
10 composición resultante sea un gel acuoso con una viscosidad en el intervalo de 1000 a 500.000 mPa \cdot s (cps) a temperatura ambiente.

15 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el lisado de plaquetas producido utilizando el método de la invención y una composición farmacéutica de la invención para su uso en un método para tratar una herida, una fisura anal, atrofia vaginal o una arruga en un paciente que lo necesite.

20 En el presente documento también se describe una composición farmacéutica que comprende (a) un lisado de plaquetas terapéutico, (b) al menos un polímero farmacéuticamente aceptable y (c) al menos una especie química con carga positiva farmacéuticamente aceptable seleccionada del grupo que consiste en lisina, arginina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, metionina, prolina, serina, asparagina, cisteína, ácidos poliamino, protamina, aminoguanidina, iones de zinc e iones de magnesio, en donde la composición es un gel acuoso que tiene una viscosidad en el intervalo de 1000 a 500.000 mPa \cdot s (cps) a temperatura ambiente.

25 Descripción detallada de la invención

Detalles de la invención

30 Se aplicará la composición farmacéutica de la invención y todos los componentes se someterán a pruebas rigurosas para asegurar que el producto sea seguro y eficaz para el paciente. Estos procesos incluyen el cribado de plaquetas y métodos para permitir la producción de gel de plaquetas estéril. La invención implementa procesos que son seguros, eficaces y estériles. En una realización preferida, el lisado de plaquetas estéril se mezcla con un gel de metilcelulosa estéril para crear una composición de plaquetas terapéutica de la invención. Un diagrama de flujo del protocolo de la invención se puede encontrar en la Fig. 10.

35 *Eficacia de la composición farmacéutica de la invención para arrugas*

40 La invención proporciona una terapia regenerativa que aborda directamente cada uno de los problemas asociados con las arrugas y mejora la piel y el armazón subyacente. El tratamiento con una composición farmacéutica de la invención revierte el ciclo degenerativo de la piel dañada a la fisiología saludable que se encuentra en la piel normal. La composición farmacéutica de la invención funciona mediante el reequilibrio de las células dentro de los tejidos conectivos, el equilibrio de la señalización molecular y la restauración de la matriz extracelular. La curación natural y el proceso de regeneración tisular llevan a un aumento de la síntesis de colágeno, la regeneración de la matriz extracelular de colágeno y la proliferación de los fibroblastos dentro de la matriz.

45 *Células reequilibradas dentro de los tejidos conectivos*

50 Dado que la composición farmacéutica de la invención procede de plaquetas, normalmente comprende diversos factores de crecimiento que proceden de plaquetas y promueven el crecimiento celular. La composición farmacéutica de la invención comprende normalmente uno o más de, preferentemente todos, los siguientes factores de crecimiento: PDGF, VEGF, FGF, EGF, TGF, especialmente TGF- β y CTGF. La composición comprende preferentemente 2, 3, 4, 5 o 6 de estos factores de crecimiento.

55 El factor de crecimiento procedente de las plaquetas (PDGF, de sus siglas en inglés) promueve el crecimiento y la generación celular, la reparación de los vasos sanguíneos y la producción de colágeno. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, de sus siglas en inglés) promueve el crecimiento y la generación de células endoteliales vasculares. El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, de sus siglas en inglés) promueve la reparación de tejidos, el crecimiento celular, la producción de colágeno y la producción de ácido hialurónico. El factor de crecimiento epitelial (EGF, de sus siglas en inglés) promueve el crecimiento de las células epiteliales, la angiogénesis y la
60 curación de heridas. El factor de crecimiento transformante (TGF, de sus siglas en inglés), especialmente el TGF- β , promueve el crecimiento y la neogénesis de las células epiteliales y la curación de heridas. El factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF, de sus siglas en inglés) promueve la reparación de heridas.

65 La composición farmacéutica de la invención, por lo tanto, promueve la formación de nuevos fibroblastos. Estos nuevos fibroblastos comienzan siendo elásticos y saludables, produciendo nuevo colágeno y menos metaloproteasas. La restauración de los fibroblastos (la célula principal para sintetizar, mantener y proporcionar el

marco estructural) da como resultado una piel más sana y restaurada [1].

También se ha demostrado que el PDGF aumenta la motilidad de los fibroblastos, lo que permite que los fibroblastos se reubiquen en el sitio de administración.

5 *Matriz extracelular (MEC) restaurada*

10 Los factores de crecimiento naturales encontrados en los gránulos alfa de las plaquetas (tales como PDGF, VEGF, FGF, EGF y TGF) promueven la producción de colágeno y ácido hialurónico, la reparación de tejidos, el crecimiento y la regeneración de células endoteliales y células epiteliales, y la formación de nuevos vasos sanguíneos (que restaura el oxígeno y elimina las moléculas no deseadas). Todos estos factores ayudan a regenerar la MEC arrugada y dañada a su estado saludable. Cada uno de estos factores de crecimiento desempeña un papel dentro de la regeneración y restauración de la piel, tanto de forma individual como aditiva en colaboración entre sí. Los tratamientos que estimulan la producción de colágeno nuevo y no fragmentado proporcionarán una mejora sustancial en el aspecto y la salud de la piel envejecida [1].

15 *Señalización molecular equilibrada*

20 La aplicación de lisado de plaquetas en la arruga proporciona una dosis concentrada de proteína TIMP para tratar el desequilibrio de la metaloproteasa, evitar la degradación adicional de la MEC y aumentar la velocidad de regeneración de la piel. La aplicación directa de lisado de plaquetas a la piel proporciona una dosis concentrada de proteína TIMP para tratar el desequilibrio de la metaloproteasa, lo que apoya la proliferación y remodelación del tejido de colágeno. Las plaquetas contienen, por ejemplo, TIMP-2, que inhibe la mayoría de las MMP, pero preferentemente inhibe la MMP-2 y la MMP-9 [20]. La composición farmacéutica de la invención normalmente comprende el inhibidor 2 de metaloproteasa TIMP (TIMP-2).

25 *Ventajas de la invención*

30 La composición farmacéutica de la invención se adaptará fácilmente para los mercados de curación de heridas crónicas y transmite las siguientes ventajas sobre el plasma rico en plaquetas y otras terapias de células regenerativas autólogas.

1. Producción

35 Plataforma interna de producción de plaquetas in vitro compatible con cGMP escalada para suministrar altos rendimientos de plaquetas seguras, puras y activas.

2. Formulación

40 Las plaquetas se lisan para liberar importantes factores de crecimiento. El lisado se concentra a una dosis terapéutica eficaz estándar y se liofiliza para el almacenamiento a largo plazo a temperatura refrigerada. Las pruebas QC en el ensayo de piel artificial aseguran una alta concentración consistente de factores de crecimiento en cada lote y no se observa variabilidad entre pacientes con plasma rico en plaquetas autólogo.

45 3. Administración

50 Procesos eficaces en una etapa de (a) administrar una composición farmacéutica de la invención (b) rehidratar una composición farmacéutica de la invención simplifica el proceso actual para los médicos en la clínica y estandariza la dosificación del paciente.

El procesamiento de la terapia actual con plasma rico en plaquetas incluye giro de sangre y aislamiento de plasma no caracterizado, no concentrado, que varía según el paciente en función de la concentración del factor de crecimiento. A diferencia de otros estimuladores dérmicos (por ejemplo, ácido poli-L-láctico), la terapia de plaquetas produce su efecto rápidamente. Es reproducible y fácil de utilizar.

55 Las ventajas adicionales se muestran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Ventajas de la composición terapéutica de la invención (etiquetada 4ª generación) frente a productos de generaciones anteriores

La tabla muestra las principales ventajas del gel de plasma rico en plaquetas de cuarta generación de CTL

Generación	Producto	Ejemplo	Precio	Conveniencia clínica	Riesgo de contaminación	Impurezas no deseadas	Potencia	Estabilidad a largo plazo	N.º de factores de crecimiento	Uso con el paciente enfermo ²
1ª	Factor de crecimiento fabricado	Regranex	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✗	✓
2ª	Gel de plaquetas autólogo (él mismo)	Autogel	✗	✗	✗	✗	✗ ¹	✗	✗ ¹	✗
3ª	Gel de plaquetas alogénico (Donantes)	Ensayos académicos	✗	✓	✓	✗	✓	✗	✓	✓
4ª	Gel de plaquetas alogénico (Donante) con metilcelulosa	CTL	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

¹ Variable por paciente

² Fisiología anormal de la sangre o plaquetas

5 Las terapias de plaquetas son una solución natural y sostenida, mientras que los productos conocidos son antinaturales y temporales, la composición farmacéutica de la invención proporciona una mejor solución para los pacientes, con menos visitas y ahorro de costes. A diferencia de los productos conocidos, la composición farmacéutica de la invención estandariza la concentración de plaquetas y los factores de crecimiento, lo que lleva a resultados consistentes.

