

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 132**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/14** (2015.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2011 E 15165721 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 2929887**

54 Título: **Extracto de plaquetas inactivado viral, uso y preparación del mismo**

30 Prioridad:

**21.12.2010 IL 21016210**

**21.12.2010 US 201061425474 P**

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

**16.06.2020**

73 Titular/es:

**OMRIX BIOPHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)  
Bldg. 14 Weizmann Science Park P.O. Box 619  
Rehovot 76106, IL**

72 Inventor/es:

**WEISSMAN, LIOR;  
RAVER-SHAPIRA, NINA;  
NUR, ISRAEL y  
BELYAEV, OLEG**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 767 132 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**

Extracto de plaquetas inactivado viral, uso y preparación del mismo

**5 CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se refiere a extracto de plaquetas seguro de virus derivado de múltiples donantes y un kit.

**10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15 Las plaquetas son pequeñas células anucleadas de forma irregular que desempeñan una función fundamental en la hemostasia y curación. Las plaquetas contienen una matriz completa de proteínas pre-sintetizadas, entre las que están proteínas de señalización, proteínas citoesqueléticas, proteínas de la membrana y proteínas reguladoras. Participan en etapas clave de la regeneración de tejido y procesos de curación en el sitio de lesión, principalmente debido al contenido de gránulos de plaquetas que comprenden una multitud de moléculas bioactivas que incluyen factores de crecimiento (GF), citocinas y quimiocinas. Los GF de plaquetas tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante (TGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y otros son piezas clave en todas las siguientes fases de la cascada de cicatrización: fase inflamatoria, proliferativa y de remodelación.

20 Estudios han mostrado que los GF derivados de plaquetas estimulan la angiogénesis, mitogénesis, proliferación celular, neutrófilos y macrófagos, síntesis de colágeno, contracción de heridas, síntesis de matriz extracelular, epitelialización y quimiotaxia.

25 Las plaquetas se usan rutinariamente por la transfusión, por ejemplo, para mejorar la hemostasia. Recientemente, las plaquetas se están usando cada vez más en forma de plasma rico en plaquetas (PRP), también denominado gel de PRP, gel de plaquetas, coágulo de PRP, etc. Normalmente, el PRP es una preparación *ex vivo* que consiste en plaquetas autólogas concentradas en un volumen limitado de plasma (Lacci KM, Dardik A. Platelet-rich plasma: soporte for its use in wound healing. Yale J Biol Med. 2010 Mar;83(1):1-9).

30 Para administración tópica, el PRP se activa normalmente mediante la adición de trombina y/o CaCl<sub>2</sub> produciendo la formación de gel de fibrina por la interacción entre trombina (endógena o exógena) y fibrinógeno. Tras la activación, las plaquetas experimentan desgranulación activa y liberan diversos mediadores que incluyen GF (Lacci KM, Dardik A, 2010). El uso de PRP para inyección comprende actualmente un segmento pequeño pero rápidamente en crecimiento en el mercado. La exposición razonada para usar PRP en el aumento de tejido blando y duro es su potencial para potenciar la regeneración de tejido en lesiones que no se curan, aceleran la maduración, vascularización y epitelialización de las heridas, disminuir la formación de cicatrices y reducir las complicaciones posoperatorias y morbilidad (Lacci KM, Dardik A, 2010).

40 Estudios usando PRP activado junto con diversos tipos de células han mostrado que factores, por ejemplo, factores de crecimiento liberados de PRP pueden inducir proliferación celular [(por ejemplo, Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. J Oral Maxillofac Surg. 2005 Mar;63(3):362-9; Bertrand-Duchesne et al. Epidermal growth factor released from platelet-rich plasma promotes endothelial cell proliferation in vitro. J Periodontal Res. 2010 Feb;45(1):87-93; Kakudo et al. Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts. Plast Reconstr Surg. 2008 Nov;122(5):1352-60), modular la capacidad angiogénica de las células endoteliales humanas (Sulpice et al. Cross-talk between the VEGF-A and HGF signalling pathways in endothelial cells. Biol Cell. 2009 Sep;101(9):525-39; Rughetti et al. Platelet gel-released supernatant modulates the angiogenic capability of human endothelial cells. Blood Transfus. 2008 Jay;6(1):12-7) e inducir propiedades osteo-inductivas (Intini G. The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. Biomaterials. 2009 Oct;30(28):4956-66)]. Además, se encontró que PRP activado soportaba el crecimiento celular *in vitro* y mantenía la viabilidad de varias células diana que incluyen mielomas, hibridomas, hepatocitos, fibroblastos y células epiteliales, a un nivel comparable o superior al nivel soportado por el suero bovino fetal (Johansson et al. Platelet lysate: a replacement for fetal bovine serum in animal cell culture? Cytotechnology. 2003 Jul;42(2):67-74).

55 PRP y los factores de crecimiento liberados se usan actualmente en diversos procedimientos de regeneración de tejido quirúrgico, predominantemente en cirugía ortopédica y dental (Nurden et al. Platelets and wound healing. Front Biosci. 2008 May 1;13:3532-48). En cirugía ortopédica se usa PRP principalmente para artroplastia de la rodilla, fusión espinal lumbar y en degeneración de discos intervertebrales (revisado en Nurden et al, 2008). Las aplicaciones de PRP en odontología y cirugía maxilofacial incluyen principalmente consolidación de implantes de titanio, aumento del seno maxilar y remodelación ósea (revisado en Nurden et al, 2008). También se usa PRP cada vez más para la reparación de tendón y ligamento, cirugía plástica y reconstructiva facial, cicatrización crónica de la piel, oftalmología, regeneración de nervios faciales, además de en cirugía cardíaca y bariátrica (revisado en Nurden et al, 2008).

Sin embargo, una desventaja importante en el presente uso de PRP autólogo y factores liberados reside en la falta de normalización. Digno de mención, están comercialmente disponibles diferentes sistemas manuales, semi-automatizados y completamente automatizados para la preparación de PRP que se diferencian en parámetros tales como el tiempo de preparación, rendimiento de las plaquetas y eficiencia de recogida (Mazzucco et al. Not every PRP-gel is born equal. Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet, RegenPRP-Kit, Plateltex and one manual procedure. Vox Sang. 2009 Aug;97(2):110-8).

Otra variable importante es la técnica usada para la activación de plaquetas [trombina autóloga, heteróloga o recombinante, cloruro de calcio o batroxobina (Rozman P, Bolta Z. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat. 2007 Dec;16(4):156-65)], que puede afectar la eficiencia de la liberación de gránulos y la cantidad de GF secretados (Rozman P, Bolta Z, 2007). Además, como las plaquetas son muy sensibles al estrés mecánico y cambios en el entorno circundante, pueden activarse y los GF pueden liberarse durante el procesamiento, antes de la etapa de activación prevista (Mazzucco et al, 2009). Esta activación incontrolada puede aumentar adicionalmente la variabilidad en la composición del producto final si se usan diferentes sistemas de preparación de PRP. Adicionalmente, una debilidad inherente importante de la preparación de PRP autólogo es que el contenido de GF de plaquetas varía entre individuos y, por tanto, puede conducir a resultados inferiores a los óptimos. Finalmente, la carga financiera de la maquinaria dedicada, kits de procesamiento de PRP disponibles y la necesidad de personal cualificado deben tenerse en consideración cuando se trabaja con PRP autólogo.

Una publicación reciente (Su et al. "A virally inactivated functional growth factor preparation from human platelet concentrates". Vox Sang. 2009 Aug;97(2):119-128) desvela la preparación de un extracto de factor de crecimiento funcional coagulable derivado de donaciones de mezclas de plaquetas de aféresis. Sin embargo, la preparación coagulable desvelada tiene la desventaja de que incluye solo una etapa de inactivación viral, es decir, inactivación viral con solvente / detergente (S/D) que es particularmente eficaz contra virus envueltos, pero no contra virus no envueltos. La publicación indica la posibilidad de aplicar nanofiltración como segunda etapa de inactivación viral. Esta preparación también contiene impurezas de proteínas del plasma y de leucocitos. La etapa de eliminación de S/D por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) reduce en gran parte el PDGF en la preparación. Además, el potencial de coagulabilidad de la preparación puede limitar su uso a la aplicación local o prevenir su uso sistémico.

Burnouf et al. ("A novel virally inactivated human platelet lysate preparation rich in TGF-beta, EGF and IGF, and depleted of PDGF and VEGF". Biotechnol Appl Biochem. 2010 Aug 6;56(4):151-60) desvela un lisado de plaquetas tratado con S/D con un contenido normalizado de TGF-beta, EGF y IGF y agotado en PDGF y VEGF. La publicación desvela un método para la preparación de este lisado evitando la eliminación de S/D por cromatografía de interacción hidrófoba.

Existe la necesidad de una preparación de extracto de plaquetas segura de virus obtenida de múltiples donantes que comprenda una mezcla de proteínas que tienen actividad de factor de crecimiento y/o de factor trófico.

**SUMARIO DE LA INVENCION**

La invención proporciona un extracto de plaquetas activo seguro de virus derivado de múltiples donantes que comprende una mezcla de factores de crecimiento celular de plaquetas biológicamente activos y/o factores tróficos para su uso en terapia, el extracto de plaquetas comprendiendo PDGF-AB, b-FGF, VEGF y TGFb1, en donde la proporción para PDGF-AB:VEGF es por lo menos 74 y la proporción para PDGF-AB:TGFb1 es por lo menos 0,56, en donde el extracto se vuelve seguro para virus mediante dos pasos de inactivación viral ortogonal, y en donde los pasos de inactivación viral comprenden tratamiento de inactivación viral de solvente detergente (S/D) y pasteurización. La invención también proporciona un kit que comprende un recipiente que contiene un extracto de acuerdo con la invención.

Las plaquetas contienen una matriz completa de factores que participan en etapas clave de los procesos de regeneración y curación de tejido. Actualmente, se usan plaquetas activadas autólogas completas (derivadas del paciente) para facilitar la cicatrización. Sin embargo, hay múltiples desventajas del uso de plaquetas autólogas completas, entre otras, la falta de normalización; los factores necesarios para la curación pueden ser escasos en las propias plaquetas del paciente; el equipo especial necesario; el procedimiento requiere tiempo y requiere etapas adicionales que se llevan a cabo en el propio paciente; y el requisito de personal médicamente cualificado. Estos problemas pueden resolverse, por ejemplo, usando un extracto de plaquetas preparado a partir de múltiples donantes. Sin embargo, los productos derivados de sangre humana pueden llevar el riesgo de transmitir agentes infecciosos tales como virus. La reducción eficaz del riesgo de transmisión viral puede lograrse incluyendo al menos dos etapas de inactivación viral ortogonal. Además, etapas adicionales en la fabricación de un extracto de plaquetas pueden comprometer la recuperación y actividad de los factores contenidos en su interior.

La invención resuelve una necesidad que se sentía desde hace tiempo de un extracto de proteínas de las plaquetas seguro de virus (al menos inactivación doble viral) obtenido de múltiples donantes que comprende una mezcla de proteínas que tienen actividad de factor de crecimiento y/o de factor trófico.

El extracto de plaquetas seguro de virus comprende una mezcla de factores de crecimiento celular de plaquetas activos y/o factores tróficos.

5 Se divulga un método para preparar un extracto de plaquetas seguro de virus, comprendiendo el método al menos dos tratamientos de inactivación viral ortogonal, por ejemplo, tratamiento de inactivación viral con solvente / detergente (S/D) e inactivación térmica. Comprendiendo el método las siguientes etapas:

10 proporcionar una fracción enriquecida en plaquetas de múltiples donantes, por ejemplo, una fracción de plaquetas lavada y/o reducida en leucocitos de mezclas de aféresis de múltiples donantes;  
preparar un lisado de plaquetas;  
llevar a cabo un tratamiento de inactivación viral con solvente/detergente (S/D);  
eliminar el S/D por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando un método de la invención desvelado  
15 en el presente documento, en el que la HIC comprende las etapas de: cargar el lisado en HIC y recoger un material eluido bajo condiciones no isocráticas; y realizar un segundo tratamiento de inactivación viral ortogonal.

20 En una realización de la invención, preparar el lisado de plaquetas se lleva a cabo durante el tratamiento de inactivación viral con S/D.

En otra realización de la invención, durante el tratamiento de inactivación viral con S/D se lleva a cabo una subetapa de reducción de agregados, por ejemplo, por filtración.

25 En ciertas realizaciones de la invención, la HIC comprende las etapas de: cargar el lisado en HIC; lavar la HIC con una disolución isocrática; recoger el material sin unir; lavar la HIC con una disolución no isocrática; y recoger el material eluido.

30 Además, en otra realización de la invención, la disolución isocrática consiste en tampón de acetato-glicina y albúmina de suero humano; y en la que la disolución no isocrática comprende un solvente orgánico y/o una molécula que puede unirse a factores derivados de plaquetas.

35 Además, en otra realización de la invención, el lisado se pone en contacto con una molécula que puede unirse a factores derivados de plaquetas, por ejemplo, heparina, sulfato de dextrano y combinación de los mismos, antes de la eliminación de S/D.

Además, en otra realización de la invención, el extracto se liofiliza.

40 En una realización de la divulgación, el extracto comprende PDGF-AB, VEGF y TGF $\beta$ 1, en la que la relación de PDGF-AB: TGF- $\beta$ 1 es al menos 0,2; y/o la relación de PDGF-AB : VEGF es al menos 45.

En una realización de la invención, el extracto está enriquecido con PDGF-AB y/o bFGF.

En una realización de la invención, el extracto es no coagulable.

45 En una realización de la invención, el extracto tiene un bajo contenido de agregados.

En una realización de la invención, el extracto está en forma sólida.

50 En una realización de la invención, el extracto está provisto de un agente de administración hecho de material natural y/o sintético seleccionado del grupo que consiste en polímeros, hidrogeles, poli(alcohol vinílico), polietilenglicol, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, gelatina, alginato, matrices de colágeno, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(2-hidroxietilmetacrilato), agar, oxidar la celulosa generada, péptidos auto-ensamblados, ácido poli(glicólico), ácido poli(láctico), fibrina y combinaciones de los mismos.

55 En otro aspecto, la invención se refiere al uso del extracto en la curación de tejido; reconstrucción de órganos; regeneración de tejido y/o tratamiento de inflamación.

60 En otro aspecto, la invención se refiere a un extracto de la invención para su uso en un método de curación de tejido; reconstrucción de órganos y/o regeneración de tejido, en el que dicho uso comprende administrar a un sujeto en necesidad una cantidad terapéuticamente eficaz de un extracto según la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a un extracto de la invención para su uso en un método para el tratamiento de inflamación en un sujeto en necesidad, en el que el uso comprende administrar al sujeto en necesidad una cantidad terapéuticamente eficaz de un extracto según la invención.

65

En una realización de la invención, el extracto se administra con un agente de administración. La invención proporciona un método para eliminar solvente-detergente (S/D) de una mezcla líquida biológica o preparación líquida biológica por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), que comprende las etapas de:

5 proporcionar la mezcla líquida biológica o preparación; y  
cargar la mezcla o preparación a HIC, y recoger un material eluido bajo condiciones no isocráticas.

Se divulga un método para eliminar solvente-detergente (S/D) de una mezcla líquida biológica por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), que comprende las etapas de:

10 proporcionar la mezcla líquida biológica ; y  
cargar la mezcla a HIC, recoger el material sin unir y un material eluido bajo condiciones no isocráticas.

Se divulga un método para eliminar solvente-detergente (S/D) de una preparación líquida biológica por HIC, que comprende las etapas de:

15 proporcionar la preparación;  
cargar la preparación en HIC; y  
20 recoger un material eluido bajo condiciones no isocráticas.

La preparación biológica es una preparación derivada de plaquetas.

En una realización de la invención, el método comprende las etapas de: cargar la preparación en HIC; lavar la HIC con una disolución isocrática; recoger el material sin unir; lavar la HIC con una disolución no isocrática; y recoger el material eluido. En una realización de la invención, el método comprende una disolución isocrática que consiste en tampón de acetato-glicina y albúmina de suero humano; y una disolución no isocrática que comprende un solvente orgánico y/o una molécula que puede unirse a factores derivados de plaquetas.

En otro aspecto, la invención proporciona una preparación o mezcla segura de virus, obtenible según el método de la invención.

Además, en otro aspecto, la invención proporciona un kit que comprende un recipiente que contiene un extracto según la invención y un agente de administración.

En una realización, la agente de administración está hecho de material natural y/o sintético seleccionado del grupo que consiste en polímeros, hidrogeles, poli(alcohol vinílico), polietilenglicol, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, gelatina, alginato, matrices de colágeno, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(2-hidroxietilmetacrilato), agar, oxidar la celulosa generada, péptidos auto-ensamblados, ácido poli(glicólico), ácido poli(láctico), fibrina y combinaciones de los mismos.

## 40 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 muestra la caracterización del perfil de proteínas de SDS-PAGE de diferentes preparaciones de extractos de plaquetas. Marcadores de peso molecular [Bio-Rad 161-0374 (carril 1)]; albúmina de suero humano [Plasbumin 25 (carril 2)] 8 µg; plaquetas lavadas de sangre completa (carril 3) 11 µg; WAP (carril 4) 8 µg; WAP después de tratamiento con S/D (carril 5) 14 µg; WAP después de tratamiento con S/D y eliminación de S/D por purificación en resina de cromatografía SDR HyperD (carril 6) 10 µg.