10 Adicionalmente, la composición terapéutica resuelve los obstáculos para proporcionar un producto de regeneración dérmica consistente, de calidad controlada, conveniente de utilizar y rentable.

PRODUCCIÓN: La composición de la invención es un producto estandarizado y compatible con cGMP que asegurará un resultado de regeneración dérmica consistente.

15 UTILIDAD: La composición de la invención es una formulación de lisado de plaquetas de aplicación de un solo paso y ahorrará un tiempo significativo para el médico.

COSTE: La composición de la invención proporcionará la regeneración dérmica a un precio rentable en comparación con otras terapias con plasma rico en plaquetas.

20 Otra solución no obvia del problema a resolver es que no existen otros geles comerciales de lisado de plaquetas/metilcelulosa en el mercado y que no existen otros geles de lisado de plaquetas/metilcelulosa en la bibliografía.

Úlceras diabéticas

25 Los pacientes diabéticos a menudo sufren de una enfermedad arterial periférica que restringe el flujo sanguíneo, lo que restringe el acceso de las moléculas de señalización y los nutrientes al sitio de la herida. La alta concentración de citocinas aumenta la concentración de metaloproteasas a los inhibidores en el sitio de la herida, lo que impide la regeneración normal del tejido. La pobre activación de los factores inmunomoduladores combinados con niveles bajos de óxido nítrico bactericida aumenta la probabilidad y la gravedad de las infecciones [21]. Si bien el proceso exacto de la curación de heridas aún no se comprende completamente, se sabe que las plaquetas secretan un subconjunto de factores importantes para el proceso. Los factores importantes para la curación de heridas son secretados de manera natural por plaquetas, macrófagos y fibroblastos. PDGF, EGF y TGF se consideran factores importantes en el proceso de curación de heridas. Otros factores juegan un papel importante y son secretados por los macrófagos y los fibroblastos reclutados en el sitio de la herida por las plaquetas. La piel es, presumiblemente, el órgano más sujeto a lesiones. La reparación de la piel es un proceso complejo que se puede dividir en 4 fases, generalmente descritas como inflamación, formación de tejido de granulación, y epitelización y remodelación de la matriz del tejido conectivo. Cada una de estas fases es compleja en sí misma, y está claro que para una buena curación de las heridas, los procesos deben ocurrir sucesivamente y en coordinación. La buena curación de la herida se puede definir como la restauración de la piel, incluidas las partes dérmica y epidérmica, de tal manera que el tejido cicatricial resultante se asemeje, en términos más generales, a la piel sin cicatrizar estructural, histológica,

funcional y estéticamente, por lo que dicho tejido cicatricial es diferente de una cicatriz hipertrófica o queloide.

Para fines de claridad, a continuación se proporciona una descripción simplificada de la composición de la piel humana. La parte superior está compuesta por la epidermis, que contiene principalmente células epiteliales, algunas.
 5 Cinco capas diferentes se encuentran en la epidermis. La base de la epidermis, es decir, en el estrato basal, se une a la dermis a través de la membrana basal. La dermis está compuesta de tejido conectivo, incluidos los fibroblastos y otras células del tejido conectivo, y sustancias de la matriz del tejido conectivo. Los vasos sanguíneos, nervios, órganos sensoriales, glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas y folículos pilosos están presentes en la dermis.
 10 Los experimentos clínicos han demostrado que la aplicación de preparaciones de lisado de plaquetas induce la curación de heridas en heridas crónicas como úlceras y quemaduras.

Las úlceras diabéticas son el resultado de una neuropatía y una disminución de la circulación en las extremidades inferiores del paciente diabético. Estas heridas difíciles de curar forman una gran cantidad de exudado que actualmente se maneja mediante la absorción de la mayoría en apósitos específicos para heridas. El exudado
 15 contiene una gran variedad de proteínas y células. Una de estas proteínas es la trombina (hipótesis actual, debe confirmarse), un componente de la cascada de coagulación que activa las plaquetas. Las plaquetas son células pequeñas en la sangre que forman coágulos de sangre al activarse y liberan su contenido en factores de crecimiento. Se activan por daños en los tejidos y el coágulo de sangre evita un sangrado adicional. Los factores de crecimiento promueven la regeneración y reparación del tejido dañado. La capacidad de curación de heridas de las
 20 plaquetas ha tratado de ser captada por muchos investigadores en una amplia variedad de formulaciones, como plasma rico en plaquetas, lisado de plaquetas, gel de plaquetas y plaquetas. Estos productos se preparan mediante plaquetas activadas *in vitro* que luego se preparan en una formulación adecuada y se aplican a la herida.

Se ha descrito que la concentración terapéutica de plaquetas es de 1×10^9 plaquetas por ml, lo que se logra
 25 mediante el aislamiento y la concentración de las plaquetas a través de la centrifugación. La concentración ideal debe determinarse a través de evaluaciones clínicas, pero es probable que varíe desde la concentración en plasma rico en plaquetas, que es aproximadamente el doble que en la sangre periférica (es decir, 4×10^8 plaquetas/ml si el nivel de sangre del paciente es 2×10^8 plaquetas/ml), a 2×10^9 plaquetas/ml. El método de referencia ha sido almacenar plaquetas aisladas a temperatura ambiente mientras se agitan hasta que se procesan (se siguen las
 30 pautas estándar del Welsh Blood Service).

Lisado de plaquetas

Se ha demostrado que el lisado de plaquetas, PL, tiene una influencia positiva en la curación de heridas. Un lisado
 35 de plaquetas terapéutico es un lisado de plaquetas adecuado para la terapia. El lisado de plaquetas utilizado en la composición farmacéutica de la invención comprende normalmente uno o más de, preferentemente todos, PDGF, VEGF, FGF, EGF y TGF como se describe anteriormente. Normalmente, también comprende TIMP-2.

La lisis de las plaquetas se puede lograr por medios químicos (es decir, CaCl_2), medios osmóticos (uso de H_2O
 40 destilada), o por medio de procedimientos de congelación/descongelación. El lisado de plaquetas también puede proceder de sangre completa y se puede preparar como se describe en la Patente de EE.UU. N.º 5.198.357 [22].

Anteriormente, el PL se había preparado mediante ciclos de congelación-descongelación a temperaturas variables
 45 que variaban de -20 a -80 grados, rara vez se utilizaba más de 1 ciclo. Los datos han demostrado que la cantidad de plaquetas completas solo se ve afectada moderadamente por un ciclo de congelación-descongelación a $-80/+37$ grados. De hecho, en una comparación a -20 , -80 y congelación de nitrógeno líquido, solo el nitrógeno líquido fue capaz de lograr un 90 % de lisis, mientras que a -20 y -80 dio como resultado un 80 % y un 50 % de lisis, respectivamente. Sin embargo, es notable que el experimento anterior contenía 3 ciclos de congelación-
 50 descongelación y, por lo tanto, muestra que la preparación de PL en la bibliografía actual que utiliza -80 grados en una congelación-descongelación solo puede lograr aproximadamente un 20 % de lisis. El nitrógeno líquido también tiene la ventaja de permitir que se realicen 3 o más ciclos de congelación-descongelación en una hora, y por lo tanto es un método muy adecuado para el entorno clínico. Además, el nitrógeno líquido facilita la estandarización del proceso, ya que la forma líquida del gas siempre está a -196 °C, mientras que los congeladores pueden diferir en la temperatura con el tiempo, especialmente cuando hay varios usuarios que abren la puerta con frecuencia,
 55 naturalmente, la estandarización es de particular importancia cuando se prepara un producto para su uso en la clínica.

La invención proporciona un método para producir un lisado de plaquetas (PL) que comprende someter una
 60 población de plaquetas a al menos un ciclo de congelación-descongelación, en donde la parte de congelación de cada ciclo se lleva a cabo a una temperatura inferior o igual a -190 °C. El método puede implicar cualquier número de ciclos de congelación-descongelación, como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 o más. El método comprende preferentemente someter la población de plaquetas a 5 o menos ciclos de congelación-descongelación, tales como 4 o menos ciclos de congelación-descongelación, 3 o menos ciclos de congelación-descongelación o 2 o
 65 menos ciclos de congelación-descongelación. El método más preferentemente comprende someter la población de plaquetas a solo un ciclo de congelación-descongelación, solo dos ciclos de congelación-descongelación, solo tres ciclos de congelación-descongelación o solo cuatro ciclos de congelación-descongelación.

La temperatura de descongelación en cada ciclo puede ser cualquier temperatura que descongele la composición de plaquetas, como de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 50 °C, tal como de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 45 °C o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 40 °C. La temperatura de descongelación en cada ciclo es normalmente de aproximadamente 37 °C.

5 La temperatura de congelación en cada ciclo es preferentemente de aproximadamente -196 °C. Las temperaturas de congelación y descongelación en diferentes ciclos del mismo método son normalmente las mismas.

10 En una realización preferida, el nitrógeno líquido se utiliza como un medio criogénico en cada ciclo de congelación. La inmersión en nitrógeno líquido en la parte de congelación de cada ciclo generalmente da como resultado un 95 % o más de lisis de plaquetas, lo que da como resultado una mayor liberación del factor de crecimiento y una función mejorada en el crecimiento celular, la reparación y la regeneración medibles mediante, pero sin limitación, el análisis de fibroblastos y PGDF.

15 El lisado de plaquetas producido en el método de la invención resulta de una lisis de las plaquetas superior a aproximadamente el 80 %, tal como una lisis de las plaquetas mayor de aproximadamente el 85 % o superior a aproximadamente el 90 %. Por lo tanto, comprende más factores de crecimiento y una función mejorada en el crecimiento celular, la reparación y la regeneración medibles mediante, pero sin limitación, el análisis de fibroblastos y PGDF.

20 El lisado de plaquetas está presente en la composición farmacéutica de la invención a una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 1.000 µg por gramo de composición, tal como de aproximadamente 0,2 µg a aproximadamente 750 µg por gramo de composición, de aproximadamente 0,5 µg a aproximadamente 500 µg por gramo de composición, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 250 µg por gramo de composición, de aproximadamente 2 µg a aproximadamente 200 µg por gramo de composición o de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 100 µg por gramo de composición.

30 El lisado de plaquetas utilizado en la composición farmacéutica de la invención puede proceder de las plaquetas de cualquier mamífero. El mamífero es preferentemente un ser humano. Sin embargo, puede ser no humano. Los animales no humanos adecuados incluyen, pero sin limitación, primates, tales como titíes o monos, animales criados comercialmente, tales como caballos, vacas, ovejas, cabras, alpacas, guanacos, ciervos o cerdos, mascotas, tales como perros, gatos, ratones, ratas, cobayas, hurones, jerbos o hámsteres o animales salvajes como los tejones o ciervos.

35 *Polímero farmacéuticamente aceptable*

La composición farmacéutica de la invención comprende al menos un polímero farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender cualquier número de polímeros farmacéuticamente aceptables, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 10 o más.

40 Un polímero es farmacéuticamente aceptable si es adecuado para su uso en terapia. El polímero es preferentemente adecuado para administración tópica a una herida, tal como cualquiera de las heridas analizadas en el presente documento, una fisura anal, atrofia vaginal o una arruga.

45 Los polímeros farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica. Cualquiera de dichos polímeros se puede utilizar de acuerdo con la invención.

50 La concentración de polímero es preferentemente de aproximadamente el 15 % (p/p) a aproximadamente el 30 % (p/p), tal como de aproximadamente el 17 % (p/p) a aproximadamente el 25 % (p/p) o de aproximadamente el 20 % (p/p) a aproximadamente el 23 % (p/p).

55 El polímero es preferentemente un polímero de celulosa. Los polímeros de celulosa adecuados son conocidos en la técnica. El polímero de celulosa es carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o metilcelulosa. La concentración de polímero de celulosa es preferentemente de aproximadamente el 1,5 % (p/p) a aproximadamente el 4,0 % (p/p), tal como de aproximadamente el 2,0 % (p/p) a aproximadamente el 3,0 % (p/p). La polímero de celulosa tiene preferentemente un peso molecular de aproximadamente 450.000 a aproximadamente 4.000.000, tal como de aproximadamente 500.000 a aproximadamente 3.500.000, de aproximadamente 500.000 a aproximadamente 3.000.000 o de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 2.500.000 o de aproximadamente 1000.000 a aproximadamente 2.000.000.

60 El polímero es preferentemente un plurónico, opcionalmente Pluronic F-127.

Especies químicas con carga positiva farmacéuticamente aceptables

65 La composición farmacéutica de la invención comprende al menos una especie química con carga positiva farmacéuticamente aceptable seleccionada del grupo que consiste en lisina, arginina, histidina, ácido aspártico,

ácido glutámico, alanina, metionina, prolina, serina, asparagina, cisteína, ácidos poliamino, protamina, aminoguanidina, iones de zinc e iones de magnesio.

5 Una especie es farmacéuticamente aceptable si es adecuada para su uso en terapia. La especie es preferentemente adecuada para administración tópica a una herida, tal como cualquiera de las heridas analizadas en el presente documento, una fisura anal, atrofia vaginal o una arruga.

La composición puede comprender cualquier número de especies farmacéuticamente aceptables, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 especies.

10 La concentración de la especie cargada está preferentemente dentro del intervalo de aproximadamente el 0,1 % (p/p) a aproximadamente el 3,0 % (p/p), tal como de aproximadamente 0,2 % (p/p) a aproximadamente 2,5 % (p/p), de aproximadamente el 0,5 % (p/p) a aproximadamente el 2,0 % (p/p) o de aproximadamente el 1,0 % (p/p) a aproximadamente el 1,5 % (p/p).

15 *Viscosidad*

La composición farmacéutica de la invención es un gel acuoso. El polímero(s) dentro de la composición forma una red dentro de la cual se dispersan las moléculas de agua. La composición farmacéutica de la invención es preferentemente un hidrogel.

25 El gel acuoso tiene una viscosidad en el intervalo de aproximadamente 1000 a aproximadamente 500.000 micropascales por segundo (mPa • s) (también conocido como centipoises; cps) a temperatura ambiente. La viscosidad es una medida de la resistencia del gel a ser deformado por el esfuerzo cortante o el esfuerzo de tracción. La viscosidad se puede medir utilizando cualquier método conocido en la técnica. Los métodos adecuados incluyen, pero sin limitación, el uso de un viscosímetro o un reómetro.

30 La temperatura ambiente es normalmente de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 25 °C, tal como de aproximadamente 19 °C a aproximadamente 24 °C o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 23 °C o de aproximadamente 21 °C a aproximadamente 22 °C. La temperatura ambiente es preferentemente cualquiera de 18 °C, 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C y 25 °C. La viscosidad se mide más preferentemente a 25 °C.

35 El gel tiene preferentemente una viscosidad en el intervalo de aproximadamente 1000 a aproximadamente 500.000 mPa • s a temperatura ambiente, tal como de aproximadamente 1500 a aproximadamente 450.000 mPa • s a temperatura ambiente, de aproximadamente 2000 a aproximadamente 400.000 mPa • s a temperatura ambiente, de aproximadamente 2500 a aproximadamente 350.000 mPa • s a temperatura ambiente, de aproximadamente 5000 a aproximadamente 300.000 mPa • s a temperatura ambiente, de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 250.000 mPa • s a temperatura ambiente, de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 200.000 mPa • s a temperatura ambiente o de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 150.000 mPa • s a temperatura ambiente.

40 El gel más preferentemente tiene una viscosidad en el intervalo de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 150.000 mPa • s (cps) a 25 °C.

45 *Conservantes*

La composición farmacéutica de la invención puede comprender además uno o más conservantes. Los conservantes adecuados son conocidos en la técnica. Los conservantes adecuados incluyen, pero sin limitación, metilparabeno, propilparabeno y m-cresol.

50 *Factores de crecimiento adicionales*

Además de los factores de crecimiento procedentes del lisado de plaquetas, la composición farmacéutica de la invención puede comprender además uno o más factores de crecimiento adicionales o exógenos. Cualquier factor de crecimiento puede estar presente.

55 Se pueden añadir cantidades adicionales de uno o más, preferentemente todos, preferentemente todos, PDGF, VEGF, FGF, EGF, TGF, especialmente TGF-β, y CTGF a la composición farmacéutica de la invención.

60 La composición farmacéutica de la invención puede comprender además uno o más antibióticos, analgésicos o agentes de desbridamiento. La composición farmacéutica de la invención puede comprender además plata

Células

65 La composición farmacéutica de la invención puede comprender además uno o más células madre. Estas pueden ayudar con la naturaleza curativa de la herida de la composición. Las células madre pueden ser células madre mesenquimatosas (MSC, de sus siglas en inglés) o células madre hematopoyéticas.

La composición farmacéutica de la invención puede comprender además una o más células progenitoras, células mononucleares o células progenitoras endoteliales.