La Fig. 2 muestra la proliferación de células 3T3 tratadas con "mezcla de WAP", "LYO I" o sin tratar (0). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Las células cultivadas en medio de inanición (marcado como "0") se usaron como control; \*\*\* -  $p < 0,001$  (análisis de la prueba de la t, comparando con "0").

La Fig. 3 muestra una imagen de microscopía óptica representativa (a 200x aumentos) de la morfología de células albinas 3T3-Swiss de (A) Células de control no tratadas (células cultivadas en medio de inanición); o (B) Células tratadas con LYO I.

La Fig. 4 muestra una imagen de microscopía óptica representativa (a 200x aumentos) de morfología HUVEC tras la adición de LYO I (B), 2 UI/ml de trombina (C); LYO I + 2 UI/ml de trombina (D); componente BAC (E); o LYO I + componente BAC (F). (A) Células de control no tratadas.

La Fig. 5 muestra el efecto proliferativo de LYO II (▲) o mezcla de WAP II (■) sobre células de fibroblastos albinos 3T3-Swiss. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

La Fig. 6 muestra la proliferación de HUVEC tras la inducción con LYO II, trombina (T, 1 UI/ml de concentración final en el pocillo) y 1 UI/ml de trombina + LYO II. El asterisco indica resultados significativamente diferentes en comparación con el tratamiento relacionado sin LYO II como se evalúa por el análisis de la prueba de la t (se representan los valores de p).

La Fig. 7 muestra estructuras tipo vaso adquiridas por HUVEC sembradas sobre pocillos recubiertos con extracto de la membrana basal (BME) (control positivo). La imagen fue tomada a 100x aumentos usando filtro de fluorescencia para 530 nm.

La Fig. 8 muestra estructuras tipo vaso adquiridas por HUVEC tras el tratamiento con LYO II (B). (A) Células de control. Las imágenes fueron tomadas a 200x aumentos usando filtro de fluorescencia para 530 nm.

La Fig. 9A-9F muestran el aspecto morfológico de HUVEC sembradas sobre células recubiertas con fibrinógeno (A-C) o fibrina (D-F) y tratadas con LYO II (B,E) o mezcla de WAP II (C,F) o sin tratar (A,D). Las imágenes fueron tomadas a 100x aumentos usando filtro de fluorescencia para 530 nm.

La Fig. 10 muestra el efecto proliferativo de LYO III o mezcla de WAP III sobre fibroblastos albinos 3T3-Swiss. Se usó MasterMix (MM) como control positivo. La normalización se hizo a la concentración de PDGF-AB como se evalúa por ELISA específico.

La Fig. 11 muestra el aspecto morfológico de HUVEC tratadas con trombina (B; 1 UI/ml de concentración final), fibrinógeno (C; 11,3 mg/ml de proteína total), LYO III (D), fibrina (trombina y fibrinógeno) (E) y fibrina y LYO III (F). A- Células de control sin tratamiento. Las imágenes fueron tomadas a 100x aumentos usando filtro de fluorescencia para 530 nm.

La Fig. 12 muestra el nivel de proliferación de células de fibroblastos albinos 3T3-Swiss tras diferentes tratamientos. Se usó MasterMix (MM;♦) como referencia. La normalización se hizo a la concentración de PDGF-AB como se evalúa por ELISA específico. Todas las pruebas se hicieron por triplicado.

La Fig. 13 muestra el aspecto morfológico de albinos 3T3-Swiss tras la inducción por LYO IV (B), mezcla de WAP IV (C) y MasterMix (MM; D). (A) Células sin tratar. Las imágenes fueron tomadas a 200x aumentos usando microscopio de contraste de fases.

Las Figs. 14A-O muestran imágenes de contraste de fases representativas (100x aumentos) del ensayo de herida por arañazo *in vitro* realizado con fibroblastos albinos 3T3-Swiss. Las células se sembraron en placa sobre diferentes superficies - pocillos sin recubrir (A,D,G,J,M), recubiertos con colágeno (B,E,H,K,N) o con fibrinógeno (C,F,I,L,O) y heridas con una punta de pipeta p200. Las heridas se capturaron en el momento de tiempo "0" (A,B,C) y 24 horas (D-O) después del tratamiento con LYO IV (G,H,I), mezcla de WAP IV (J,K,L) o PRP-R (M,N,O).

La Fig. 15 muestra una evaluación cuantitativa del cierre de la herida como porcentaje que queda 24 horas después del inicio del tratamiento en los diferentes grupos de tratamiento. Las células se sembraron en placa sobre diferentes superficies (pocillos sin recubrir, recubiertos con colágeno o fibrinógeno) y se trataron con LYO IV, mezcla de WAP IV o PRP-R después de arañar la monocapa con una punta de pipeta p200. El % de herida que quedaba se calculó como una relación de la distancia que queda después de 24 h hasta la distancia inicial en cada localización. Los resultados se presentan como media de 6 duplicados  $\pm$  D.E. Se realizó el análisis de la prueba de la t, se determinó la significación estadística como  $p < 0,05$ . \*en comparación con pocillos sin tratamiento (0) por cada superficie; # en comparación con el tratamiento relacionado sobre las superficies sin recubrir.

La Fig. 16 muestra el aspecto morfológico de HUVEC sembradas sobre pocillos recubiertos con BME y tratados con LYO IV (B) o mezcla de WAP IV (C). (A) HUVEC sin tratar sembradas sobre recubrimiento de BME. Las imágenes fueron tomadas a 60x aumentos usando filtro de fluorescencia para 530 nm.

La Fig. 17 muestra el efecto proliferativo de LYO V o mezcla de WAP V sobre fibroblastos albinos 3T3-Swiss. Se usó PDGF-AB humano recombinante como control.

La Fig. 18 muestra el efecto proliferativo de LYO VI o mezcla de WAP VI sobre fibroblastos albinos 3T3-Swiss. Se usó concentrado de mezclas de PRP como control.

La Fig. 19 muestra el efecto proliferativo de LYO VI y mezcla de WAP VII; o LYO VII y mezcla de WAP VII sobre fibroblastos albinos 3T3-Swiss.

## DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES DE LA INVENCION

Se encontró según la presente invención que las plaquetas de aféresis lavadas (WAP) reducidas en leucocitos contienen cantidades muy pequeñas de albúmina y, posiblemente, pequeñas cantidades de otras impurezas del plasma con respecto a plaquetas lavadas obtenidas de la donación de sangre completa. También se encontró que las WAP sometidas a tratamiento con S/D (lisis e inactivación viral), la eliminación de S/D, liofilización y reconstitución (por ejemplo, extracto de LYO I) fueron biológicamente activas y que pueden inducir la proliferación y/o cambios en la morfología, por ejemplo, formación de estructuras tipo vaso (asociada a la angiogénesis) o formación de estructuras fusiformes (un atributo de elevada motilidad) en líneas celulares, por ejemplo, células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) o células de fibroblastos 3T3. Se observó que la actividad del extracto podría aumentarse mediante la adición de trombina, componente biológicamente activo (BAC; un componente de fibrinógeno como en el sellante de fibrina EVICEL™, Omrix Biopharmaceuticals Ltd.) o trombina + BAC (fibrina).

Los productos derivados de la sangre humana pueden llevar el riesgo de transmitir agentes infecciosos tales como virus. Normalmente se toman varias medidas con el fin de minimizar el riesgo de la transmisión de patógenos virales y/o desconocidos que incluyen pruebas rutinarias de muestras donadas para la presencia de ciertos virus, y etapas de inactivación/eliminación viral durante el proceso de fabricación. La reducción eficaz del riesgo de transmisión viral puede lograrse incluyendo al menos dos etapas de inactivación viral ortogonal que no alteran las beneficiosas propiedades del producto. Los virus de envoltura lipídica tales como VIH, virus de la hepatitis B, hepatitis C y del Nilo Occidental se inactivan rápida y eficazmente por el tratamiento con S/D que destruye la membrana lipídica de los virus.

A continuación, el extracto se sometió a un segundo tratamiento de inactivación viral, por ejemplo, una etapa de tratamiento térmico (pasteurización) o nanofiltración. Se encontró según la invención que el extracto no pudo pasar fácilmente a través de un sistema de nanofiltración.

Sorprendentemente, se encontró según la invención que un etapa de inactivación viral por tratamiento térmico (pasteurización) es factible y da un extracto biológicamente activo (por ejemplo, LYO II) como se prueba por un ensayo de proliferación celular e inducción de cambios morfológicos (por ejemplo, inducción de la angiogénesis o inducción de formas fusiformes). Se encontró que la adición de trombina, fibrinógeno o fibrina pronunció la actividad del extracto (promoviendo la adición de fibrinógeno o fibrina la formación de estructuras tubulares y aumentando la trombina la proliferación).

En una realización de la invención, para el tratamiento térmico, el material tratado con S/D se somete a una etapa de estabilización. Puede añadirse sacarosa y glicina a la disolución para servir de estabilizadores durante la etapa de pasteurización. La disolución puede entonces pasteurizarse, por ejemplo, por tratamiento térmico a  $60 \pm 0,5$  °C durante 9-10,5 horas con mezcla constante. Entonces, la disolución puede diluirse, por ejemplo, con tampón de acetato-glicina y los estabilizadores pueden eliminarse de la disolución, por ejemplo, por diafiltración contra tampón de acetato-glicina. Si está presente material agregado, puede eliminarse por filtración a través de una o más filtraciones secuenciales, por ejemplo, usando filtros de 20, 5 y 1,2  $\mu\text{m}$ , seguido de filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ . Pueden llevarse a cabo esterilizaciones por filtración bajo condiciones asépticas usando un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ . La disolución puede liofilizarse en viales de autoclave y sellarse con tapones de caucho de autoclave bajo atmósfera de nitrógeno y en vacío parcial (0,6 bar).

Se encontró según la invención que el extracto de inactivación viral doble podría concentrarse (por ejemplo, como en LYO III), por ejemplo, cuatro veces o 32 veces en comparación con la concentración del material de partida. La concentración puede lograrse, por ejemplo, por diafiltración de la disolución y/o reconstitución del extracto liofilizado en un menor volumen en comparación con el volumen del extracto antes de la liofilización.

Si está presente material agregado, puede eliminarse por filtración secuencial como antes. Se encontró que el extracto concentrado (por ejemplo, LYO III) comprende cantidades muy bajas de proteínas del plasma. Se encontró que los extractos concentrados (por ejemplo, LYO VI y LYO VII) fueron no coagulables. Los extractos presentaron niveles marginales o ausencia completa de proteínas de la coagulación. El extracto concentrado está agotado en fibrinógeno fisiológicamente activo, ya que los niveles de fibrinógeno fisiológicamente activo son indetectables por un método sensible actualmente usado en la materia. Los extractos carecieron de actividad pro-coagulante como se evalúa por la prueba de medición del tiempo de tromboplastina parcial no activada (NAPTT). El NAPTT puede llevarse a cabo esencialmente como se describe en la Farmacopea Europea 7.0.; 2.6.22: Activated coagulation factors monograph (01/2008:20622); en la Farmacopea Europea de Estrasburgo (Francia), Consejo de Europa, 2009. La ausencia de factores de coagulación también se determinó por la prueba del tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT). Se mostró por esta prueba que el extracto de plaquetas según la invención es deficiente en uno o más de los factores de coagulación XII, XI, IX, VIII, X, V, II y I, haciendo el extracto no coagulable.

Se encontró según la invención que el aumentar las concentraciones del extracto afectó el nivel de proliferación de células de fibroblastos de ratón albino 3T3-Swiss, siendo el efecto del extracto concentrado más pronunciado que un lisado del material de partida mientras que se normaliza a las cantidades de PDGF-AB presentes en las muestras. En particular, el efecto de los extractos concentrados fue más pronunciado que el control positivo (MasterMix, una mezcla a medida de factores de crecimiento humanos recombinantes preparada con TGF- $\beta$ 1 200 ng/ml, b-FGF 0,5 ng/ml, VEGF 5 ng/ml y PDGF-AB 300 ng/ml). También se encontró que la adición del extracto concentrado a monocapa de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) promovió la tubulogénesis. Un efecto sinérgico en la tubulogénesis de la monocapa de HUVEC se mostró mediante la adición del extracto concentrado en combinación con sellante de fibrina.

Para la inactivación viral con S/D óptima puede añadirse una subetapa de eliminación de agregados durante el tratamiento con S/D (por ejemplo, como se lleva a cabo en LYO IV). La eliminación de agregados puede llevarse a cabo, por ejemplo, por centrifugación; filtración; cromatografía de exclusión por tamaño preparativa (SEC); ultrafiltración, por ejemplo, usando membrana de poliétersulfona (PES) de 100 KD, membrana de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) de 100 KD, membranas de PES de 300 KD, membranas de polipropileno, membranas de acetato de celulosa y/o por cualquier otro método conocido en la técnica. Opcionalmente, se incluye una etapa adicional de eliminación de agregados mediante la adición de cloruro de calcio, u otras sales de calcio, y filtración por clarificación. Por ejemplo, puede añadirse cloruro de calcio a una concentración final de 40 mM (para facilitar la precipitación de agregados), seguido de filtración por clarificación, por ejemplo, usando filtros de 20, 5, 1,2 y 0,45  $\mu\text{m}$ . En una realización, esta etapa se añade después del tratamiento con S/D.

Se encontró según la invención que estas etapas adicionales de eliminación de agregados son factibles y dan un extracto biológicamente activo. Un extracto de plaquetas que tiene un bajo contenido de agregados puede

usarse ventajosamente para administración intravenosa. Por tanto, un extracto de plaquetas que tiene un bajo contenido de agregados puede usarse junto con un componente que comprende una concentración relativamente alta de calcio.

Se encontró en pocillos de cultivo celular sin recubrir, y en pocillos recubiertos con colágeno o fibrinógeno que contienen fibroblasto, que el tratamiento de las células con extractos que se sometieron a eliminación de agregados promovieron la motilidad de fibroblastos y el cierre de la herida (en el ensayo de arañazo) de una manera similar al lisado del material de partida y al PRP-R [(concentrado de PRP, activado con calcio y trombina (de EVICEL™)]. Se ha informado que PRP-R es beneficioso en la cicatrización en ambientes *in vivo* (Lacci KM, Dardik A, 2010).

Además, se encontró según la invención que los extractos sometidos a eliminación de agregados indujeron en HUVEC fuertes cambios morfológicos que están asociados a la angiogénesis.

Se encontró según la invención que ciertos factores de plaquetas pueden recuperarse durante la etapa de eliminación de S/D añadiendo al menos una etapa de elución en la columna de HIC usada para la eliminación de S/D y recogiendo también el material eluido. Un factor tal es PDGF-AB. Se encontró que lavando HIC con una disolución no isocrática, según la invención, puede obtenerse al menos 3 veces de recuperación o enriquecimiento de PDGF-AB (como en LYO V, VI y VII). La concentración de PDGF-AB se midió en el material liofilizado final tras la reconstitución con 4 ml de agua destilada doble (DDW). Se encontró que la concentración de PDGF-AB era 4.578 pg/ml en LYO VI, 15.028 pg/ml en LYO V y 194.353 pg/ml en LYO VII que se corresponde con aproximadamente  $7 \times 10^{-7}$  pg en LYO VI,  $2,26 \times 10^{-6}$  pg en LYO V y  $3,12 \times 10^{-5}$  pg en LYO VII de PDGF-AB por plaqueta usado como material de partida. En particular, el efecto del extracto enriquecido con PDGF-AB sobre la proliferación de células fue más pronunciado que PDGF-AB recombinante solo, indicando al hecho de que otros componentes extraídos de las plaquetas pueden potenciar sinérgicamente la proliferación de fibroblastos. Otro factor enriquecido/elevado que usa el método de la invención es bFGF (también llamado FGF-2 o  $\beta$ -FGF). También se encontró que lavando HIC con una disolución no isocrática, según la invención, puede obtenerse al menos 1,8 veces de recuperación o enriquecimiento de bFGF (como en LYO VI). Se encontró que la concentración de bFGF era 36-127 pg/ml, que se corresponde con aproximadamente  $5,4 \times 10^{-9}$  -  $1,95 \times 10^{-8}$  pg de bFGF por plaqueta usado como material de partida.

Estos hallazgos sentaron las bases para preparar un extracto según la invención. El extracto de la invención comprende una o más de las siguientes características: comprende proteínas que tienen factores de crecimiento y/o tróficos, por ejemplo, TGF- $\beta$ 1, b-FGF, VEGF y PDGF-AB con una composición más equilibrada en comparación con otras mezclas de factores de plaquetas conocidas en la técnica; es de inactivación viral doble, por ejemplo, tratado con S/D y pasteurizado; tiene contenido de agregados reducido; comprende una proporción de factores que es similar a la proporción fisiológica de los mismos factores; comprende una proporción equilibrada fisiológica entre TGF- $\beta$ 1, VEGF y PDGF-AB; y presenta impurezas del plasma reducidas (por ejemplo, niveles reducidos de IgG y fibrinógeno).

El término "proporción fisiológicamente equilibrada" se refiere, por ejemplo, a un proporción entre PDGF-AB : TGF- $\beta$ 1 y/o entre PDGF-AB : VEGF que es similar a la proporción de estos factores en una composición fisiológica de plaquetas, plaquetas concentradas, mezclas de plaquetas, plaquetas reducidas en leucocitos, mezclas de plaquetas reducidas en leucocitos, plaquetas lavadas, preparación reducida en leucocitos de plaquetas de aféresis lavadas (WAP), extracto de plaquetas, concentrado de plasma rico en plaquetas (PRP-R), suero y/o concentrado de plaquetas. "Suero" normalmente se refiere al plasma sanguíneo sin fibrinógeno u otros factores de coagulación que contienen factores de crecimiento/tróficos liberados por plaquetas activadas. En el caso del suero, la relación fisiológica puede calcularse según los valores de factores de crecimiento/tróficos presentes en el suero (según prospectos de kits de ELISA comerciales). En un ejemplo tal se encontró que la relación fisiológica entre PDGF-AB : TGF- $\beta$ 1 y PDGF-AB : VEGF era 0,5 y 90,9, respectivamente.

En una realización, la relación fisiológica entre PDGF-AB : TGF- $\beta$ 1 en WAP (material de partida) es al menos 0,2 o en el intervalo de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5, tal como aproximadamente 0,2, 0,3, 0,36, 0,4, 0,44 y 0,47.

En otra realización, la relación fisiológica entre PDGF-AB : VEGF en WAP (material de partida) es al menos 45 o en el intervalo de aproximadamente 45 a aproximadamente 103, tal como aproximadamente 45, 64, 73, 76 y 103.

En una realización de la divulgación, el extracto según la invención comprende una relación para PDGF-AB : TGF- $\beta$ 1 que es al menos 0,2; y/o para PDGF-AB : VEGF que es al menos 45.

En una realización de la divulgación, el extracto según la invención comprende una relación para PDGF-AB : TGF- $\beta$ 1 que es al menos aproximadamente 0,56; y/o para PDGF-AB : VEGF que es al menos aproximadamente 74 (como en LYO VII).

El extracto según la invención tiene una o más de las siguientes ventajas: está normalizado y permite rendimiento biológico robusto (coherente); presenta actividad biológica, por ejemplo, inducción de la proliferación y/o cambios morfológicos en células; presenta actividad elevada con bajas concentraciones de PDGF-AB en comparación con la concentración de PDGF-AB recombinante solo, por tanto, la probabilidad de cambios transformacionales en tejido no proliferativo es reducida; tiene seguridad viral óptima; tiene seguridad inmunológica mejorada, por ejemplo, ya que comprende bajos niveles de impurezas del plasma con respecto a un extracto preparado a partir de fracciones enriquecidas en plaquetas que no se sometieron a una etapa de eliminación de proteínas del plasma, por ejemplo, una etapa de lavado; y es no coagulable.

El término “extracto de plaquetas seguro de virus” se refiere a un extracto que se sometió a al menos dos tratamientos de inactivación viral ortogonal.

“Al menos dos tratamientos de inactivación viral ortogonal” implica llevar a cabo al menos dos tratamientos diferentes e independientes para inactivar virus. Puede usarse una combinación de dos o más de los siguientes ejemplos de tratamiento no limitantes: pasteurización, solvente/detergente (S/D), nanofiltración, tratamiento a bajo pH, irradiación UV y tratamiento con tiocianato de sodio.

El término “inactivar virus o inactivación viral” se refiere a una situación en la que los virus se mantienen en la disolución, pero se vuelven no viables, por ejemplo, disolviendo su envoltura lipídica; y/o a la situación en la que los virus se eliminan físicamente de la disolución, por ejemplo, por técnicas de exclusión por tamaño.

El término “extracto de plaquetas” se refiere a una mezcla que comprende factores derivados de plaquetas. Normalmente, los extractos están libres de células.

El término “lisado” se refiere a una disolución producida cuando las células se destruyen rompiendo sus membranas celulares.

El término “extracto activo de plaquetas” se refiere a un extracto de plaquetas que comprende sustancias biológicamente activas tales como factores de crecimiento y/o factores tróficos y presenta actividad biológica que incluye, pero no se limita a, inducción de la proliferación celular, motilidad celular, interacciones célula-célula y/o cambios morfológicos celulares.

El término “extracto de plaquetas derivado de múltiples donantes” se refiere a un extracto de plaquetas que se prepara a partir de al menos dos individuos. Los individuos pueden ser humanos u otros mamíferos.

El término “factor de crecimiento” normalmente se refiere a un agente que promueve el crecimiento, proliferación y/o diferenciación celular. Ejemplos de factores de crecimiento incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento transformante (TGF), por ejemplo, TGF- $\beta$ 1, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), por ejemplo, bFGF, factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), por ejemplo, PDGF-AB, y similares.

El término “factores tróficos” normalmente se refiere a un agente que estimula la diferenciación y/o supervivencia de células. Ejemplos de factor trófico incluyen, pero no se limitan a, moléculas de adhesión, proteínas morfogenéticas óseas, citocinas, receptor Eph de tirosina cinasa, factores de crecimiento epidérmicos, factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), GDNF, factores de crecimiento de unión a heparina, factores de crecimiento similar a la insulina, neurotrofinas, semaforinas, factores de crecimiento transformantes (TGF)  $\beta$ , ligandos de receptor de tirosina cinasa y similares.

Un factor de plaquetas puede tener actividad de crecimiento y actividad trófica.

El término “agregado” se refiere a un trozo de material que contiene sólidos tales como agregados de proteína. La agregación de proteínas puede encontrarse durante la fabricación de agentes bioterapéuticos (Protein aggregation and bioprocessing. Cromwell ME, Hilario E, Jacobson F. AAPS J. 2006 Sep 15;8(3):E572-9. Revisión). Los agregados de proteínas pueden estar en forma de proteínas solubles/insolubles, covalentes/no covalentes, reversibles/irreversibles y/o nativas/desnaturalizadas. Si se desea, por ejemplo, para administración intravenosa, los agregados pueden eliminarse del extracto por diferentes técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, por centrifugación; filtración; cromatografía de exclusión por tamaño preparativa (SEC); ultrafiltración, por ejemplo, usando membrana de poliétersulfona (PES) de 100 KD, membrana de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) de 100 KD, membranas de PES de 300 KD, membranas de polipropileno, membranas de acetato de celulosa y/o por cualquier otro método conocido en la técnica. Ventajosamente, en una realización de la invención, el extracto presenta bajo contenido de agregados y puede usarse para administración intravenosa. En una realización de la invención, el nivel de agregado (turbidez) puede calcularse según la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{extracto de plaquetas 0D320}}{\text{mg de proteína/ml}} = \frac{\text{albumina de suero humano 0D320}}{\text{mg de proteína/ml}} \times \text{extracto de plaquetas 0D320 por mg de proteína}$$

5

Un nivel en un extracto que es inferior a  $\leq 0,03$  DO<sub>320</sub> por mg de proteína medida como antes puede considerarse un extracto con bajo contenido de agregados. En una realización de la invención, el contenido de agregados está en el intervalo de aproximadamente 0,01 (límite de detección) a igual a 0,03 DO<sub>320</sub> por mg de proteína.

10

El término "impurezas del plasma" se refiere, por ejemplo, a trombina; fibrinógeno; fibronectina; factor de von Willebrand; factor II; factor VII; factor VIII; factor IX; factor X; factor XI e IgG.

15

Bajos niveles de impurezas del plasma se refiere, por ejemplo, a niveles indetectables de trombina activa fisiológica (por tiempo de coagulación); niveles indetectables de fibrinógeno activo fisiológico (por tiempo de coagulación); inferiores a aproximadamente 0,13 o inferiores a aproximadamente 0,034 mg/ml de fibrinógeno (por ELISA); inferiores a aproximadamente 0,004 ó 0,001 mg/ml de fibronectina; niveles indetectables de factor de von Willebrand activo fisiológico; inferiores a aproximadamente 0,0013 ó 0,0014 UI/ml de factor II; inferiores a aproximadamente 0,008 ó 0,009 UI/ml de factor VII; niveles indetectables de factor VIII activo fisiológico; niveles indetectables de factor IX activo fisiológico; inferiores a aproximadamente 0,003 UI/ml de factor X; niveles indetectables de factor XI y factor II activos fisiológicos; e inferiores a aproximadamente 0,076 ó 0,011 mg/ml de IgG. En una realización de la invención, la concentración de fibrinógeno (por ELISA) está en el intervalo de 0,01 a 0,1 mg/ml; la concentración de fibronectina está en el intervalo de 0,002 a 0,02 mg/ml; la concentración de factor VII está en el intervalo de 0,001 a 0,01 UI/ml; la concentración de factor X está en el intervalo de 0,001 a 0,01 UI/ml; y la concentración de IgG está en el intervalo de 0,01 a 0,1 mg/ml. Un extracto que presenta niveles indetectables de factores de coagulación y/o impurezas de proteína del plasma se considera que está agotado de estos factores/proteínas.

20

25

30

"Tratamiento de inactivación viral con solvente / detergente (S/D)" normalmente se refiere a una manera de proceder que inactiva virus envueltos o con envoltura lipídica destruyendo su envoltura lipídica. El tratamiento puede llevarse a cabo mediante la adición de detergentes (tales como Triton X-45, Triton X-100 o Tween 80) y solventes [tales como fosfato de tri(n-butilo) (TnBP), di- o trialquilfosfatos]. La combinación de solvente-detergente usada para desactivar los virus con envoltura lipídica puede ser cualquier combinación de solvente-detergente conocida en la técnica tal como TnBP y Triton X-100; Tween 80 y colato de sodio y otras combinaciones.

35

La concentración de (los) solvente(s) / detergente(s) usado(s) puede ser aquella comúnmente usada en la materia, por ejemplo, como se lleva a cabo en los documentos US5094960A, US4789545A. En una realización de la invención se usa una combinación de  $>0,1$  % de TnBP y  $>0,1$  % de Triton X-100. En otra realización de la invención se usa una combinación de 1 % de Triton X-100 y 0,3 % de TnBP. Normalmente, las condiciones bajo las que el solvente-detergente inactiva los virus consisten en 10-100 mg/ml de solvente / detergente a un nivel de pH que oscila de 5-8 y una temperatura que oscila de 2-37 °C durante 30 minutos a 24 horas. Sin embargo, otras combinaciones de solvente / detergente y condiciones adecuadas serán evidentes para cualquier persona versada en la materia.

40

45

"Pasteurización" normalmente se refiere a un proceso por el que el calor destruye tanto virus con envoltura lipídica como sin envoltura. La "pasteurización" es intercambiable con el término "inactivación térmica". La inactivación térmica puede llevarse a cabo a una temperatura en el intervalo de 59,5 a 60,5 °C durante un periodo de 9 a 10,5 horas, por ejemplo, la inactivación puede llevarse a cabo a 60 °C durante 10 horas. Pueden añadirse estabilizadores tales como sacarosa y glicina al lisado de plaquetas durante la etapa de pasteurización.

50

"Nanofiltración" se refiere normalmente a un proceso por el que virus con envoltura lipídica y virus sin envoltura se excluyen de la muestra usando filtros de escala nanométrica tales como Planova™ 20N, 35N y 75N; Viresolve/70™, Viresolve/180™. Los filtros pueden tener un tamaño de poro inferior a 70 nm, preferentemente entre 15 y 50 nm. Sin embargo, cualquier membrana que tenga un tamaño de poro suficiente para reducir o eliminar virus de la muestra puede emplearse en nanofiltración. Los virus eliminados por nanofiltración pueden estar envueltos [por ejemplo, VIH, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del Nilo Occidental, citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), virus del herpes simple] y sin envoltura (por ejemplo, virus de la hepatitis A, paravirus B19, virus de la poliomiéltis).

55

60

El tratamiento a bajo pH normalmente es eficaz contra virus envueltos. En una realización de la invención, el lisado de plaquetas está sometido a un bajo pH, normalmente a un pH de 4, y dura entre 6 horas y 21 días. "Tratamiento a bajo pH" es intercambiable con el término "inactivación a pH ácido".

65

El término "mezcla de factores de crecimiento celular de plaquetas activos y/o factores tróficos" se refiere a

una composición que comprende al menos 4 factores diferentes derivados de plaquetas, por ejemplo, factores de crecimiento y/o tróficos. En una realización de la invención, los factores son TGF- $\beta$ 1, b-FGF, VEGF y PDGF-AB.

5 Normalmente, el extracto de la invención es no coagulable y presenta bajos niveles de impurezas del plasma, por ejemplo, niveles de IgG bajos y/o de fibrinógeno bajos. Tal como menos de 3 mg/ml de IgG y menos de 0,98 mg/ml de fibrinógeno, tal como, por ejemplo, igual o inferior a aproximadamente 0,076 mg/ml de IgG e igual o inferior a aproximadamente 0,034 mg/ml de fibrinógeno.

10 El término “no coagulable” se refiere a un extracto de plaquetas que no es capaz de generar un coágulo únicamente tras la mezcla del extracto con un agente de activación, tal como trombina. “Un agente de activación” se refiere a un agente que puede formar fibrina a partir de fibrinógeno tal como trombina y/o una disolución obtenible de veneno de serpiente.

15 Se divulgan extractos de plaquetas seguros de virus que comprenden proteínas que tienen factores de crecimiento y/o tróficos (por ejemplo, TGF- $\beta$ 1, b-FGF, VEGF y PDGF-AB) con composición más equilibrada en comparación con otras mezclas de factores de plaquetas.

20 Una “composición más equilibrada” se refiere a una composición que se obtiene de múltiples donantes y comprende al menos cuatro proteínas diferentes que tienen actividad de factor de crecimiento y/o actividad de factor trófico tales como TGF- $\beta$ 1, b-FGF, VEGF y PDGF-AB y en la que están enriquecidos uno o más factores de plaquetas, por ejemplo, PDGF-AB y/o bFGF. Un extracto enriquecido en PDGF-AB puede comprender, por ejemplo, cantidades de PDGF-AB al menos 3 veces mayores, por ejemplo, aproximadamente 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8 o más, que el extracto sometido a S/D y la eliminación de S/D por HIC en ausencia de un lavado con una disolución no isocrática. Un extracto enriquecido en PDGF también se refiere, por ejemplo, a un extracto que comprende cantidades/niveles de PDGF-AB que son similares a las cantidades de PDGF-AB del material equivalente antes del tratamiento con S/D o después del tratamiento con S/D y antes de la eliminación de S/D, por ejemplo, por HIC o comprende cantidades de PDGF-AB similares a las cantidades en el lisado del material de partida. El enriquecimiento de PDGF-AB puede obtenerse aumentando la recuperación de PDGF-AB en una etapa de purificación y/o cromatografía. En una realización, el enriquecimiento de PDGF-AB se obtiene aumentando la recuperación de PDGF-AB durante la eliminación de S/D en la etapa de HIC añadiendo un lavado con una disolución no isocrática. Así, el método según la invención permite obtener un extracto de plaquetas con altos rendimientos de PDGF-AB.

35 Un extracto enriquecido con bFGF puede, por ejemplo, comprender cantidades de bFGF al menos 1,8 veces mayores, por ejemplo, aproximadamente 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8 o más, que el mismo extracto sometido a S/D y la eliminación de S/D por HIC, en ausencia de un lavado con una disolución no isocrática. Un extracto enriquecido con bFGF también se refiere, por ejemplo, a un extracto que comprende cantidades de bFGF que son similares a las cantidades de bFGF del material equivalente antes del tratamiento con S/D o después del tratamiento con S/D y antes de la eliminación de S/D, por ejemplo, por HIC o comprende cantidades de bFGF similares a las cantidades en el lisado del material de partida. El enriquecimiento en bFGF puede obtenerse aumentando la recuperación de bFGF en una etapa de purificación y/o de cromatografía. En una realización, el enriquecimiento de bFGF se obtiene aumentando la recuperación de bFGF durante la eliminación de S/D en la etapa de HIC añadiendo un lavado con una disolución no isocrática. Así, el método según la invención permite obtener un extracto de plaquetas con altos rendimientos de bFGF.

45 El extracto de plaquetas según la invención puede usarse para cualquier fin terapéutico. El extracto de la invención es adecuado, por ejemplo, para promover la curación de tejido lesionado en un sujeto. El extracto de plaquetas puede usarse como tal para inyección en un área diana o para la administración intravenosa; aplicarse sobre/administrarse en vendas, espumas, almohadillas y matrices y/o puede usarse en combinación con sellante de fibrina para aplicaciones tópicas. El extracto puede liberarse en/sobre una localización deseada de diferentes agentes de administración tales como vendas, almohadillas, espumas y matrices. Los agentes pueden prepararse de materiales naturales y/o sintéticos. Ejemplos de tales materiales incluyen, pero no se limitan a, polímeros, hidrogeles, poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), ácido hialurónico, sulfato de condroitina, gelatina, alginato, matrices de colágeno, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(2-hidroxietilmetacrilato) [PHEMA], agar, oxidar la celulosa generada (ORC), péptidos auto-ensamblados [SAP], ácido poli(glicólico), ácido poli(láctico), fibrina y combinaciones de los mismos.

50 Se encontró según la invención que usando el extracto según la invención en combinación con sellante de fibrina en el modelo de implantación subcutánea en ratas [comúnmente usado para evaluar la respuesta del tejido, angiogénesis y curación global en el tejido implantado - International Organization for Standardization (ISO) 10993-6, Biological Evaluation of Medical Devices - Part 6: Tests for Local Effects After Implantation (2007)] se produjo más angiogénesis y mejor curación global 7 días después de la implantación en comparación con usar sellante de fibrina solo o solución salina. El extracto se usó en dos dosis diferentes y lo siguiente son las cantidades de varios factores de crecimiento en realidad administrados: TGF- $\beta$ 1 5,27 ó 52,7; PDGF-AB 0,1 ó 1,05; bFGF 0,0024 ó 0,024; y VEGF 0,023 ó 0,23, ng (administrados con 200  $\mu$ l de sellante de fibrina). Se mostró que el efecto beneficioso del extracto

65

era dependiente de la dosis.