5 La composición farmacéutica de la invención puede comprender además una célula progenitora del linaje mesodérmico como se describe en la Solicitud Internacional N.º PCT/GB2012/051600. Estas células expresan niveles detectables de CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 y CD271 y no expresan niveles detectables de CD14, CD34 y CD45.

10 Cualquier célula presente en la composición es preferentemente autóloga. En otras palabras, las células proceden preferentemente del paciente al que se administrarán las células. Como alternativa, las células son preferentemente alogénicas. En otras palabras, las células proceden preferentemente de un paciente que es inmunológicamente compatible con el paciente al que se administrarán las células.

Definiciones

15 Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar la comprensión de determinados términos utilizados frecuentemente en el presente documento, y no deben considerarse como limitantes del alcance de la presente divulgación.

20 "Lisado de plaquetas" (también conocido como "plaquetas liberadas") se refiere a la combinación de factores de crecimiento naturales contenidos en las plaquetas que se han liberado a través de la lisis de esas plaquetas.

"Proteína", "péptido", y "polipéptido" se utilizan indistintamente para indicar un polímero de aminoácido o un conjunto de dos o más polímeros de aminoácidos que interactúan o se unen.

25 "Células madre" se refiere a cualquier célula que tenga la característica de no estar especializada y ser capaz de renovarse por períodos prolongados de tiempo a través de la división celular y ser inducible para convertirse en células con función especializada.

30 La "liofilización" (también conocida como secado por congelación, liofilización o criodesecación) es un proceso de deshidratación que se utiliza normalmente para conservar un material perecedero o hacer que el material sea más conveniente para el transporte. El secado por congelación funciona mediante la congelación del material y luego la reducción de la presión circundante para permitir que el agua congelada en el material se sublime directamente de la fase sólida a la fase gaseosa. Los métodos para liofilizar composiciones son conocidos en la técnica.

Liofilización

35 La liofilización es ventajosa porque la sustancia resultante es más fácil de almacenar, se puede guardar en un lugar pequeño, es más fácil de manejar, se puede aplicar en una formulación (por ejemplo, en un polvo seco, una pomada, una suspensión, una solución, un gel, una crema o una matriz sólida, sintética o natural, biocompatible), elegida de acuerdo con las circunstancias, se puede administrar a una dosis óptima, normalmente tiene una vida útil más larga y se puede seleccionar fácilmente para la preparación más activa. Una ventaja de los extractos celulares liofilizados es que el material está disponible fácilmente en el momento en que se necesita, en contraste con el extracto de geles.

45 La composición farmacéutica de la invención puede estar liofilizada o en forma liofilizada. Los métodos para producir una composición farmacéutica de la invención pueden comprender además la liofilización de la composición farmacéutica. Los métodos adecuados para liofilizar la composición farmacéutica son conocidos en la técnica.

50 Dichas composiciones liofilizadas se pueden aplicar como un polvo seco, en una pomada, en una suspensión, en una solución, en un gel, en una crema o en una matriz sólida, sintética o natural, biocompatible, elegida de acuerdo con las circunstancias y administrada en una dosis óptima.

Medicamentos, métodos y uso terapéutico

55 Una composición farmacéutica de la invención se puede utilizar en un método de terapia del cuerpo humano o animal. Por lo tanto, la invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una herida, una fisura anal, atrofia vaginal o una arruga en un paciente que lo necesite.

60 La invención se refiere a administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la invención. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que mejora uno o más síntomas de la herida, fisura anal, atrofia vaginal o arruga. Una cantidad terapéuticamente eficaz es preferentemente una cantidad que repara la herida, fisura anal, atrofia vaginal o arruga. Las cantidades adecuadas se discuten con más detalle a continuación.

65

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar a cualquier paciente adecuado. El paciente puede ser cualquier mamífero. El paciente es generalmente un paciente humano. El paciente puede ser un bebé, un joven o un adulto. El paciente es normalmente conocido por tener una herida, una fisura anal, atrofia vaginal o una arruga.

5 Las plaquetas utilizadas para preparar la composición farmacéutica de la invención son preferentemente autólogas. En otras palabras, las plaquetas proceden preferentemente del paciente al que se administrará la composición farmacéutica de la invención. Como alternativa, las plaquetas son preferentemente alogénicas. En otras palabras, las plaquetas proceden preferentemente de un paciente que es inmunológicamente compatible con el paciente al que se administrará la composición farmacéutica de la invención.

10 La composición farmacéutica de la invención utilizada en terapia puede comprender una o más células madre o células progenitoras del linaje mesodérmico como se discutió anteriormente. También puede comprender factores de crecimiento adicionales como se discutió anteriormente.

15 La invención se puede utilizar en combinación con otros medios, y sustancias para, tratar la herida, fisura anal, atrofia vaginal o arruga o para aliviar el dolor. En algunos casos, la composición farmacéutica de la invención se puede administrar de manera simultánea, secuencial o por separado con otras sustancias destinadas a reparar la herida, fisura anal, atrofia vaginal o arruga o para proporcionar alivio del dolor. La composición farmacéutica de la invención se puede utilizar en combinación con tratamientos existentes para heridas, fisuras anales, atrofia vaginal o arrugas y puede, por ejemplo, mezclarse simplemente con dichos tratamientos. Por lo tanto, la invención puede utilizarse para aumentar la eficacia de los tratamientos o cosméticos existentes.

Composiciones farmacéuticas y administración

25 La composición farmacéutica de la invención se puede formular con vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables utilizando métodos de rutina en la técnica farmacéutica. La naturaleza exacta de una formulación dependerá de varios factores, incluida la naturaleza de la composición o lisado y la vía de administración deseada. Los tipos adecuados de formulación se describen completamente en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª edición, Mack Publishing Company, Eastern Pennsylvania, EE.UU.

30 La composición farmacéutica de la invención es normalmente estéril.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar por cualquier vía. La composición farmacéutica de la invención se administra normalmente por vía tópica a la herida, fisura anal, atrofia vaginal o arruga.

35 La composición farmacéutica de la invención se puede preparar junto con un vehículo o diluyente fisiológicamente aceptable. Los vehículos o excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, o similares y combinaciones de los mismos. Las composiciones o lisados liofilizados se rehidratan normalmente antes del uso terapéutico.

40 Además, si se desea, la composición farmacéutica de la invención puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH y/o adyuvantes que mejoran la eficacia. Dichos agentes son conocidos en la técnica.

45 La composición farmacéutica de la invención se administra de una manera compatible con la formulación de dosificación y en dicha cantidad será terapéuticamente eficaz. La cantidad a administrar depende del sujeto a tratar, la capacidad del sistema inmunitario del sujeto y el grado de reparación deseado. Las cantidades precisas requeridas para ser administradas pueden depender del juicio del médico y pueden ser propias de cada sujeto.

50 Cualquier cantidad adecuada de la composición farmacéutica de la invención puede administrarse al sujeto. Por ejemplo, normalmente se administra una cantidad suficiente para cubrir la herida, fisura anal, atrofia vaginal o arruga. La cantidad real administrada dependerá, por lo tanto, del tamaño de la herida, fisura anal, atrofia vaginal o arruga. Por ejemplo, la cantidad de la composición farmacéutica de la invención que se administra puede variar de aproximadamente 0,1 g a 100 g, tal como de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 75 g, de aproximadamente 1 g a aproximadamente 50 g, de aproximadamente 2 g a aproximadamente 20 g o de aproximadamente 3 g a 10 g.

60 La composición farmacéutica de la invención, que puede estar en forma liofilizada, puede aplicarse terapéuticamente a la herida. El procesamiento de las plaquetas libera los factores de crecimiento en solución y el proceso de liofilización produciría un polvo farmacéutico liofilizado y estabilizado que consta de estos factores. Esta composición farmacéutica liofilizada podría combinarse con otras tecnologías para el tratamiento eficaz de pacientes con heridas clínicas con una estabilidad mucho mayor a largo plazo a diferentes temperaturas. Esto evitaría el proceso logístico de preparación y transferencia del tratamiento.

65 Una realización es una composición farmacéutica liofilizada, seca, de la invención. Cuando se combina con agua, justo antes del tratamiento, se formaría una consistencia similar al gel.