También se encontró que el extracto según la invención no tenía efecto perjudicial como se ha determinado microscópicamente por la presencia de bajos números de macrófagos y linfocitos en el sitio de implante.

El término “sujeto”, como se usa en el presente documento, incluye animales de origen mamífero, que incluyen seres humanos. En una realización, el sujeto es un paciente.

El término “cualquier fin terapéutico” se refiere a cualquier tratamiento curativo o preventivo; para uso cosmético; y/o para cualquier enfermedad, trastorno o afección en un sujeto. Fines terapéuticos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, acelerar la cicatrización interna o externa, es decir, hacer que la herida se cure rápidamente en comparación con una herida sin tratar o con otros tratamientos de heridas conocidos; tratar cualquier lesión o afección que requiere estimular la angiogénesis, mitogénesis, proliferación celular, neutrófilos y macrófagos, síntesis de colágeno, migración, contracción de la herida, síntesis de matriz extracelular, epitelialización y quimiotaxia; lesión o afección que requiere generación de tejido, regeneración o reorganización, epitelialización, formación de nuevos vasos sanguíneos, o angiogénesis; para disminuir la formación de cicatrices; reducir complicaciones posoperatorias y morbilidad; para curar heridas de la piel, por ejemplo, cortes o úlceras.

El extracto de plaquetas puede usarse en diversos campos quirúrgicos tales como, pero no se limitan a, cirugía ortopédica (por ejemplo, reparación de hueso, reparación de cartílago articular, artroplastia de la rodilla, fusión espinal lumbar y en la generación de discos intervertebrales); cirugía dental; cirugía odontológica y maxilofacial (por ejemplo, consolidación de implantes de titanio, aumento del seno maxilar y remodelación ósea); para la reparación de músculo, tendón y ligamento; cirugía plástica y reconstructiva facial; curación de heridas crónicas de la piel, curación de quemaduras de la piel, oftalmología; regeneración de nervios faciales, regeneración de nervios periféricos, reparación del sistema nervioso central (SNC) (cirugía de la columna vertebral y/o cerebral), reparación del nervio óptico, reparación del síndrome de compresión del nervio, reparación del nervio craneal, reparación del nervio ciático; cirugía cardíaca y bariátrica.

El extracto puede administrarse sobre una superficie de una parte del cuerpo de un paciente. El término “superficie” se refiere a una superficie externa que puede verse a simple vista y a una superficie de una parte del cuerpo interna que es una parte de la anatomía interna de un organismo. Superficies externas incluyen, pero no se limitan a, la piel de la cara, garganta, cuero cabelludo, pecho, espalda, orejas, cuello, mano, codo, cadera, rodilla y otros sitios de la piel. Ejemplos de partes del cuerpo internas incluyen, pero no se limitan a, cavidad del cuerpo o abertura anatómica que se expone al entorno externo y órganos internos tales como los orificios nasales; los labios; las orejas; el área genital, que incluye el útero, vagina y ovarios; los pulmones; el ano; el bazo; el hígado; y el músculo cardíaco. La superficie puede ser un sitio hemorrágico o no hemorrágico. Alternativamente, el extracto puede administrarse mediante inyección, por ejemplo, intradérmicamente, intraperitonealmente, subcutáneamente, intratecalmente, intraesternamente, intracranealmente, intramuscularmente y/o intravenosamente. El extracto también puede administrarse por infusión.

El término “una cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la dosis requerida para prevenir o tratar (aliviar un síntoma o todos los síntomas) una enfermedad, trastorno o afección. La cantidad eficaz puede medirse basándose en cualquier cambio en la evolución de la enfermedad en respuesta a la administración de la composición. La dosis eficaz puede cambiarse dependiendo de la edad y peso del sujeto, la enfermedad y su gravedad (por ejemplo, etapa temprana o avanzada) y otros factores que pueden ser reconocidos por el experto en la materia.

El extracto también puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, el término “excipiente” se refiere a una sustancia inerte que se añade en el extracto. Los excipientes pueden añadirse, por ejemplo, con el fin de garantizar que las sustancias activas retengan su estabilidad química y/o actividad biológica tras el almacenamiento, para ayudar en el proceso de fabricación y/o por motivos estéticos, por ejemplo, color. El excipiente añadido es generalmente seguro y no tóxico.

El extracto de plaquetas según la invención puede usarse en combinación con un sellante quirúrgico. Pueden usarse diferentes tipos de sellantes quirúrgicos en combinación con el extracto de plaquetas, que incluyen, pero no se limitan a, un sellante biológico (tal como un sellante de fibrina preparado con componentes de fibrinógeno y de trombina); un sellante sintético tal como acrilatos, cianoacrilatos y polímeros de polietilenglicol (PEG); y un sellante semisintético, por ejemplo, hecho de una combinación de materiales biológicos y sintéticos tales como pegamento de gelatina-formaldehído-resorcinol (GFR). En una realización de la invención, el extracto de plaquetas se usa en combinación con componentes de sellante de fibrina. En otra realización de la invención, el extracto de plaquetas se usa con un sellante sintético.

El kit de acuerdo con la invención comprende un recipiente que comprende el extracto según la invención y un agente de administración. El extracto puede estar en una forma sólida, como una disolución o en forma congelada. En el caso de que el extracto se proporcione en forma sólida, el kit puede comprender además un

recipiente con un vehículo farmacéuticamente aceptable para reconstituir el extracto sólido. El kit puede comprender además una o más jeringas y/o agujas de jeringa para inyección del extracto al paciente. El kit puede comprender instrucciones para su uso. Las instrucciones pueden describir cómo administrar el extracto a un paciente. La invención también se refiere a un kit que comprende recipientes que contienen los componentes del sellante de fibrina o el sellante sintético, un recipiente que contiene el extracto de la invención e instrucciones para su uso. Opcionalmente, el extracto de la invención puede estar en el recipiente de un componente de sellante de fibrina. Por tanto, la invención se refiere a un kit que comprende un recipiente que contiene el extracto liofilizado, un recipiente que contiene una disolución o vehículo de reconstitución e instrucciones para su uso.

Los componentes del sellante de fibrina pueden prepararse a partir de composiciones de sangre. La composición de sangre puede ser sangre completa o fracciones de la sangre, es decir, un producto de sangre completa tal como plasma.

En una realización de la invención, el componente de fibrinógeno comprende un componente biológicamente activo (BAC) que es una disolución de proteínas derivada de plasma sanguíneo que puede comprender además ácido tranexámico y arginina o lisina o mezclas de arginina y lisina, o sus sales farmacéuticamente aceptables. El BAC puede derivarse de crioprecipitado, en particular crioprecipitado concentrado. El término "crioprecipitado" se refiere a un componente de la sangre que se obtiene de plasma congelado preparado a partir de sangre completa. Puede obtenerse un crioprecipitado cuando el plasma congelado se descongela en frío, normalmente a una temperatura de 0-4 °C, produciendo la formación de sobrenadante precipitado que contiene fibrinógeno y factor XIII. El precipitado puede recogerse, por ejemplo, por centrifugación. La disolución de BAC comprende además factor VIII, fibronectina, factor de von Willebrand (vWF), vitronectina, etc., por ejemplo, como se describe en los documentos US-B-6.121.232 y WO9833533.

La composición de BAC puede comprender estabilizadores tales como clorhidrato de arginina. Normalmente, la cantidad de fibrinógeno en BAC está en el intervalo de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 mg/ml. La cantidad de ácido tranexámico en la disolución de BAC puede ser de aproximadamente 80 a aproximadamente 110 mg/ml. La cantidad de clorhidrato de arginina puede ser de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 mg/ml.

Opcionalmente, la disolución se tampona a un valor de pH compatible fisiológico. El tampón puede estar compuesto de glicina, citrato de sodio, cloruro sódico, cloruro de calcio y agua para inyección como vehículo. La glicina puede estar presente en la composición en la cantidad de aproximadamente 6 a aproximadamente 10 mg/ml, el citrato de sodio puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/ml, el cloruro sódico puede estar en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 mg/ml y el cloruro de calcio puede estar en la concentración de aproximadamente 0,1-0,2 mg/ml.

En otra realización, la concentración de plasminógeno y plasmina en la composición de BAC se reduce a igual o inferior a 15 µg/ml como, por ejemplo, 5 µg/ml o menos plasminógeno, por ejemplo, usando un método como se describe en los documentos US-B-7.125.569 y WO02095019. En este caso no se necesita la adición de ácido tranexámico, aprotinina o cualquier otro inhibidor fibrinolítico en el BAC.

También es posible que el sellante de fibrina comprenda componentes que fomentan la formación del coágulo, tales como Ca<sup>2+</sup>, factor VIII, fibronectina, vitronectina, factor de von Willebrand (vWF) que pueden proporcionarse como un componente separado o formularse con los componentes del sellante de fibrina.

Los componentes del sellante de fibrina derivados de composiciones de sangre normalmente se purifican de partículas infecciosas. El procedimiento de purificación puede llevarse a cabo por nanofiltración; tratamiento con solvente/detergente y/o por cualquier otro método conocido en la técnica.

El término "partícula infecciosa" se refiere a una partícula microscópica, tal como micro-organismo o un prión, que puede infectar o propagarse en células de un organismo biológico. Las partículas infecciosas pueden ser partículas virales.

El extracto de plaquetas preparado según la invención puede usarse en combinación con diversos tipos de células, por ejemplo, fibroblastos y citoblastos, por ejemplo, citoblastos endoteliales, por ejemplo, HUVEC. El tipo de célula puede determinarse según el uso terapéutico previsto. Por ejemplo, para la regeneración de disco intervertebral, puede usarse una composición de células que comprende células derivadas de notocordal. Para la inducción de angiogénesis pueden usarse citoblastos endoteliales.

El extracto de plaquetas de la invención puede prepararse por un método que incluye al menos dos tratamientos de inactivación viral diferentes y comprende las siguientes etapas: obtener fracciones enriquecidas en plaquetas de múltiples donantes; lisar las plaquetas; llevar a cabo un tratamiento de inactivación viral con solvente-detergente (S/D); eliminar el S/D por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando un método de la invención desvelado en el presente documento; y realizar un segundo tratamiento de inactivación viral ortogonal, por ejemplo,

pasteurización. La HIC comprende las etapas de: cargar el lisado en HIC y recoger una fracción eluida bajo condiciones no isocráticas.

5 Cargar el lisado en HIC puede llevarse a cabo poniendo en contacto el lisado con la resina de la HIC que está cargada dentro de una columna.

10 El término “contacto entre el lisado y la resina de HIC” se usa en su sentido más amplio y se refiere, por ejemplo, a cualquier tipo de acción de combinación que ponga el lisado en proximidad suficientemente próxima con la resina de forma que se produzca una interacción de unión entre el material de S/D presente dentro del lisado y la resina.

15 Se divulga un método para la preparación de un extracto de plaquetas seguro de virus que comprende al menos dos tratamientos de inactivación viral ortogonal, comprendiendo el método las etapas de: proporcionar fracciones enriquecidas en plaquetas de múltiples donantes; preparar un lisado de plaquetas; llevar a cabo un tratamiento de inactivación viral con solvente / detergente (S/D), por ejemplo, en lisado reducido en agregados; eliminar el S/D por HIC que comprende las etapas de cargar el lisado en HIC y recoger materiales sin unir y una fracción eluida bajo condiciones no isocráticas; y realizar un segundo tratamiento de inactivación de virus ortogonal.

20 Las fracciones de las que puede obtenerse el material enriquecido en plaquetas incluyen, pero no se limitan a, fracciones de sangre, fracciones de plasma, plaquetas lavadas y reducidas en leucocitos de aféresis, y plaquetas de aféresis. En una realización, se usan mezclas de plaquetas lavadas y/o reducidas en leucocitos de múltiples donantes como material de partida para la preparación del extracto de plaquetas.

25 Ventajosamente, el usar plaquetas lavadas como material de partida permite obtener un extracto de plaquetas no coagulable con impurezas del plasma reducidas como se ha definido anteriormente.

30 Normalmente, el término “material de partida de plaquetas” se refiere a fracciones enriquecidas en plaquetas obtenidas de múltiples donantes para su uso en el método de la invención. Las fracciones enriquecidas en plaquetas pueden, por ejemplo, separarse de unidades de sangre completa, de fracciones de sangre y/o de fracciones de plasma. Las fracciones enriquecidas en plaquetas pueden obtenerse de donaciones de aféresis. El material de partida puede lavarse y/o reducirse en leucocitos. En una realización de la invención, las fracciones enriquecidas en plaquetas se lavan y se reducen en leucocitos y se obtienen de donaciones de aféresis. En una realización, el número mínimo de plaquetas en una unidad recogida reducida en leucocitos de aféresis es aproximadamente o superior a  $3,0 \times 10^{11}$  como se especifica en la “Circular de información para el uso de sangre humana y componentes sanguíneos”.

40 El término “plaquetas lavadas” se refiere a plaquetas que se sometieron a una etapa de lavado. Durante el procedimiento de lavado también puede haber pérdida de plaquetas. El lavado puede llevarse a cabo usando 0,9 % de cloruro sódico con o sin pequeñas cantidades de dextrosa. El procedimiento de lavado puede llevarse a cabo como se ha elaborado en la “Circular de Información para el uso de sangre humana y componentes sanguíneos”. En una realización de la invención, el lavado se lleva a cabo del siguiente modo: una unidad de material de plaquetas se centrifuga bajo condiciones suaves. Entonces, el sobrenadante se desecha y el sedimento de plaquetas se lava al menos dos veces (con centrifugación entre los lavados) con solución salina bajo condiciones suaves. Las plaquetas lavadas y resuspendidas pueden congelarse hasta que se usen en el método de la invención.

50 El término “reducido en leucocitos” se refiere a un contenido de leucocitos que es inferior al contenido de leucocitos en la sangre completa (el contenido en sangre completa es aproximadamente 1 a  $10 \times 10^9$  glóbulos blancos por unidad de sangre). Puede usarse cualquier método de reducción de leucocitos, por ejemplo, por filtración, para obtener una unidad reducida en leucocitos. La reducción en leucocitos puede llevarse a cabo durante la aféresis. En una realización de la invención, una unidad de plaquetas que contiene menos de aproximadamente  $8,3 \times 10^5$  leucocitos se usa como material de partida para la preparación del extracto de plaquetas. En otra realización, una unidad de plaquetas reducida en leucocitos que contiene menos de aproximadamente  $5 \times 10^6$  leucocitos se usa como material de partida para la preparación del extracto de plaquetas.

60 El término “aféresis” normalmente se refiere a la extracción de sangre de un único donante, siendo una porción (por ejemplo, plaquetas) separada y retenida y el resto se retransfunde al donante. Una unidad de plaquetas de aféresis obtenida de un único donante puede contener aproximadamente o más de  $3,0 \times 10^{11}$  plaquetas. En una realización de la invención, una unidad de plaquetas de aféresis obtenida de un único donante contiene hasta  $6,0 \times 10^{11}$  plaquetas

65 La lisis de las plaquetas y liberación de los factores (por ejemplo, diversos factores de crecimiento de plaquetas y/o factores tróficos) atrapados en las plaquetas, puede llevarse a cabo por congelación y descongelación de las fracciones enriquecidas en plaquetas, por tratamiento con S/D, por sonicación [Slezak et al., (1987) J. Exp. Med. V166 p489-505], por prensa francesa [Salganicoff et al., (1975) Biochem. Biophys. Acta v385 p394-411] y/o por cualquier otro método conocidos en la técnica. En una realización de la invención, la lisis de las plaquetas se lleva a

cabo por congelación y descongelación de las fracciones enriquecidas en plaquetas, seguido de llevando a cabo un tratamiento con S/D. Normalmente, la lisis de las plaquetas produce un lisado de plaquetas libre de células.

En una realización de la invención, la primera etapa de inactivación viral de la preparación del extracto comprende tratamiento con solvente-detergente (S/D) de las plaquetas para eliminar virus envueltos. El tratamiento con S/D también promueve la lisis de las plaquetas y la liberación de su contenido en la disolución. Para la inactivación viral óptima de la envoltura se lleva a cabo una subetapa que incluye la eliminación de agregados (por ejemplo, por filtración) durante la etapa de tratamiento con S/D.

El término “eliminación de S/D (eliminación de solvente-detergente)” se refiere a la eliminación de la masa del solvente-detergente usado en el tratamiento con S/D. La eliminación del solvente-detergente comprende usar columna de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), por ejemplo, material de relleno de sílice C-18 y SDR (eliminación de solvente-detergente) HyperD. La eliminación de S/D puede comprender además una etapa de extracción con aceite. En una realización de la invención, SDR HyperD, que es un relleno cromatográfico hecho de perlas de sílice en el que el volumen de poro está lleno de un polímero acrílico hidrófobo reticulado tridimensional, se usa para eliminar el solvente-detergente. SDR HyperD implica ventajosamente una adsorción en modo mixto de la interacción hidrófoba y está asociada a un efecto de exclusión molecular [Guerrier L et al. “Specific sorbent to remove solvent-detergent mixtures from virus-inactivated biological fluids”. J Chromatogr B Biomed Appl. 1995 Feb 3;664(1):119-125]. Se encontró según la invención que se obtuvieron mejores resultados usando SDR + condiciones de elución en comparación con C-18 + condiciones de elución. En una realización, se obtuvieron elevadas recuperaciones de PDGF-AB usando SDR + condiciones de elución.

HIC se refiere, por ejemplo, a una columna rellena con una matriz de resina de polímero hidrófobo.

La cromatografía de interacción hidrófoba puede llevarse a cabo cargando a la columna de HIC el lisado tratado con S/D en un tampón de unión. La columna puede equilibrarse antes de cargar el lisado tratado con S/D, por ejemplo, lavando la columna con el tampón de unión. El término “equilibrar” se refiere a permitir y/o ajustar la columna para que alcance una condición de tampón específica tal como un nivel de pH específico y fuerza iónica. En una realización, el ajuste de la columna se lleva a cabo lavando la columna con un tampón de equilibrio que tiene un nivel de pH predeterminado y fuerza iónica antes de cargar el lisado tratado con S/D sobre la columna. En una realización de la invención, el tampón de equilibrio comprende acetato sódico 20 mM y glicina 10 mM a pH 6,8-7,4 y 5 % (v/v del volumen total) de albúmina de suero humano (HSA). En otra realización de la invención, el tampón de equilibrio comprende acetato sódico 20 mM y glicina 10 mM a pH 6,8-7,4 y 1 % de albúmina de suero humano (v/v del volumen total). En otra realización de la invención, el tampón de equilibrio comprende acetato sódico 20 mM y glicina 10 mM a pH 6,8-7,4 y 0,2 % de albúmina de suero humano (v/v del volumen total). Todavía en otra realización de la invención, el tampón de equilibrio comprende acetato sódico 20 mM y glicina 10 mM a pH 6,8-7,4, 0,2 % de albúmina de suero humano (v/v del volumen total) y 1 % de sulfato de dextrano (peso/peso del peso total). El tampón de equilibrio puede comprender HSA en un intervalo de concentración de aproximadamente el 0,2 a aproximadamente el 5 % (v/v del volumen total). El término “tampón de unión” se refiere al tampón usado durante la carga del lisado tratado con S/D sobre la columna de cromatografía. A menudo, el tampón de equilibrio usado para ajustar la columna antes y/o durante la carga del lisado se llama tampón de unión. En una realización de la invención, el tampón de unión comprende acetato sódico 20 mM y glicina 10 mM a pH 6,8-7,4 y 5 % (v/v del volumen total) de albúmina de suero humano. En otra realización, el tampón de unión comprende acetato sódico 20 mM y glicina 10 mM a pH 6,8-7,4 y 1 % de albúmina de suero humano (v/v del volumen total). En otra realización, el tampón de unión comprende acetato sódico 20 mM y glicina 10 mM a pH 6,8-7,4 y 0,2 % de albúmina de suero humano (v/v del volumen total). Todavía en otra realización, el tampón de unión comprende acetato sódico 20 mM y glicina 10 mM a pH 6,8-7,4, 0,2 % de albúmina de suero humano (v/v del volumen total) y 1 % de sulfato de dextrano (peso/peso del peso total). El tampón de unión puede comprender HSA en un intervalo de concentración de aproximadamente el 0,2 a aproximadamente el 5 % (v/v del volumen total).

El término “material sin unir” normalmente se refiere a la fracción recogida tras lavar la columna cargada con el mismo tampón usado para el equilibrio y/o el tampón usado para cargar el extracto tratado con S/D sobre la columna (“tampón de unión”). Ventajosamente, en la etapa de eliminación de S/D, usando HIC, después de lavar la columna y recoger el material sin unir, se usa una disolución no isocrática para aumentar la recuperación de ciertos factores de crecimiento, por ejemplo, PDGF-AB y bFGF; para obtener una composición más equilibrada y/o un extracto que tiene una proporción fisiológicamente equilibrada. A este respecto, la eliminación de S/D en el lisado tratado con S/D se lleva a cabo cargando el lisado tratado con S/D sobre HIC en una disolución de unión, lavando con una disolución isocrática, recogiendo el material sin unir que contiene el lisado sustancialmente sin el S/D y a continuación recogiendo PDGF-AB, y quizás otros factores, por ejemplo, bFGF, unidos a la resina de HIC usando condiciones de elución. Las condiciones de elución más comunes emplean un desplazamiento en la composición de la fase móvil o una disolución no isocrática de manera que se pierde el entorno de unión a los factores, por ejemplo, PDGF-AB creado por la disolución de unión.

En una realización de la invención, PDGF-AB se enriquece 3 veces, durante la eliminación de S/D empleando HIC, eluyendo PDGF-AB unido a la resina de HIC usando condiciones de elución no isocrática.

El término "condiciones de elución" se refiere a usar una condición no isocrática, por ejemplo, una disolución o condición diferente de la disolución o condición usada para cargar y/o equilibrar la columna, y/o diferente de la disolución usada en una etapa previa. La condiciones de elución son de forma que S/D siga sustancialmente unido a la columna mientras que los factores se eluyeron. El método según la invención comprende al menos una etapa de elución con una disolución no isocrática.

Las condiciones de elución normalmente implican un aumento en la concentración de sales. Se encontró que si se usa una resina C-18, existe una correlación positiva entre la concentración de NaCl en el tampón de elución y la recuperación de PDGF-AB tras HIC usando una concentración que oscila de NaCl 0,3 M hasta 1 M. Se obtuvieron resultados mejorados a una concentración de 1 M (recuperación de aproximadamente el 30 % de PDGF-AB). Si se usa resina de SDR, se obtuvieron recuperaciones de PDGF-AB similares en todas las concentraciones probadas de NaCl de 0,7 y 1,5 M.

Se obtuvo otra mejora en las condiciones de elución para PDGF-AB añadiendo un solvente orgánico al tampón en combinación con un aumento en las concentraciones de sales. Condiciones de elución óptimas son de forma que S/D siga sustancialmente unido a la columna mientras que se eluyeron la mayoría de los factores.

Se encontró según la invención que se obtuvo una alta recuperación de PDGF-AB con NaCl menos de 1 M y/o menos del 20 % de etanol en tanto las resinas C-18 como SDR sin afectar sustancialmente la eliminación de S/D.

Se encontró según la invención que se obtuvo elevada elución para b-FGF añadiendo en el tampón, además de etanol y NaCl, una molécula que puede unirse a b-FGF, por ejemplo, heparina. Se obtuvieron resultados óptimos para la recuperación de PDGF-AB y b-FGF cuando se incuban el lisado con una molécula que puede unirse a factores de crecimiento/tróficos (por ejemplo, sulfato de dextrano) antes de la etapa de eliminación de S/D y llevando a cabo la etapa de eliminación de S/D en presencia de tal molécula.

En una realización de la invención, la disolución de elución empleada es diferente del tampón de unión, por ejemplo, diferentes de una disolución que contiene acetato sódico 20 mM, glicina 10 mM y 0,2 % de albúmina de suero humano; diferente de una disolución que contiene acetato sódico 20 mM, glicina 10 mM y 1 % de albúmina de suero humano y/o diferente de una disolución que contiene acetato sódico 20 mM, glicina 10 mM y 5 % de albúmina de suero humano. En otra realización de la invención, la disolución de elución comprende componentes distintos de acetato sódico, glicina y albúmina de suero humano. En otra realización de la invención, la disolución de elución comprende componentes distintos de acetato sódico 20 mM, glicina 10 mM y 0,2 % de albúmina de suero humano. En otra realización, el tampón de elución comprende un solvente orgánico, una sal y/o una molécula que se une a factor(es) de crecimiento/trófico(s). En otra realización, el tampón de elución comprende etanol, por ejemplo, a una concentración del 10-12,5 %, NaCl, por ejemplo, a una concentración de 0,5 M-1 M, heparina, por ejemplo, a una concentración de 5 UI/ml y/o sulfato de dextrano, por ejemplo, a una concentración del 0,1-1 %. En otra realización, la disolución de elución comprende acetato sódico 20 mM, glicina 10 mM, 10 % de etanol, NaCl 1 M y 0,2 % de albúmina de suero humano. En otra realización, la disolución de elución comprende acetato sódico 20 mM, glicina 10 mM, 12,5 % de etanol, NaCl 0,5 M y 0,2 % de albúmina de suero humano. En otra realización, la disolución de elución comprende acetato sódico 20 mM, glicina 10 mM, 12,5 % de etanol, NaCl 0,5 M, 5 UI/ml de heparina y 0,2 % de albúmina de suero humano. En otra realización, la disolución de elución comprende acetato sódico 20 mM, glicina 10 mM, 1 % de sulfato de dextrano y 0,2 % de albúmina de suero humano. En otra realización, la disolución de elución comprende acetato sódico 20 mM, glicina 10 mM, 12,5 % de etanol, NaCl 0,5 M, 0,1 % de sulfato de dextrano y 0,2 % de albúmina de suero humano. Todavía en otra realización, la disolución comprende acetato sódico 20 mM, glicina 10 mM, 1 % de sulfato de dextrano y 0,2 % de HSA. En una realización de la invención, el método comprende más de una etapa de elución. En tal caso, la disolución de elución es diferente de la disolución usada en una etapa previa y puede ser la misma que el tampón de unión.

En una realización de la invención, la disolución no isocrática es tampón de acetato-glicina (por ejemplo, acetato sódico 20 mM y glicina 10 mM a pH 6,8-7,4) que contiene de 5 % al 15 % de etanol, NaCl 0,2 M a 1,2 M y del 0,1 % al 1,0 % de HSA, por ejemplo, 0,2 % de HSA. Otras sales posibles son, pero no se limitan a, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>. Otros solventes posibles son, pero no se limitan a, isopropanol, glicerol, etilenglicol.

Se encontró según la invención que llevando a cabo dos etapas de elución I - con tampón de acetato-glicina (acetato sódico 20 mM y glicina 10 mM a pH 6,8-7,4) que contiene 12,5 % de etanol, NaCl 0,5 M, 5 UI/ml de heparina [una molécula que se une a factor(es) de crecimiento/trófico(s)] y 0,2 % de HSA; y II - con tampón de acetato-glicina (acetato sódico 20 mM y glicina 10 mM a pH 6,8-7,4) que contiene 10 % de etanol, NaCl 1 M y 0,2 % de HSA, puede obtenerse recuperación o enriquecimiento de al menos 3 veces de PDGF-AB y puede obtenerse recuperación o enriquecimiento de aproximadamente 1,8 veces de bFGF (como en LYO VI) en comparación con una preparación obtenida en ausencia de tales etapas de elución.

En una realización de la invención, se lleva a cabo una elución de dos etapas con una condición no

isocrática. En otra realización de la invención, la disolución no isocrática usada en al menos una de las etapas, por ejemplo, la primera etapa, comprende una molécula que se une a factores de crecimiento tales como heparina a un intervalo de concentración de 2 a 30 UI/ml, 2-25 UI/ml, 2-20 UI/ml, 2-15 UI/ml, 2-10 UI/ml o 2-5 UI/ml. En una realización de la invención, la disolución no isocrática comprende heparina a una concentración de 5 UI/ml.

También se encontró según la invención que añadiendo una etapa de incubación con sulfato de dextrano a una concentración final del 1 % (peso/peso) [una molécula que se une a factor(es) de crecimiento/trófico(s)] después de tratamiento con S/D y antes de la etapa de eliminación de S/D, y llevando a cabo dos etapas de elución, una con tampón de acetato-glicina (acetato sódico 20 mM y glicina 10 mM a pH 6,8-7,4) que contiene 12,5 % de etanol, NaCl 0,5 M, 0,1 % de sulfato de dextrano y 0,2 % de HSA, y otra con 1 % de sulfato de dextrano y 0,2 % de HSA en tampón de acetato-glicina durante la etapa de eliminación de S/D, puede obtenerse recuperación o enriquecimiento de aproximadamente 6,6 veces de PDGF-AB y recuperación o enriquecimiento de aproximadamente 2,8 veces de bFGF (como en LYO VII) en comparación con preparaciones obtenidas sin tales eluciones. Por estas etapas de elución, la recuperación de bFGF puede aumentarse al 85 % y la recuperación de PDGF-AB puede aumentarse al 88 % en comparación con concentraciones de los factores antes de la eliminación de S/D por HIC.

Sorprendentemente, la recuperación global de PDGF-AB (del material de partida, WAP) en LYO VII fue del 51 % en comparación con la recuperación global de PDGF-AB del 1,5 % en LYO VI. La recuperación global de VEGF en LYO VII fue del 73 % en comparación con el 37 % en LYO VI. En una realización de la invención, el método de la invención comprende además la etapa de poner en contacto el lisado con una molécula que se une a factores, por ejemplo, factores de crecimiento antes de la etapa de eliminación de S/D. La molécula que se une a factores puede ser, por ejemplo, sulfato de dextrano a un intervalo de concentración final del 0,01 al 1 %, por ejemplo, a una concentración del 1 % (peso/peso). En una realización tal, el tampón de unión comprende sulfato de dextrano, además de acetato sódico, glicina y albúmina de suero humano. En otra realización de la invención, la disolución no isocrática comprende sulfato de dextrano a una concentración final del 0,1 % (peso/peso).

Se encontró según la invención que la secuencia de disoluciones de elución desempeña una función en el nivel de recuperación de PDGF-AB y b-FGF. Concretamente, las recuperaciones de factores pueden variar cuando se usan diferentes disoluciones no isocráticas y/o cuando se cambia o invierte el orden de elución.

La molécula puede ser heparina, sulfato de dextrano, sulfato de heparano y otros polisacáridos sulfatados, glicosaminoglicanos, o polianiones, y similares, con lo que pueden unirse factores de crecimiento/tróficos tras el contacto.

El término "contacto entre la molécula y el factor" se usa en su sentido más amplio y se refiere a cualquier tipo de acción de combinación que ponga la molécula en proximidad suficientemente próxima a los factores de interés presentes en el lisado de forma que se produzca una interacción de unión entre el compuesto químico y los factores. La puesta en contacto puede llevarse a cabo de diferentes formas, que incluyen, pero no se limitan a, introducir el compuesto en el lisado.

Ventajosamente, la puesta en contacto del lisado con una molécula que se une a factores de crecimiento y/o factores tróficos antes de la etapa de eliminación de S/D produce un aumento/enriquecimiento en las cantidades de varios factores, por ejemplo, PDGF-AB, bFGF.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para eliminar solvente-detergente (S/D) de una sustancia líquida biológica por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). El método comprende las etapas de cargar el líquido que comprende S/D a HIC, recoger la fracción sin unir y una fracción eluida bajo condiciones no isocráticas. Además, en otro aspecto, la invención se refiere a un método para eliminar solvente-detergente (S/D) de una sustancia líquida biológica por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). El método comprende las etapas de cargar el líquido que comprende S/D a HIC y recoger una fracción eluida bajo condiciones no isocráticas.

El término "sustancia líquida biológica" o "mezcla líquida biológica" se refieren a cualquier tipo de sustancia líquida obtenida de una fuente biológica. Esto incluye normalmente, pero no se limita a, preparaciones obtenidas de líquidos corporales tales como plasma sanguíneo completo o fracciones de la sangre, por ejemplo, plasma crioprecipitado, plasma o suero crioprecipitado; semen; esputo; heces; sudor; saliva; moco nasal; líquido cefalorraquídeo; una fracción derivada de plaquetas tal como PRP-R; y orina, además de líquidos obtenidos de cultivos celulares, que contienen sustancias biológicas secretadas por las células en la preparación, o que contienen sustancias que originalmente estaban presentes dentro de las células, y se liberaron a la preparación líquida debido a diversas manipulaciones tales como el lisado de las células.

En una realización, el método para eliminar S/D puede usarse durante un proceso para la inactivación viral de una preparación líquida biológica. Preparaciones líquidas biológicamente derivadas tales como preparaciones de sangre y plasma se usan como materiales de partida de los que pueden purificarse una pluralidad de compuestos biológicamente útiles. Ejemplos de tales compuestos incluyen inmunoglobulina, factor VIII, albúmina, anti-tripsina a1, factor IX, factor XI, PPSB, fibrinógeno y trombina (protrombina). Además, diversos productos biológicos tales como

hormonas, factores de crecimiento, enzimas y ligandos se aíslan de preparaciones biológicas obtenidas de cultivos celulares. Por ejemplo, el proceso de inactivación viral de una preparación líquida biológica comprende las etapas de:

- 5 (a) tratar la preparación líquida biológica con una combinación de solvente-detergente, a concentraciones y en condiciones que son suficientes para inactivar virus de envoltura lipídica;
- (b) eliminar la combinación de solvente-detergente de la preparación líquida pasando la preparación líquida obtenida en (a) sobre HIC; y
- 10 (c) recoger la fracción sin unir y una fracción eluida bajo condiciones no isocráticas. En otra realización, en la etapa (c) solo la fracción eluida bajo condiciones no isocráticas puede recogerse.

El uso de una disolución isocrática normalmente se refiere al uso de una fase móvil de composición constante en la cromatografía de líquidos. Una "disolución no isocrática" normalmente se refiere, por ejemplo, a una disolución y/o una condición que es diferente de la disolución y/o condición usada para cargar y/o lavar la columna y/o a una disolución que es diferente de una disolución usada en la etapa previa.