En otras realizaciones, una composición farmacéutica de la invención podría combinarse alternativamente con diferentes:

- métodos de formulación/suministro, tales como:
 - Loción, Loción agitada, Crema, Ungüento, Gel, Espuma, Parche transdérmico, Polvo, Sólido, Esponja, Cinta, Pasta, vendaje, gasa, jeringa, pulverizador
- tratamientos, tales como:
 - Células madre mesenquimatosas, células madre hematopoyéticas, células mononucleares, células progenitoras endoteliales, células progenitoras mesodérmicas, antibióticos, analgésicos, plata, agentes de desbridamiento, dispositivos médicos
- Métodos de envasado, tales como:
 - paquete, frasco, caja, lata estériles
- Métodos de almacenaje
 - Idealmente, polvo a temperatura ambiente; refrigerado o congelado, según sea necesario

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que contiene, como sustancia activa, un extracto como se definió anteriormente, que está preferentemente en forma liofilizada y que se puede utilizar para promover la curación de heridas superficiales, por ejemplo, de la piel, tal como la piel humana. Esta composición farmacéutica comprende preferentemente el extracto liofilizado en una formulación adecuada para aplicación sobre heridas superficiales. Dicha formulación se puede aplicar directamente a una herida superficial, ya sea como un polvo seco o en forma de un gel, una crema, una pomada, una suspensión, una solución o una matriz sólida biocompatible sintética o natural, cualquiera de los cuales se puede preparar de una manera convencional, si se desea con excipientes y aditivos convencionales farmacéuticamente aceptables. Normalmente, el extracto liofilizado se incorpora a dicha composición en una concentración que depende del tipo de herida superficial que se va a curar y las circunstancias, en las que se utilizará la composición. Por ejemplo, una composición farmacéutica liofilizada de esta invención se puede aplicar en una concentración, de modo que la cantidad de sustancia activa para curar heridas, por cm², sea equivalente a la cantidad de sustancia activa que se encuentra en la preparación.

Heridas

La herida a tratar de acuerdo con la invención es preferentemente una herida en la piel. La herida en la piel es preferentemente una úlcera.

Los ejemplos de tipos de heridas que se pueden tratar con la composición farmacéutica o el lisado de plaquetas de esta invención incluyen, pero sin limitación, quemaduras de la piel térmicas, químicas, eléctricas y provocadas por radiación; quemaduras cubiertas con autoinjertos de piel en malla, de grosor total y parcial, heridas mecánicas tales como incisiones, abrasiones y laceraciones; estos tipos de heridas incluyen también heridas quirúrgicas y de escisión en la piel; diversas ulceraciones de la piel, tales como úlceras decúbito, venosas y arteriales y úlceras causadas por enfermedades subyacentes como la diabetes y la vasculitis; heridas corneales; lesiones de la membrana timpánica; y lesiones debidas a afecciones patológicas como el penfigoide ampollar, la epidermolísis ampollosa y el lupus eritomatoso.

Esta invención se refiere además a la promoción de la curación de una herida superficial (por ejemplo, en la piel, por ejemplo, piel humana) mediante la aplicación de la composición farmacéutica de esta invención a la superficie de la herida.

Fisura anal

Una fisura anal es una rotura o desgarro en la piel del canal anal. Dicha fisura puede tratarse mediante la aplicación de una composición farmacéutica de la invención a la fisura.

Atrofia vaginal

La vaginitis atrófica (también conocida como atrofia vaginal o atrofia urogenital) es una inflamación de la vagina (y del tracto urinario externo) debido al adelgazamiento y la reducción de los tejidos, así como a la disminución de la lubricación. Normalmente es causada por una disminución en la secreción de la hormona estrógeno. La atrofia se puede tratar mediante la aplicación tópica de una composición farmacéutica de la invención.

Arruga

Las arrugas tratadas de acuerdo con la invención son normalmente arrugas de la piel. Una arruga puede tratarse mediante la aplicación de una composición farmacéutica de la invención a la arruga.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.

65

Ejemplo 1 - Lisado de plaquetas

Se recogió una muestra de sangre completa y se guardó para analizar el número de plaquetas, como una forma de controlar el proceso de lisis. Se centrifugó la sangre completa (120 xg, 15 minutos, sin interrupción, temperatura ambiente) para separar las plaquetas de las células sanguíneas restantes. Las plaquetas terminaron en el plasma amarillo, conocido como plasma rico en plaquetas (PRP), que descansa sobre una columna roja oscura de las células sanguíneas restantes.

Se guardó una pequeña muestra del PRP para analizar las plaquetas y se demostró que la concentración de plaquetas es mayor en comparación con la sangre total, ya que las plaquetas ahora se han concentrado en un volumen más pequeño. El volumen del plasma difiere entre los individuos, pero está relacionado con el género, por lo que el volumen será más pequeño en los hombres y la concentración de plaquetas en la sangre total en comparación con el PRP, por lo tanto, habrá aumentado más en los hombres.

El PRP se transfirió a otro recipiente, tal como un tubo de 50 ml, y luego se sumergió en nitrógeno líquido (-196 °C) hasta que se congeló o durante 5 minutos. El tubo se transfirió posteriormente a un baño de agua a 37 °C, u otra fuente de calor, tal como una incubadora, hasta que el PRP se descongeló. Esto se conoce como un ciclo de congelación/descongelación en nitrógeno líquido. Este ciclo se repitió tres (3) veces más para un total de cuatro (4) ciclos de congelación/descongelación. Después de estos ciclos, el producto resultante se denominó PL (lisado de plaquetas) C4 producido a través de 4 ciclos de congelación/descongelación, y tras su análisis contenía aproximadamente el 5 % del número inicial de plaquetas en el PRP. El PL C4 contenía grumos de gel de residuos de plaquetas que se pueden eliminar mediante la transferencia del PL C4 a un nuevo tubo (los grumos gruesos de gel caerán al fondo del tubo) o la centrifugación (3200xg, 20 minutos, con rotura) y utilizando el sobrenadante. El PL C4 también contenía residuos microscópicos que eran visibles bajo un microscopio.

Ejemplo 2 - Gel de lisado de plaquetas

El lisado de plaquetas preparado como en el Ejemplo 1 se transfirió a un tubo Falcon estéril graduado. Si se congela previamente, el lisado de plaquetas se descongela primero a temperatura ambiente. Al lisado de plaquetas, se añadieron gluconato de calcio y plasma o trombina en proporciones apropiadas. Si el plasma se congeló previamente, se descongela a 37 °C antes de utilizarlo. Las proporciones apropiadas que se utilizaron en el presente documento incluyen: por ejemplo, 1: 5 partes de lisado de plaquetas, 2 partes de plasma, 2 partes de gluconato de calcio; y por ejemplo, 2: 3 partes de lisado de plaquetas, 1 parte de trombina y 0,5 partes de gluconato de calcio. La suspensión resultante se expuso a agitación lenta cuidadosa para completar 10-12x 360 ° de revoluciones del tubo y luego se fraccionó por tamaño en dispositivos de dispensación estériles. Los dispositivos incluían jeringas y dispensadores de microagujas. En algunos casos, el fraccionamiento por tamaño se determinó de acuerdo con el tamaño y la forma de la úlcera a tratar.

Ejemplo 3 - Utilidad del gel de lisado de plaquetas

Para el tratamiento de la atrofia vaginal: se aplicaron por vía intravaginal de 2 a 10 ml de gel de lisado de plasma con una viscosidad de ~ 1000 cps diariamente o cada dos días durante 1-2 semanas. Esto se repitió durante una semana si los síntomas se repetían.

Para el tratamiento de una úlcera de pie diabético de 5 mm de diámetro: se aplicaron por vía tópica en la úlcera de 2 a 3 ml de gel de lisado de plasma con una viscosidad de 70.000-100.000 cps diariamente o cada dos días durante 2-3 semanas.

REFERENCIAS

1. Fisher, G.J., J. Varani, y J.J. Voorhees, Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. Archives of dermatology, 2008. 144(5): pág. 666.
2. JAMA 293:217-228, 2005;
3. Diabetes Care 22:157-162, 1999.
4. J Invest Dermatol. Mayo de 2007;127(5):1018-29.
5. Clinical Diabetes Spring 2009 vol. 27 n.º 2 52-58.
6. Adv Skin Wound Care. Diciembre de 2008;21(12):568-75.
7. UK NIHR Health Technology Assessment: Randomised controlled trial of three dressing preparations (2009).
8. Schott, M. Cosmetics >> Skin Basics. [citado el 06 de septiembre de 2011]; Disponible de: <http://www.moritexc cosmetics.com/in-dex.php/skin-basics/>.
9. Systems, R.D. Minireviews - Matrix Metalloproteinases (MMPs). 1999 [citado el 06 de septiembre de 2011].
10. Bornstein, P., The biosynthesis of collagen. Annual Review of Biochemistry, 1974. 43(1): pág. 567-603.
11. Siegel, R., Lysyl oxidase. International review of connective tissue research, 1979. 8: pág. 73
12. DeGroot, J., et al., Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis. Arthritis & Rheumatism, 2004. 50(4): pág. 1207-1215.
13. Page-McCaw, A., A. J. Ewald y Z. Werb, Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling.

Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007. 8(3): pág. 221-233.

14. Lapière, C.M., Tadpole collagenase, the single parent of such a large family. Biochimie, 2005. 87(3-4): pág. 243-247.

5 15. Fisher, G.J., et al., Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. Nature, 1996. 379(6563): pág. 335-339.

16. Monnier, V.M., et al., Cross Linking of the Extracellular Matrix by the Maillard Reaction in Aging and Diabetes: An Update on "a Puzzle Nearing Resolution". Annals of the New York Academy of Sciences, 2005. 1043(1): pág. 533-544.

10 17. Rittié, L., et al., Decreased contraction of glycated collagen lattices coincides with impaired matrix metalloproteinase production. Biochemical and biophysical research communications, 1999. 264(2): pág. 488-492.

18. Vater, C., E. Harris Jr y R. Siegel, Native cross-links in collagen fibrils induce resistance to human synovial collagenase. Biochemical Journal, 1979. 181(3): pág. 639.

15 19. Fisher, G.J., et al., Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. New England Journal of Medicine, 1997. 337(20): pág. 1419-1429.

20 20. Telgenhoff, D. y B. Shroot, Cellular senescence mechanisms in chronic wound healing. Cell Death Differ, 2005. 12(7): pág. 695-8.

21. J Invest Dermatol. Mayo de 2007;127(5):1018-29.

22. Patente de EE.UU. n.º 5.198.357: Preparation of a blood platelet lysate for use in a cell culture medium for hybridoma cells.

23. Vox Sang. Agosto de 2009;97(2):110-8. Epub 9 de mayo de 2009.

24. Biologicals, Volumen 39, Cuestión 2, marzo de 2011, Páginas 73-80.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir una composición farmacéutica que comprende lisado de plaquetas que comprende (a) someter una población de plaquetas a al menos un ciclo de congelación-descongelación, en donde la parte de congelación de cada ciclo se lleva a cabo a una temperatura menor que o igual a aproximadamente $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$, y (b) mezclar el lisado de plaquetas con al menos un polímero farmacéuticamente aceptable y al menos una especie química con carga positiva farmacéuticamente aceptable de manera que la composición resultante sea un gel acuoso con una viscosidad en el intervalo de 1000 a 500.000 mPa \cdot s (cps) a temperatura ambiente.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método comprende someter la población de plaquetas a tres o cuatro ciclos de congelación-descongelación.
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el nitrógeno líquido se utiliza como un medio criogénico mediante el cual la inmersión en la parte de congelación de cada ciclo da como resultado un 95 % o más de lisis de plaquetas, lo que resulta en una mayor liberación de factores de crecimiento y una función mejorada en el crecimiento celular, una reparación y una regeneración medible mediante, pero sin limitarse a, ensayos de fibroblastos y PGDF.
- 20 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la concentración de lisado de plaquetas está dentro del intervalo de 0,1 μg a 1.000 μg por gramo de composición.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el polímero es (i) un polímero de celulosa o (ii) carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o metilcelulosa.
- 25 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la concentración de polímero de celulosa es del 1,5 % (p/p) al 4,0 % (p/p) y el polímero tiene un peso molecular de 450.000 a 4.000.000.
- 30 7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el polímero es un plurónico o Pluronic F-127.
8. Un método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 7, en donde la concentración de polímero es del 15 % (p/p) al 30 % (p/p).
- 35 9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la concentración de la especie cargada está dentro del intervalo de 0,1 % (p/p) a 3,0 % (p/p).
10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la viscosidad está en el intervalo de 50.000 a 150.000 mPa \cdot s (cps) a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 40 11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la etapa (b) comprende además mezclar el lisado de plaquetas con un conservante seleccionado del grupo que consiste en metilparabeno, propilparabeno y m-cresol.
- 45 12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el lisado de plaquetas es de seres humanos.
13. Una composición farmacéutica que comprende lisado de plaquetas producida utilizando un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 50 14. Una composición farmacéutica que comprende lisado de plaquetas de acuerdo con la reivindicación 13 para su uso en un método para tratar una herida, una fisura anal, atrofia vaginal o una arruga en un paciente que lo necesite.