Con el fin de eliminar virus no envueltos, puede llevarse a cabo al menos una segunda etapa de inactivación viral, por ejemplo, un tratamiento térmico (pasteurización).

20 Puede obtenerse una reducción adicional en el contenido de agregados incluyendo en los métodos de la divulgación una etapa de suplementación de calcio seguido de filtración por clarificación.

El término "suplementación de calcio" se refiere a la adición de calcio, por ejemplo, una sal de calcio en el extracto/ sustancia líquida biológica. Ejemplos de sales de calcio incluyen, pero no se limitan a, carbonato cálcico, hidróxido de calcio, citrato de calcio, clorofosfato de calcio, fosfato de calcio que incluye fosfato de dicalcio y fosfato de tricalcio, cloruro de calcio o una combinación de los mismos. El calcio puede complementarse en un intervalo de concentración final de 1 a 100 mM. En una realización, el CaCl<sub>2</sub> se añade al extracto a una concentración final de 40 mM. El extracto puede incubarse durante 30 minutos, por ejemplo, a 25 °C mientras que se mezcla a 50 rpm tras la suplementación de calcio.

El término "filtración por clarificación" se refiere a la eliminación de partículas tales como agregados del extracto/sustancia líquida biológica por filtración. Puede llevarse a cabo una etapa de multi-filtración. Por ejemplo, el extracto puede filtrarse secuencialmente a través de filtros de 20, 3 y 0,45 µm. Puede llevarse a cabo esterilización por filtración, por ejemplo, por filtro de 0,2 µm.

35 Si se desea, el extracto de plaquetas obtenido por el método de la invención puede formularse con un crioprotector y liofilizarse.

término "crioprotector" se refiere a una sustancia que se añade a las disoluciones con el fin de retener la estabilidad química y/o actividad biológica de los componentes activos (por ejemplo, factores de crecimiento y/o factores tróficos) durante la congelación. Ejemplos no limitantes de crioprotector incluyen, pero no se limitan a, hidratos de carbono tales como monosacáridos: incluyen glucosa (dextrosa), fructosa (levulosa), galactosa y disacáridos de ribosa. Disacáridos: sacarosa, lactosa, maltosa y trehalosa y Disacáridos oligosacáridos otro grupo son los polioles Alcoholes de azúcar: maltitol, manitol, sorbitol, xilitol e isomalt. Aparte de los hidratos de carbono también pueden usarse otros polímeros tales como polietilenglicol (PEG) como crioprotectores tales como poli(óxido de etileno) (PEO) o polioxi-etileno (POE) Polivinilpirrolidona (PVP). Otros aminoácidos y poliaminas.

El término "liofilización" normalmente se refiere al proceso de congelación de una sustancia y luego reducción de la concentración de agua, por ejemplo, por sublimación a niveles que no soportan las reacciones biológicas o químicas. El material biológico liofilizado resultante puede almacenarse durante un periodo de tiempo relativamente largo. Tras el almacenamiento, el material liofilizado puede usarse como un polvo o puede reconstituirse mediante la adición de diversos volúmenes de una disolución acuosa. El volumen añadido durante la reconstitución puede ser similar al volumen de la disolución antes de la liofilización, menor (produciendo una concentración del extracto en comparación con el volumen del material de partida) o mayor (produciendo una dilución del extracto en comparación con el volumen del material de partida). Si se desea, el extracto de plaquetas puede mantenerse congelado o como un sólido, por ejemplo, liofilizado para el almacenamiento prolongado o para su uso como un polvo.

60 Por ejemplo, el extracto de plaquetas obtenido por el método de la invención puede mantenerse congelado, por ejemplo, a -18 °C o a menor temperatura, o como un sólido (por ejemplo, liofilizado) para almacenamiento prolongado. El extracto de plaquetas también puede refrigerarse, por ejemplo, a una temperatura de 2 °C a 8 °C.

El extracto liofilizado puede usarse como un sólido o puede reconstituirse en un vehículo farmacéuticamente aceptable antes de uso. El término un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier diluyente y/o un vehículo que es adecuado para administración humana o para administración animal. El

vehículo puede seleccionarse de cualquiera de los vehículos conocidos en la técnica tales como, pero no se limitan a, solución salina, disolución de cloruro sódico, Ringer con lactato (LR), 5 % de dextrosa en solución salina normal y agua para inyección.

5 Si se administra con sellante de fibrina, el extracto puede reconstituirse en uno de los componentes del sellante (trombina o fibrinógeno) o puede reconstituirse por separado en otro diluyente o vehículo.

10 Ventajosamente, el ciclo de liofilización y la formulación pueden permitir una reconstitución muy rápida del extracto, por ejemplo, dentro de sellante de fibrina, por ejemplo, para facilitar la hemostasia y curación que requiere un uso de emergencia, así en este caso la reconstitución se hace beneficiosamente en el plazo de segundos. En una realización de la invención se usa albúmina en la formulación para permitir la rápida reconstitución.

15 La invención se basa en los siguiente experimentos y hallazgos que ejemplifican la preparación del extracto de plaquetas según la invención, y muestran su actividad (en entornos *in vitro* e *in vivo*).

Los siguientes ejemplos son ilustrativos, pero no limitantes.

## EJEMPLOS

### 20 Materiales y métodos

Preparación de plaquetas de aféresis lavadas (WAP) reducidas en leucocitos.

25 Se recogieron unidades de material de plaquetas (unidades reducidas en leucocitos de plaquetas de aféresis) y se procesaron según la "Circular de información para el uso de sangre humana y componentes sanguíneos" (Dic 2009) y conforme a condiciones federales aplicables y normas de la FDA y el Departamento Estadounidense de Salud.

30 Cada unidad tuvo un volumen de aproximadamente 200 ml. Cada unidad se extrajo de un único donante que se cribó y se encontró aceptable para la donación de un componente de sangre transfundible basándose en las normas, requisitos y pautas de la FDA. Solo se incluyeron unidades que se encontraron no reactivas para anticuerpos de glóbulos rojos y negativas para los siguientes virus usando kits y métodos autorizados por la FDA: antígeno de superficie del virus de la hepatitis B; anticuerpo para el antígeno del núcleo del virus de la hepatitis B; anticuerpo para el virus de la hepatitis C; anticuerpo para el virus linfotrópico de linfocitos T humanos tipo 1 y 2; anticuerpo para el virus de la inmunodeficiencia humana tipos 1 y 2; VIH-1 por la prueba de tecnología para ácidos nucleicos (NAT); ARN del VHC por NAT; ARN del virus del Nilo Occidental por NAT; y pruebas serológicas para sífilis. El número mínimo de plaquetas en una unidad recogida reducida en leucocitos de aféresis fue como se especifica en la Circular de información:  $3,0 \times 10^{11}$  (el número de plaquetas en una única unidad de sangre completa es  $\geq 5,5 \times 10^{10}$ ).

40 Todas las unidades se mantuvieron bajo las condiciones recomendadas para la transfusión (véase la indicación de uso para el sistema de extracción, procesamiento y almacenamiento de sangre autorizado por la FDA) hasta la etapa de lavado.

45 Procedimiento de lavado.

Cada unidad se lavó bajo condiciones asépticas del siguiente modo:

- 50 1. Cada unidad se centrifugó a  $4658 \times g$  durante 6 minutos (no se usó rotor de rotura) a temperatura ambiente. Bajo estas condiciones suaves se evitó la rotura de las células.
2. El sobrenadante se desechó y el sedimento de plaquetas se reconstituyó en 200 ml de solución salina acoplada estéril (una forma de transferir líquidos entre recipientes en un sistema cerrado para mantener condiciones asépticas).
- 55 3. Se llevó a cabo una segunda centrifugación en las mismas condiciones especificadas en la etapa 1.
4. Se desechó la solución salina y las plaquetas sedimentadas se resuspendieron en 200 ml de solución salina acoplada estéril.
5. Las plaquetas lavadas y resuspendidas se congelaron a  $-20$  a  $-30$  °C. La etapa de congelación se llevó a cabo en el plazo de 4 horas desde la etapa previa.

60 Los procedimientos de recogida y de lavado anteriormente desarrollados de la unidad de aféresis de plaquetas reducidas en leucocitos se llevaron a cabo en un centro de extracción de sangre (Rock River Valley Blood Center, Rockford, IL/FDA License nº 249). Las bolsas de WAP finales se suministraron para los experimentos en el plazo de dos meses desde la fecha de preparación. Las unidades se recibieron congeladas sobre nieve carbónica.

65 **Ejemplo 1: Extracto de plaquetas liofilizado preparado a partir de mezcla de WAP y tratado con solvente /**

**detergente (S/D).**

Se descongelaron nueve bolsas de WAP (conteniendo cada bolsa aproximadamente 200 ml) colocando las bolsas en un baño de agua a 37 °C durante 30 min. En la siguiente etapa, las bolsas de WAP se limpiaron con 70 % de etanol, se abrieron cortando y su contenido se vertió en un vaso de precipitados de acero inoxidable a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C). El vaso de precipitados se colocó sobre un dispositivo de agitación y el material de mezcla de WAP (~1800 ml) se mezcló lentamente durante 5 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C). Durante la agitación se añadieron 200 ml de tampón de acetato-glicina [acetato sódico 200 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.; Cat. número 32318); y glicina 100 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.; Cat. número 15527) a pH 6,8-7,4] y albúmina de suero humano (HSA; a una concentración final de 5 % en v/v del volumen total) (Plasbumin 25, Talecris Biotherapeutics, NC, EE.UU.; Cat. número Plasbumin 25) a la mezcla de WAP. Se sacó una muestra de 500 ml (de los 2000 ml) y se trató con solvente y detergente (S/D) para inactivar los virus de envoltura lipídica (véase el procedimiento más adelante). El resto (1500 ml) se congeló a -80 °C para el análisis posterior ("mezcla de WAP"). La muestra de 500 ml se transfirió a un vaso de precipitados de acero inoxidable enfriado (4 °C) y se dispuso en un baño de agua a 4 °C. La muestra se sometió a tratamiento con S/D del siguiente modo: se mezclaron juntos 1 % de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.; Cat. número 20180501) y 0,3 % de fosfato de tri(n-butilo) (TnBP; Merck Cat. número 100002) (v/v) y luego se añadieron lentamente a la muestra mientras se agitaba a 60 rpm usando un agitador de acero inoxidable de 3 palas conectado a un agitador superior RW20 (IKA-Werke GmbH & Co., Staufen, Alemania). A continuación, la muestra se agitó continuamente durante 4 horas a 4 °C. Después del tratamiento con S/D, la muestra se filtró secuencialmente a través de filtros de cápsula de polipropileno de 20, 10 y 5 µm (tipo DOL, MDI Advanced Microdevices Pvt. Ltd., Ambala, India; Cat. número DOLX5111DDXX101, DOLX5108DDXX101, DOLX5107DDXX101, respectivamente) con el fin de eliminar residuos de partículas macroscópicas antes de la etapa de eliminación de S/D.

La eliminación de S/D se llevó a cabo usando columna de cromatografía de líquidos XK26/40 (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare; Cat. número 18-8768-01) rellena de 80 ml de resina de cromatografía de eliminación de solvente-detergente SDR HyperD (Pall Corp, Port Washington, NY, EE.UU.; Cat. número 20033-015) conjuntamente con el sistema de cromatografía de líquidos automatizado ÄKTAprime (GE Healthcare). La longitud de la columna fue 15 cm. La velocidad de flujo a lo largo de la realización fue 10 ml/min. La columna se preparó con 320 ml de agua destilada doble (ddH<sub>2</sub>O) y se equilibró por 240 ml de tampón de acetato-glicina (acetato sódico 20 mM, glicina 10 mM a pH 6,8-7,4) y HSA (5 % en v/v del volumen total). Después de cargar la muestra (500 ml), la columna se lavó con 144 ml de tampón de acetato-glicina (como antes) que contenía 5 % de HSA en v/v, seguido de 144 ml de ddH<sub>2</sub>O. El volumen de flujo a través total recogido que incluyó muestra sin unir y tampón de lavado fue 720 ml. Se añadió D-manitol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.; Cat número M9546) en tampón de acetato-glicina (como antes) al material recogido del flujo a través (a una concentración final de 2 % v/v) y sirvió de crioprotector de proteínas durante el siguiente proceso de liofilización. El congelar y descongelar WAP y someter el WAP a tratamiento con S/D y la eliminación de S/D produjo una preparación de extracto/lisado de plaquetas.

El material recogido del flujo a través se tomó en alícuotas en viales de vidrio esterilizados en autoclave (Fiolax Clear 40 x 22 x 1 mm, Schott, Müllheim, Alemania) (2 ml en cada vial) y se liofilizó (liofilizador Epsilon 2-8D, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Alemania) según el ciclo elaborado en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Ciclo de liofilización.

Paso no. 01	Fase del proceso Valores de partida	Tiempo(h:m)	Temp (°C)	Vacío (mBar)
		00:00	4	OFF
	02 Congelación	01:00	-30	OFF
	03 Congelación	01:00	-50	OFF
	04 Congelación	05:40	-50	OFF
	05 Preparación	00:20	-45	Off
	06 Sublimación	00:15	-40	0.200
	07 Sublimación	00:15	-25	0.200
	08 Sublimación	25:00	-25	0.200
	09 Sublimación	01:00	-15	0.200
	10 Sublimación	12:00	-15	0.200
	11 Sublimación	02:00	20	0.200
	12 Sublimación	05:00	20	0.200
	13 Secado Secundario	00:30	25	0.012
	14 Secado Secundario	18:00	25	0.012

El material liofilizado se selló con tapones de caucho esterilizados en autoclave (silicona 20 mm, West Pharmaceutical Services, Lionville, PA, EE.UU.; Cat. número 7001-2742) bajo atmósfera de nitrógeno y a vacío parcial (0,6 bar). El extracto de plaquetas liofilizado preparado a partir de mezcla de WAP, tratado con S/D y resina

de cromatografía SDR HyperD se denomina en el presente documento “LYO I”.

La etapa de purificación en LYO I incluyó una única etapa de inactivación viral de tratamiento con S/D.

### 5 **Ejemplo 2: Caracterización del perfil de proteínas de diferentes preparaciones de extractos de plaquetas.**

El siguiente experimento tuvo como objetivo caracterizar el perfil de proteínas de plaquetas de aféresis reducidas en leucocitos lavadas [material de WAP sin ningún tratamiento (obtenido del centro de extracción de sangre estadounidense mencionado antes) en comparación con plaquetas lavadas de sangre completa (obtenidas del Banco de sangre MDA)]; y para examinar si el tratamiento con S/D o el tratamiento con S/D + purificación en resina de cromatografía SDR HyperD afecta el perfil de proteínas de WAP. El tratamiento con S/D y purificación en resina de cromatografía SDR HyperD se llevaron a cabo como se ha desarrollado anteriormente. En todos los casos se obtuvieron extractos por congelación y descongelación de las plaquetas y, si se indica, por tratamiento con S/D. El análisis del perfil de proteínas se llevó a cabo por electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE). La cantidad de proteína de cada preparación probada se especifica a continuación. La cantidad de proteína total se determinó usando el ensayo Pierce BCA Protein (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, EE.UU.; Cat. número 23235) según las instrucciones del fabricante. El procedimiento de SDS-PAGE se llevó a cabo del siguiente modo: las preparaciones se cargaron sobre un gel de 4-12 % de Tris-glicina de 1,5 mm x 10 pocillos (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.; Cat. número EC6038BOX) con tampón de electroforesis de Tris-glicina (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.; Cat número 161-0772). Las condiciones de electroforesis usadas fueron corriente constante de 25 mA durante 1,5 horas usando la fuente de alimentación PowerPack 300 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). Después de la etapa de electroforesis, el gel se tiñó durante la noche a 2-8 °C usando disolución de tinción basada en InstantBlue Coomassie según las instrucciones del fabricante (Expedeon Inc., San Diego, CA, EE.UU.; Cat número ISB01L). La Fig. 1 muestra el perfil de proteínas de las diferentes preparaciones.

Los resultados muestran que las plaquetas de aféresis reducidas en leucocitos lavadas (WAP; carril 4) contienen cantidades muy pequeñas de albúmina con respecto a plaquetas lavadas obtenidas de la donación de sangre completa (carril 3). Los patrones de bandas de WAP después del tratamiento con S/D (carril 5) y después del tratamiento con S/D + purificación en resina de cromatografía SDR HyperD (carril 6) fueron similares a los del material de partida (es decir, WAP; carril 4).

Estos resultados indican que la composición de proteínas no se afecta significativamente durante las etapas de procesamiento anteriormente mencionadas.

### 35 **Ejemplo 3: El efecto de LYO I sobre la proliferación celular y sobre la morfología de las células.**

El siguiente experimento se llevó a cabo para examinar el efecto biológico de LYO I (un extracto de plaquetas liofilizado preparado a partir de mezcla de WAP, tratado con S/D, sometido a resina de cromatografía SDR HyperD y liofilizado – preparado como se ha desarrollado en el Ejemplo 1) sobre la proliferación celular de fibroblastos. El efecto de LYO I sobre la proliferación celular se comparó con el efecto de WAP.

Ensayo de proliferación celular.

Para este fin, se sembraron células de fibroblastos albinos 3T3-Swiss (ATCC, Cat número CCL92) a una concentración de  $25 \times 10^3$  células/ml (2500 células/pocillo) en placas de 96 pocillos Costar tratadas con cultivo de tejido (Corning Life Science, MA EE.UU.) en 100 µl de medio de crecimiento completo [DMEM (Biological Industries, Israel; Cat. número 01-055-1A) que contenía 4,5 g/l de glucosa y complementado con glutamina 4 mM (Biological Industries, Israel; Cat. número 03-020-1B), 10 % de suero de ternero fetal (FCS; HyClone, EE.UU.; Cat. número SH30070,03), disolución de penicilina (100 U/ml)/ estreptomina (0,1 mg/ml)/ anfotericina (0,25 µg/ml) (P/S/A; Biological Industries, Israel; Cat. número 03-033-1B)]. Las células sembradas se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO<sub>2</sub>. 24 horas después de la siembra de las células, se desechó el medio de crecimiento completo, los pocillos se lavaron dos veces con 100 µl de medio de inanición y se añadieron 100 µl de medio de inanición fresco a cada pocillo [medio de inanición: DMEM que contiene 4,5 g/l de glucosa complementado con glutamina 4 mM, 1 % de aminoácidos no esenciales MEM-EAGLE (Biological Industries, Israel; Cat. número 01-340-1B, 1 % de albúmina de suero humano (Plasbumin 25, Talecris Biotherapeutics, Alemania) y P/S/A (en las concentraciones enumeradas anteriormente)]. La proliferación se indujo 24 horas después de la sustitución del medio añadiendo “mezcla de WAP” (véase la preparación anteriormente) o “LYO I” reconstituido. LYO I se reconstituyó en 0,4 ml de medio de inanición (5 veces concentrado en comparación con el material antes de la liofilización). Se determinaron cantidades de proteína total usando el ensayo Pierce BCA Protein (véase el Ejemplo 2). Se detectaron concentraciones de varios factores de crecimiento en tanto WAP I como LYO I por ELISA (Quantikine por R&D Systems, MN EE.UU.: TGF-β1 humano cat DB100B, FGF básico humano cat HSF000D, PDGF-AB humano cat DHD00B, EGF humano cat DEG00) y las cantidades presentes en los pocillos durante el ensayo de proliferación son las siguientes: TGF-β1 - 205 y 350 ng/ml; bFGF - 260 y 265 pg/ml; PDGF-AB - 75 y 7 ng/ml; y EGF - 3 y 3 ng/ml en pocillos tratados con WAP I y LYO I, respectivamente.

La proliferación se evaluó 48 horas después de la adición de WAP o LYO I usando el reactivo de proliferación celular WST-1 según las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania; Cat. número 11-644-807) que cuantifica la proliferación celular y viabilidad celular basadas en la actividad de mitocondrias. La placa se incubó durante 2 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO<sub>2</sub> y a continuación se agitó durante 1 min. La absorbancia de las muestras se midió a 450 nm contra un control de fondo (medio de inanición sin células) como blanco usando un lector de ELISA. Los valores de referencia obtenidos a 650 nm se restaron de cada valor.

La tasa de proliferación de células 3T3 tratadas con “mezcla de WAP” o “LYO” se muestra en la Fig. 2. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Las células cultivadas en medio de inanición (marcado como “0”) se usaron como control [\*\*\* -  $p < 0,001$  (análisis de la prueba de la t, comparando con “0”).

Los resultados muestran que la tasa de proliferación celular se potenció significativamente mediante la adición de WAP y LYO I en comparación con control (marcado como 0).

#### Morfología celular.

Se monitorizó el efecto de LYO I sobre la morfología de células con dos tipos de líneas celulares diferentes: Células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC; Lonza Switzerland; Cat. número C2519A) que son citoblastos endoteliales de origen recién nacido; y células de fibroblastos albinos 3T3-Swiss. Bajo ciertas condiciones, por ejemplo, durante el proceso de cicatrización, células de fibroblasto adquieren formas fusiformes. Estas formas son un atributo de la elevada motilidad de los fibroblastos (Park et al. Comparative study on motility of the cultured fetal and neonatal dermal fibroblasts in extracellular matrix. *Yonsei Med J.* 2001 Dec;42(6):587-94; Nagano et al. PDGF regulates the actin cytoskeleton through hnRNP-K-mediated activation of the ubiquitin E3-ligase MIR. *EMBO J.* 2006 May 3;25(9):1871-82). HUVEC, que se usan frecuentemente para evaluar la inducción de angiogénesis por diferentes sustancias, forman estructuras tipo vaso (Arnaoutova I, Kleinman HK. In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nat Protoc.* 2010;5(4):628-35). Estos cambios morfológicos están asociados a la angiogénesis.

Para monitorizar el efecto de LYO I sobre la morfología de células, se sembraron células HUVEC o albinas 3T3-Swiss a una concentración de  $25 \times 10^3$  células/ml (2500 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos en 100 µl de medio de crecimiento completo [para HUVEC: medio 200 (Gibco Invitrogen, CA EE.UU.; Cat. número M200500) complementado con suplemento de crecimiento bajo en suero (LSGS; Gibco Invitrogen, CA EE.UU.; Cat. número S00310) y disolución de P/S/A (en la concentración mencionada anteriormente); para células albinas 3T3-Swiss: como se enumera en el experimento precedente]. 24 horas después de la siembra de células, se desechó el medio de crecimiento completo, cada pocillo se lavó dos veces con 100 µl de medio de inanición y se añadieron 100 µl de medio de inanición fresco [para HUVEC: medio 200 complementado con 2 % de FCS y P/S/A (misma concentración que antes); para 3T3: como se enumera en el experimento precedente]. 24 horas después del cambio a medio de inanición, se añadió LYO I reconstituido (20 mg/ml de proteína total en pocillo; la reconstitución se llevó a cabo en 0,4 ml de medio de inanición apropiado para cada célula) a los pocillos. Las concentraciones de TGF-β, bFGF, PDGF-AB y EGF en los pocillos son las mismas que en el ensayo de proliferación.

En algunas muestras de HUVEC se llevaron a cabo tratamientos adicionales: en algunas muestras la adición de 2 UI/ml de trombina (concentración final en el pocillo) (una disolución como en el componente de trombina del sellante de fibrina EVICEL™, Omrix Biopharmaceuticals Ltd.); en algunas muestras la adición de componente de fibrinógeno diluido 1:16 (dilución final en el pocillo; el componente de fibrinógeno usado fue el componente BAC del sellante de fibrina EVICEL™); en otras muestras LYO I + 2 UI/ml de trombina (concentración final en el pocillo); y LYO I + componente de fibrinógeno diluido (1:16). Todas las diluciones se llevaron a cabo en medio de inanición. Células sin tratar cultivadas en medio de inanición se usaron como control.

La morfología de las células se evaluó microscópicamente 48 horas (3T3; Fig. 3) o 72 horas (HUVEC, Fig. 4) después de los diferentes tratamientos. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado.

Los resultados muestran que las células albinas 3T3-Swiss sin tratar (Fig. 3A) poseyeron forma tipo cometa diamante (véanse las flechas rayadas). La adición de LYO I (Fig. 3B) produjo la formación de estructuras fusiformes (flechas continuas).

Células sin tratar HUVEC y células tratadas con trombina (Fig. 4A y C, respectivamente) poseyeron formas tipo diamante (flechas rayadas) mientras que la adición de LYO I (Fig. 4B) indujo la formación de estructuras tipo vaso (flechas continuas). Además, el tratamiento de células HUVEC con LYO I y trombina (Fig. 4D) o LYO I y BAC (Fig. 4F) produjo una elevada formación de estructuras tipo vaso en comparación con los otros grupos de tratamiento. El tratamiento con BAC solo (Fig. 4E) produjo un menor efecto (se formaron algunas estructuras tipo vaso).

**Ejemplo 4: Extracto de plaquetas liofilizado preparado a partir de mezcla de WAP, tratado con S/D, pasteurizado y esterilizado por filtración.**

Los productos derivados de la sangre humana pueden llevar el riesgo de transmitir agentes infecciosos tales como virus. Normalmente se toman varias medidas con el fin de minimizar el riesgo de la transmisión de patógenos virales y/o desconocidos que incluyen pruebas rutinarias de muestras donadas para la presencia de ciertos virus, y etapas de inactivación/eliminación viral durante el proceso de fabricación. La reducción eficaz del riesgo de transmisión viral puede lograrse incluyendo al menos dos etapas de inactivación viral ortogonal que no alteran las beneficiosas propiedades del producto. Los virus de envoltura lipídica tales como VIH, virus de la hepatitis B, hepatitis C y del Nilo Occidental se inactivan rápida y eficazmente por el tratamiento con S/D que destruye la membrana lipídica de los virus.

La pasteurización es un proceso por el que el calor destruye tanto virus con envoltura lipídica como no envueltos. La nanofiltración es un proceso por el que virus con envoltura lipídica y no envueltos se excluyen de la muestra usando filtros de escala nanométrica especiales.

En los siguientes ejemplos se evaluó la capacidad de uso de la pasteurización como segunda etapa de inactivación viral.

Se preparó una mezcla de material de WAP y se trató con S/D como se ha desarrollado en el Ejemplo 1, excepto que: 1) Se usaron tres bolsas de WAP (un volumen total de 600 ml). 2) Se sacó una muestra de 430 ml y se trató con S/D y los 170 ml restantes se congelaron a -80 °C para el análisis posterior ("mezcla de WAP II"). 3) Se añadió HSA a la muestra a una concentración final de 1 % en v/v (y no 5 % de HSA como en LYO I). 4) La muestra de 500 ml [430 ml de muestra + 70 ml de tampón de acetato-glicina (acetato sódico 200 mM; y glicina 100 mM)] se transfirió a un vaso de precipitados de acero inoxidable y se dispuso en un baño de agua fijado a 25 °C (no 4 °C como en el Ejemplo 1). 5) Tras la adición de Triton X-100 y TnBP la muestra se agitó continuamente durante 2 horas a 25 °C (se añadieron Triton X-100 y TnBP durante un periodo de tiempo más corto en este experimento, 2 horas frente a 4 horas en el Ejemplo 1 ya que el tratamiento con S/D se llevó a cabo a una mayor temperatura de 25 °C frente a 4 °C en el Ejemplo 1). 6) La eliminación de S/D se realizó usando columna de cromatografía de líquidos XK26/40 rellena de 80 ml de resina de cromatografía de eliminación de solvente-detergente SDR HyperD conjuntamente con una bomba peristáltica BT300-2J (MRC, Israel) y un detector de UV/VIS UA-6 + grabadora tipo 11 (ISCO, NE, EE.UU.) a una velocidad de flujo constante de 10 ml/min. La columna se preparó con 320 ml de ddH<sub>2</sub>O, seguido de equilibración con 240 ml de tampón de acetato-glicina (acetato sódico 20 mM, glicina 10 mM a pH 6,8-7,4) que contenía 1 % de HSA v/v (no 5 %). 7) Después de cargar la muestra (450 ml), la columna se lavó con 144 ml de tampón de acetato-glicina (acetato sódico 20 mM, glicina 10 mM, pH 6,8-7,4 + 1 % de HSA v/v, seguido de 144 ml de ddH<sub>2</sub>O. 8) No se añadió D-manitol en el material de flujo a través. A continuación, el material de flujo a través tratado con S/D (es decir, fracción sin unir y tampón de lavado) (610 ml) se sometió a una etapa de estabilización y pasteurización del siguiente modo: se añadió lentamente un gramo de sacarosa por gramo de muestra de flujo a través en el material de flujo a través mientras que se mezclaba (a aproximadamente 22 °C) hasta que la sacarosa se disolvió completamente. Entonces, la disolución se calentó hasta 37±1 °C y se añadieron lentamente 0,11 g de glicina por g de material de flujo a través a la disolución mientras que se mezclaba y se ajustaba el pH a 6,8-7,4 usando NaOH 0,5 N. El ajuste del pH se llevó a cabo hasta que la glicina se había disuelto completamente. Esto fue seguido de una adición gradual de 0,8 g de sacarosa por g de material de flujo a través mientras que se mezclaba a 37 °C hasta que se disolvió completamente. Se añadieron sacarosa y glicina a la disolución para servir de estabilizadores durante la etapa de pasteurización. A continuación, la disolución se pasteurizó por tratamiento térmico a 60 °C durante 10 horas con mezcla constante (50 rpm). Con el fin de transferir la disolución viscosa resultante (que se formó como resultado de la adición de estabilizadores) a un recipiente limpio, se diluyó con tampón de acetato-glicina (acetato sódico 20 mM y glicina 10 mM a pH 6,8-7,4) hasta un volumen total de 1830 ml. Los estabilizadores se eliminaron de la disolución por diafiltración contra tampón de acetato-glicina (acetato sódico 20 mM, glicina 10 mM, pH 6,8-7,4) usando el sistema de ultrafiltración Filtron con 2 casetes de 10 kDa Omega Minisette (Pall Corp, Port Washington, NY, EE.UU.). La etapa de diafiltración se llevó a cabo del siguiente modo: la muestra se concentró primero a un volumen de 900 ml, y la diálisis se llevó a cabo contra un volumen total de 5.400 ml de tampón de acetato-glicina (acetato sódico 20 mM, glicina 10 mM, pH 6,8-7,4) por una adición gradual del tampón y manteniendo el volumen de disolución a 900 ± 100 ml. A continuación, la disolución dializada se concentró a 400 ml.

Con el fin de eliminar material agregado, la disolución se filtró secuencialmente a través de filtros Sartopure PP2 de 5 y 1,2 µm (Cat. Números 5591342P5, 5591303P5), seguido de filtro Sartopure 2 de 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne, Francia; Cat. Número 5441306 g5). La esterilización por filtración se llevó a cabo bajo condiciones asépticas (dentro de un armario estéril biológico) usando un filtro Sartopure 2 de 0,2 µm (Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne, Francia; Cat. Número 5441307H5). A continuación, la disolución se tomó en alícuotas (4 ml) en viales de vidrio esterilizados en autoclave, se liofilizaron y se sellaron con tapones de caucho esterilizados en autoclave bajo atmósfera de nitrógeno y en vacío parcial (0,6 bar) como se indica en el Ejemplo 1. El extracto de plaquetas liofilizado preparado anteriormente se denomina en el presente documento "LYO II".

La preparación de LYO II incluyó tratamiento con S/D, una etapa de pasteurización y esterilización por filtración final a través de 0,2 µm.

**Ejemplo 5: El efecto de LYO II sobre la proliferación celular y sobre la morfología celular.**

El siguiente experimento tuvo como objetivo determinar el efecto de LYO II (un extracto de plaquetas liofilizado preparado a partir de mezcla de WAP, tratado con S/D, sometido a resina de cromatografía SDR HyperD, pasteurizado, esterilizado por filtración y liofilizado) sobre la proliferación celular. Se llevaron a cabo concentraciones de siembra de células y sustitución de medio de crecimiento completo como en el Ejemplo 3 en dos líneas celulares diferentes: HUVEC y albinas 3T3-Swiss (se usaron el medio de crecimiento completo compatible y el medio de inianición para cada tipo de célula; véanse los componentes del medio anteriormente; 2500 células por pocillo en 100 µl de medio).

En células albinas 3T3-Swiss, la proliferación se indujo 24 horas después de la sustitución del medio mediante la adición de mezcla de WAP II o LYO II reconstituido (el LYO II, que se liofilizó a partir de una disolución de 4 ml, se reconstituyó en 0,5 ml de agua estéril purificada 8 veces concentrada en comparación con mezcla de WAP II). Tras la reconstitución de LYO II, tanto LYO II como la mezcla de WAP II se diluyeron sucesivamente 5 veces en el medio de inianición compatible (la concentración de mezcla de partida de WAP II se designó 1 y por consiguiente se usaron concentraciones relativas de 1, 0,2, 0,04, 0,008, 0,0016, 0,00032; la concentración de partida de LYO II se designó 8 (esta concentración no se probó en este experimento) y por consiguiente se usaron concentraciones relativas de 1,6, 0,32, 0,064, 0,0128, 0,00256). Se añadieron 10 µl de cada dilución en el pocillo (concentración de siembra inicial de 2500 células; y 100 µl de medio). Las concentraciones de varios factores de crecimiento en tanto WAP II como LYO II se detectaron por ELISA (Quantikine por R&D Systems, MN EE.UU.: PDGF-AB humano cat DHD00B, VEGF humano cat DVE00) y las concentraciones actuales que estaban presentes en los pocillos (a la mayor concentración) durante el ensayo de proliferación son las siguientes: bFGF - 120 y 280 pg/ml; VEGF - 0,75 y 2,7 ng/ml; y PDGF-AB - 80 y 36 ng/ml en pocillos tratados con WAP II y LYO II, respectivamente.

El nivel de proliferación de células albinas 3T3-Swiss se evaluó 48 horas después usando el reactivo de proliferación celular WST-1. La placa se incubó durante 4 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO<sub>2</sub>. Al final del periodo de incubación, la placa se agitó durante 1 min y la absorbancia de las muestras se midió como se ha desarrollado en el Ejemplo 3. Los valores de DO obtenidos para las células sin tratar se restaron de los resultados de DO obtenidos y los valores calculados se representaron como una curva de dosis-respuesta sigmoideal. Los valores del ajuste de R<sup>2</sup> y la mediana de la concentración eficaz (EC<sub>50</sub>) se calcularon usando el software GraphPad Prism. El efecto proliferativo de LYO II o mezcla de WAP II sobre células de fibroblastos albinos 3T3-Swiss se muestran en la Fig. 5. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

Los resultados muestran que el efecto proliferativo de LYO II sobre albinas 3T3-Swiss es similar a aquel del material de partida (mezcla de WAP II). Estos resultados demuestran que el proceso de producción de LYO II, que incluyó la etapa de inactivación viral doble, no afecta su potencia en comparación con el material de partida de WAP, por ejemplo, los valores de CE<sub>50</sub> fueron 0,018 y 0,013 para la mezcla de WAP II y LYO II, respectivamente.