Fig. 1

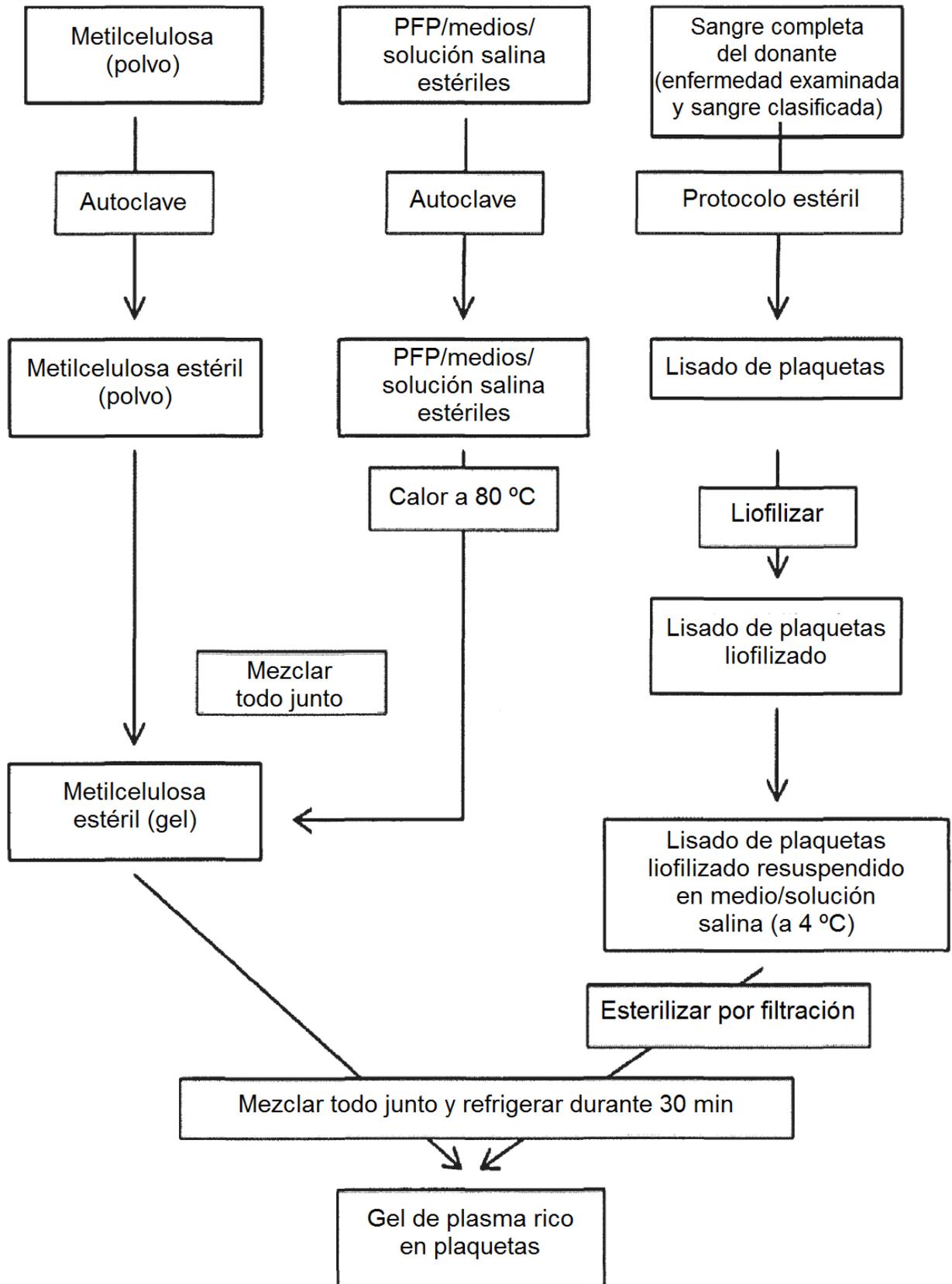


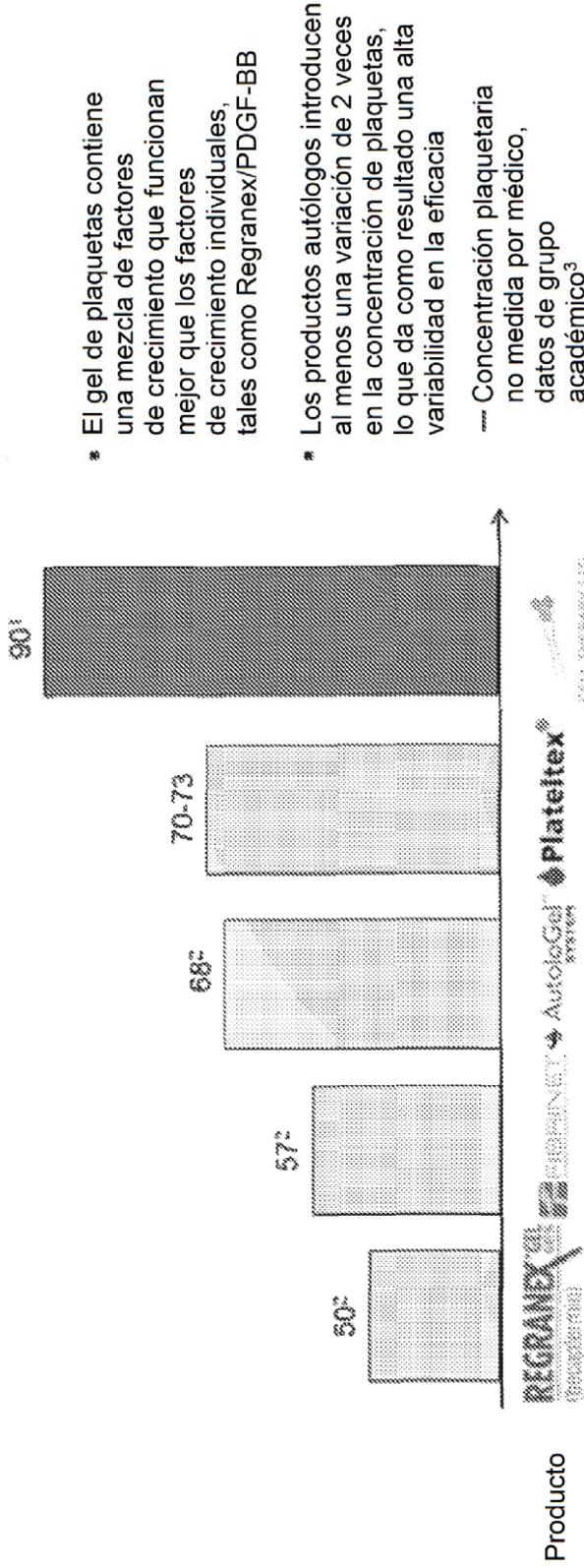
Fig. 2

PLATAFORMA DE REDUCCIÓN DE ARRUGAS CTL

	Tiempo de tratamiento (min)	Alergia	Coste por tratamiento	Tratamientos ²	Coste total
<p>1ª generación</p> <p>Moléculas: rellenos dérmicos y factores de crecimiento individuales</p>	15	Posible	~\$1.000	6	~\$6.000
<p>2ª generación</p> <p>Terapia celular autóloga: fibroblastos o plasma rico en plaquetas</p>	PRP: 50 IA/VV: 15'	No	~\$2.000	3	~\$6.000
<p>3ª generación</p> <p>Aislamiento de terapia celular: producto estandarizado con plaquetas y factores de crecimiento</p>	15	No	~\$1.000	1	~\$1.000

Fig. 3

EJEMPLO DE CURACIÓN DE HERIDAS % de resolución de la úlcera en 12 semanas



1 Basado en proyecciones de producción de plaquetas y concentración de plaquetas del producto final
 2 Ensayo Regranex Fase III. Ensayos académicos.
 3 Vox Sang. Agosto de 2009;97(2):110-8

Fig. 4

PLATAFORMA DE REDUCCIÓN DE ARRUGAS CTL

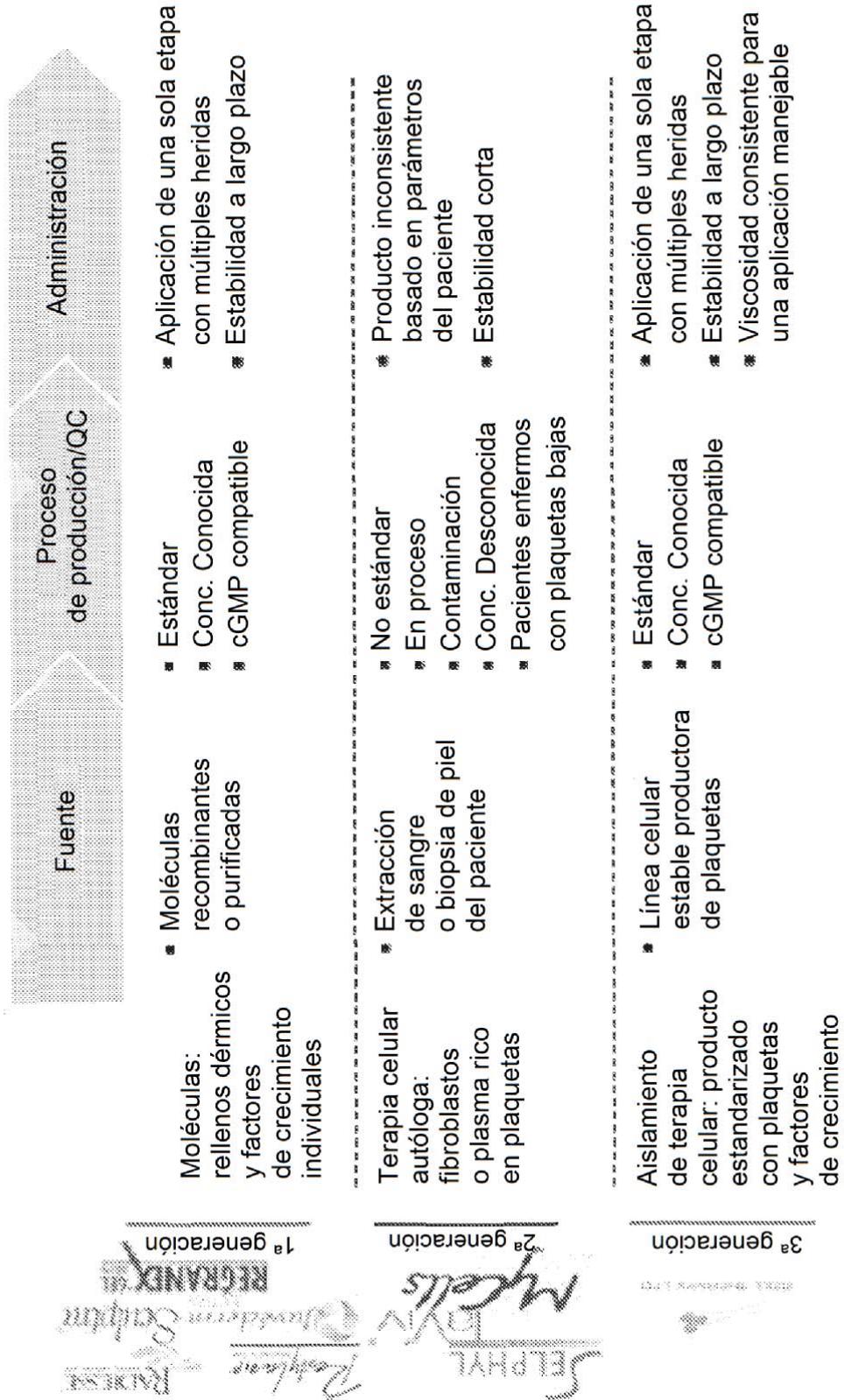


Fig. 5

CONTROLES DE CALIDAD DE TERAPIA DE PLAQUETAS

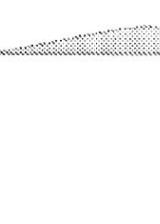
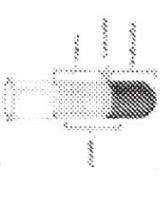
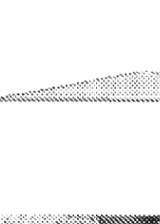
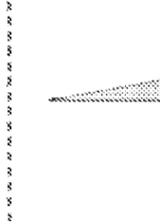
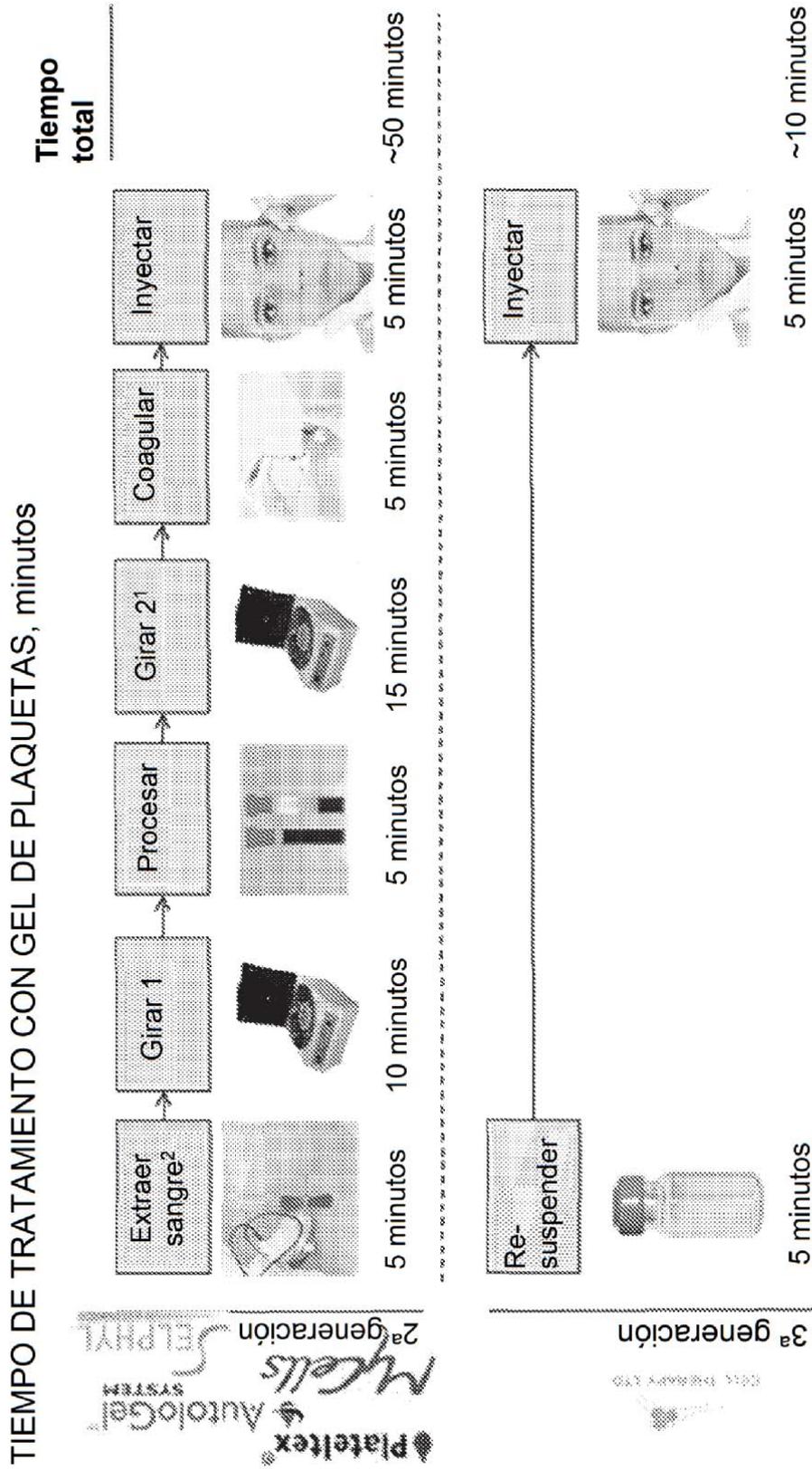
Fuente	Producción	Prueba de funcionalidad
<p>2ª generación</p>   <ul style="list-style-type: none"> * Fuente autóloga traducida a recuento variable de plaquetas y calidad dependiente del estado de salud del paciente 	 <ul style="list-style-type: none"> * La manipulación en proceso en varios pasos y la falta de cuantificación introdujo variabilidad, errores y posible contaminación 	 <ul style="list-style-type: none"> * No funcional del producto antes de la aplicación al paciente
<p>3ª generación</p>  <ul style="list-style-type: none"> * La fuente de calidad controlada de plaquetas in vitro garantiza plaquetas libres de contaminación de alta calidad 	 <ul style="list-style-type: none"> * La cuantificación precisa del componente del producto garantiza un producto estandarizado 	 <ul style="list-style-type: none"> * Ensayo automatizado de cicatrización de heridas ECIS (detección eléctrica de impedancia de sustrato celular) para confirmar la eficacia

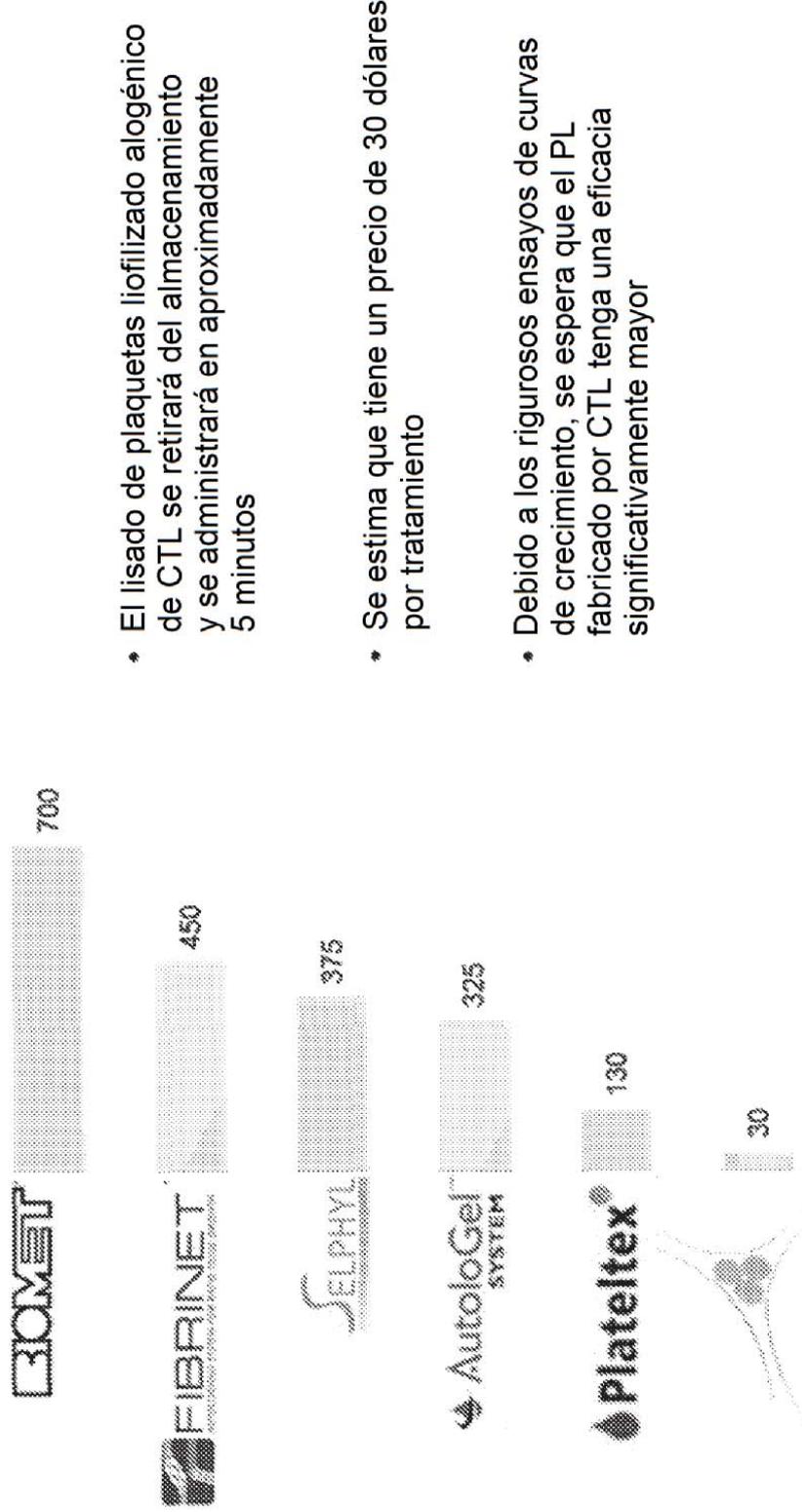
Fig. 6



1 Algunos productos PRP no requieren un segundo paso de centrifugación de 15 minutos
 2 LaViv tarda de 11 a 22 semanas para prepararse en el laboratorio a partir de una biopsia de punzón en la piel del paciente (información de prescripción de LaViv, julio de 2011)

Fig. 7

COSTE POR TRATAMIENTO, DÓLARES AMERICANOS



TERAPIA CELULAR LTD

1 El coste de por vida incluye los costes de manejo de la úlcera, infección severa, amputación: teniendo en cuenta los tiempos de curación y los resultados epidemiológicos

2 QALY = año de vida ajustado por calidad