Para HUVEC, la proliferación se indujo 24 horas después de la sustitución del medio por diferentes tratamientos: adición de trombina (T; 1 UI/ml de concentración final en el pocillo; un componente de trombina del sellante de fibrina EVICEL™, Omrix Biopharmaceuticals Ltd.) con o sin LYO II reconstituido; y adición de LYO II reconstituido. Las células sin tratar se usaron como referencia (marcado como 0). Se añadieron 10 µl de cada tratamiento de disolución a cada pocillo

La reconstitución de LYO II, que se liofilizó a partir de una disolución de 4 ml, se llevó a cabo en 0,5 ml de agua purificada estéril 8 veces concentrada.

Las concentraciones de bFGF, VEGF y PDGF-AB fueron como en el ensayo de proliferación llevado a cabo en las células 3T3.

Se llevaron a cabo mediciones del nivel de proliferación 72 horas después del inicio del tratamiento por el reactivo de proliferación celular WST-1. Al final del periodo de incubación (4 horas), las placas se agitaron durante 1 min y la absorbancia de las muestras se midió como se indica anteriormente. Las mediciones se llevaron a cabo por duplicado. Se tiñó un tercer duplicado con calceína AM con el fin de explorar la potencia angiogénica de LYO II (véanse los resultados debajo de "Formación de estructuras tipo vaso en HUVEC"). La proliferación de la tasa de HUVEC tras la inducción con LYO II, trombina y trombina + LYO II se muestra en la Fig. 6.

Los resultados muestran que la adición de LYO II a HUVEC produjo una proliferación significativamente mayor en comparación con las células de control ("0" sin LYO II) o con las células tratadas con trombina sola. La adición de LYO II + trombina (T) produjo una actividad proliferativa más pronunciada en comparación con la adición de LYO II solo.

Formación de estructuras tipo vaso en HUVEC.

Se llevó a cabo el siguiente experimento como control positivo para observar las estructuras tipo vaso adquiridas por HUVEC cuando se cultivan sobre un recubrimiento de extracto de la membrana basal (BME) en medio de inanición HUVEC. BME tiene una función esencial en la organización de tejido que afecta la adhesión, migración, proliferación y diferenciación y el cultivo de células (Mehta VB, Besner GE. HB-EGF promotes angiogenesis in endothelial cells via PI3-kinase and MAPK signaling pathways. *Growth Factors*. 2007 Aug;25(4):253-63; Arnaoutova I, Kleinman HK. 2010). Se usaron células cultivadas sobre pocillos recubiertos de colágeno en medio de inanición de HUVEC como control negativo.

Para obtener las imágenes de control positivo, células HUVEC se sembraron a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ml (10000 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos en 100  $\mu$ l de medio de crecimiento completo de HUVEC (como se ha enumerado anteriormente). Las células sembradas se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO<sub>2</sub>. 24 horas después se desechó el medio de crecimiento completo y se añadieron 100  $\mu$ l de medio de inanición fresco a cada pocillo (véanse los componentes del medio del Ejemplo 3 anteriormente). Antes de la siembra de células, los pocillos se recubrieron con 50  $\mu$ l/pocillo de factores de crecimiento reducidos en extracto de la membrana basal (BME; Cultrex, Trevigen Inc., MD, EE.UU.; Cat. Número 3433-005-001) según el protocolo del fabricante o con 50  $\mu$ l/pocillo de colágeno I bovino en una concentración de 3 mg/ml (Invitrogen, CA, EE.UU., Cat. Número A10644-01 preparado según el protocolo del fabricante para procedimientos de gelificación).

Después de un periodo de incubación de 24 horas, las células se tiñeron añadiendo 5  $\mu$ M durante 30 min a 37 °C y se tomó una imagen representativa usando microscopio Axiovert 200 (a 100x aumentos) y un filtro de fluorescencia para 530 nm (Carl Zeiss MicroImaging, NY, EE.UU.). La calceína AM es un colorante fluorescente que se usa en biología para probar la viabilidad celular y para el marcado a corto plazo de células - después del transporte en las células, esterases intracelulares (presentes en células viables) eliminan el grupo acetometoxi, la molécula queda atrapada dentro y da una fuerte fluorescencia verde. Como las células muertas carecen de esterases activas, solo se marcan las células vivas. Los resultados se presentan en la Fig. 7. Los resultados muestran que se detectaron pronunciadas estructuras tubulares que reflejan el potencial de angiogénesis sobre las superficies recubiertas con BME. No se observó tubulogénesis sobre recubrimientos de colágeno (datos no mostrados).

Con el fin de explotar la capacidad de LYO II para inducir angiogénesis, el tercer duplicado del experimento previo (experimento de proliferación celular en el Ejemplo 5) se tiñó con calceína AM 5  $\mu$ M como antes y se tomaron imágenes representativas usando el microscopio Axiovert 200 (200x aumentos) y un filtro de fluorescencia para 530 nm. Las estructuras tipo vaso adquiridas por HUVEC tras el tratamiento con LYO II se muestran en la Fig. 8.

Puede observarse que la adición de LYO II reconstituido (8B) produjo el inicio de la formación de estructuras tubulares similares al tratamiento de control positivo (HUVEC sembradas sobre recubrimiento de BME; Fig. 7).

Para explorar la capacidad de LYO II para inducir cambios de la morfología celular que pudieran correlacionarse con la motilidad celular inducida, se llevó a cabo un experimento en células albinas 3T3-Swiss en condiciones similares como en el ensayo de proliferación celular del Ejemplo 5 (se usaron medios de crecimiento completo y de inanición compatibles). Se observó que LYO II y mezcla de WAP II indujeron cambios morfológicos (de formas tipo diamante a fusiformes) en comparación con células sin tratar (datos no mostrados).

En otro experimento se evaluó la capacidad de LYO II para inducir estructuras tipo vaso en presencia de sellante de fibrina o fibrinógeno. El sellante de fibrina comprende componentes de la matriz extracelular, por ejemplo, fibronectina y fibrinógeno (Bar et al. "The binding of fibrin sealant to collagen is influenced by the method of purification and the cross-linked fibrinogen-fibronectin (heteronectin) content of the 'fibrinogen' component". *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2005;16:111-117). La adición del sellante de fibrina se llevó a cabo con el fin de crear condiciones medioambientales que se parecen al entorno *in vivo*. Para este fin, se sembraron HUVEC a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ml (10000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos Costar tratadas con cultivo previamente recubiertas con tejido (con fibrinógeno o fibrina - véase el procedimiento a continuación) en 100  $\mu$ l de medio completo. 24 horas después se desechó el medio y se añadieron 100  $\mu$ l de medio de inanición (el medio comprende los componentes enumerados anteriormente). Se formaron pre-recubrimientos de fibrinógeno o de fibrina del siguiente modo:

- a. Se añadieron 50  $\mu$ l de componente de fibrinógeno (de sellante de fibrina EVICEL™; Omrix Biopharmaceuticals Ltd. diluido a 4 mg/ml con medio de inanición de HUVEC) a cada pocillo. La placa se incubó durante 1 hora a 37 °C, la disolución se aspiró y los pocillos se lavaron dos veces con PBS.
- b. 50  $\mu$ l/pocillo de fibrina formada a partir de 25  $\mu$ l de componente de fibrinógeno (sellante de fibrina EVICEL™ diluido a 8 mg/ml con medio de inanición de HUVEC) y 25  $\mu$ l de componente de trombina

(de sellante de fibrina EVICEL™ diluido a 2 UI/ml con medio de inanición de HUVEC).

Después de aplicar la disolución de recubrimiento a los pocillos, la placa se incubó durante 1 hora a 37 °C. Entonces, la disolución se aspiró y los pocillos se lavaron dos veces con PBS. Entonces, las células se sembraron en las condiciones enumeradas anteriormente (10000 células/pocillo en 100 µl de medio de crecimiento completo). 24 horas después de la siembra de células el medio se sustituyó con 100 µl de medio de inanición. 24 horas después de cambiar el medio, se añadieron 10 µl de mezcla de WAP II o LYO II reconstituido (en 2 ml de agua estéril, es decir, concentrada 2 veces con respecto al volumen del material de partida de WAP) al pocillo. Las concentraciones de varios factores de crecimiento en tanto WAP II como LYO II fueron las siguientes: bFGF - 480 y 1120 pg/ml; VEGF - 3 y 10,8 ng/ml; y PDGF-AB - 320 y 144 ng/ml en pocillos tratados con WAP II y LYO II, respectivamente.

Las células se tiñeron con calceína AM como antes y se tomaron imágenes representativas a 100x aumentos. Los resultados se presentan en la Fig. 9.

Es evidente que las superficies recubiertas con fibrinógeno o fibrina fueron insuficientes para inducir los pronunciados cambios morfológicos que producirían la tubulogénesis. Sin embargo, la adición de tanto LYO II como mezcla de WAP II junto con los recubrimientos de fibrinógeno o fibrina promovieron la formación de estructuras tubulares.

**Ejemplo 6: Extracto de plaquetas liofilizado preparado a partir de mezcla de plaquetas de aféresis lavadas (WAP) reducidas en leucocitos tratado con S/D, pasteurizado, esterilizado por filtración y concentrado.**

Se preparó un mezcla de material de WAP tratado con S/D y calor como en el Ejemplo 4, excepto que: 1) Se usaron diez bolsas de WAP (un volumen total de 2000 ml); 2) Se tomó una muestra de 1720 ml para ser tratada con S/D y los 280 ml restantes se congelaron a -80 °C para el análisis posterior ("mezcla de WAP III"); 3) Se añadió HSA a una concentración final de 1 % de HSA v/v en la muestra; 4) La eliminación de S/D se realizó usando la columna de cromatografía de líquidos XK50 rellena de 295 ml de resina de cromatografía de eliminación de solvente-detergente SDR HyperD conjuntamente con una bomba peristáltica y un detector de UV/VIS UA-6 + grabadora tipo 11 a una velocidad de flujo constante de 40 ml/min; 5) El volumen del material recogido del flujo a través fue 2700 ml; 6) Con el fin de transferir la disolución viscosa tras la estabilización y pasteurización, la disolución se diluyó con tampón de acetato-glicina (acetato sódico 20 mM; y glicina 100 mM) hasta un volumen total de 8600 ml; 7) Se llevó a cabo diafiltración usando el portacasete de membrana de filtración de flujo tangencial Centramate PE + 4 casetes de ultrafiltración de 10k Da Omega Centramate (Pall Corp, Port Washington, NY, EE.UU.) concentrando primero la muestra a un volumen de 3500 ml (desde un volumen de 8600 ml) y dializando luego contra un volumen total de 10.320 ml de tampón de acetato-glicina (como antes) por una adición gradual de tampón y manteniendo el volumen a 3500 ml ± 200 ml. A continuación, la muestra dializada se concentró a 450 ml - aproximadamente el 25 % del volumen de partida; véase el punto 2 anterior en el que se tomó una muestra de 1720 ml para ser tratada con S/D; 8) la disolución concentrada-dializada se filtró secuencialmente a través de filtros Sartopure PP2 de 20, 5 y 1,2 µm, seguido de filtro Sartopore 2 de 0,45 µm para eliminar el material agregado (y no solo a través de 5 y 1,2 µm, seguido de 0,45 µm). Se llevó a cabo una esterilización por filtración a través de 0,2 µm. A continuación, la muestra filtrada se tomó en alícuotas (4 ml) y se liofilizó como se ha descrito anteriormente. El extracto de plaquetas liofilizado preparado anteriormente se denomina en el presente documento "LYO III".

Como en LYO II, la etapa de purificación viral de LYO III incluyó tratamiento con S/D, una etapa de pasteurización adicional y una esterilización por filtración final. Durante la etapa de diálisis, el volumen de la disolución dializada se concentró 4 veces en comparación con el volumen de partida.

**Ejemplo 7: Concentración de proteínas del plasma en extracto de plaquetas liofilizado preparado a partir de mezcla de plaquetas de aféresis lavadas (WAP) reducidas en leucocitos tratado con S/D, pasteurizado y concentrado ("LYO III").**

La concentración de diversas proteínas del plasma, que incluyen proteínas que participan en la coagulación de la sangre, se midió en mezcla de WAP III y en LYO III.

La reconstitución de LYO III se llevó a cabo en ddH<sub>2</sub>O en el volumen antes de la liofilización (4 ml).

La concentración de las diferentes proteínas se evaluó del siguiente modo:

La actividad de coagulación de la trombina se midió por una modificación del procedimiento de ensayo de la Farmacopea Europea (0903/1997). Se representó una curva de calibración del log de los tiempos de coagulación frente al log de la concentración de trombina mezclando patrón de trombina (Omrix, Israel) con una disolución de fibrinógeno del 0,1 % (Enzyme Research Laboratories, IN, EE.UU.) usando el instrumento de coagulación STart4 (Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, Francia). Se calculó la actividad de trombina en las diferentes muestras por el tiempo de coagulación obtenido (calculado automáticamente por una máquina de coagulación, interpolado de la

curva de calibración y después multiplicado por el factor de dilución.

La cuantificación del fibrinógeno activo se evaluó según el ensayo de la Farmacopea Europea modificado 0903/1997, que se basa en el método de Clauss. Se midió el tiempo de coagulación usando el instrumento de coagulación STart4 (Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, Francia). En este método, se prepara una curva de calibración con fibrinógeno (Enzyme Research Laboratories, IN, EE.UU.) en presencia de exceso de trombina y entonces la concentración de fibrinógeno de las muestras se calcula a partir de la curva de calibración.

El fibrinógeno total se midió usando un kit de ELISA comercial (por MD Biosciences, Zúrich, Suiza; Cat. Número HFIBKT) según las instrucciones del fabricante.

La cuantificación de fibronectina se llevó a cabo usando un kit de ELISA comercial (Technoclone Cat. Número TC12030).

La cuantificación del factor de von Willebrand (vWF) se llevó a cabo por un ensayo de ELISA. Se usaron los siguientes anticuerpos para el ensayo de anticuerpo de conejo policlonal anti-vWF humano (DAKO; Cat. Número A0082), y anticuerpo de conejo policlonal anti-vWF humano conjugado con HRP. Se preparó una curva patrón usando Unicalibrator (Diagnostica Stago; Cat. Número 00625).

Se determinaron las cantidades de factores II, VII, VIII, IX, X y XI usando el instrumento de coagulación STart4 con los siguientes reactivos comprados de Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, Francia: STA-Deficient II (Cat. Número 00745), STA-Deficient VII (Cat. Número 00743), STA-Deficient VIII (Cat. Número 0725), STA-Deficient IX (Cat. Número 00724), STA-Deficient X (Cat. Número 00738) y STA-Deficient XI (Cat. Número 00723). Todos los reactivos se usaron según las instrucciones del fabricante.

La concentración de IgG se midió usando transferencia Western, un análisis semi-cuantitativo, con anticuerpo de cabra anti-IgG humana AffiniPure conjugado con fosfatasa alcalina (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., PA, EE.UU.; Cat. número 109-055-088). La concentración de IgG en las muestras se calculó a partir de una curva de calibración hecha con el patrón de referencia de la Ph. Eur. BRP Human IgG.

Tabla 2: Concentraciones de diversas proteínas del plasma en material de partida de plaquetas (mezcla de WAP III) y LYO III.

Proteínas	WAP III agrupado	LYO III
Trombina (tiempo de coagulación) IU/ml	<0.25*	<0.25*
Fibrinógeno (tiempo de coagulación) mg/ml	<0.08*	<0.08*
Fibrinógeno (mg/ml)	0.13	0.034
Fibronectina (mg/ml)	0.001	0.004
Factor de von Willebrand (IU/ml)	<0.0625*	<0.0625*
Factor II (IU/ml)	<0.003*	<0.003*
Factor VII (IU/ml)	0.008	0.009
Factor VIII (IU/ml)	<0.2*	<0.2*
Factor IX (IU/ml)	<0.0038*	<0.0038*
Factor X (IU/ml)	0.003	0.003
Factor XI (IU/ml)	0.0045	<0.0028*
IgG (mg/ml)	0.011	0.076
* Valor se refiere al límite de detección, por lo tanto la muestra se considera vaciada de estas proteínas.		

Los resultados presentados en la Tabla 2 muestran que tanto la mezcla de WAP III como LYO III comprenden cantidades muy bajas de proteínas del plasma. Los niveles marginales o la ausencia completa de proteínas de la coagulación en LYO III convierten al extracto de plaquetas en no coagulable. En comparación, un extracto de plaquetas preparado según Burnouf (documento WO 2009/087560) contiene una alta concentración de factores de coagulación. LYO III y mezcla de WAP III comprenden menos de 0,08 mg/ml de fibrinógeno activo.

**Ejemplo 8: El efecto de LYO III sobre la proliferación celular en células de fibroblasto y sobre cambios**

**morfológicos en HUVEC.**

Se llevó a cabo el efecto de LYO III sobre la proliferación celular como se ha desarrollado en el Ejemplo 5 usando células albinas 3T3-Swiss.

Se reconstituyó LYO III, que se liofilizó a partir de una disolución de 4 ml y que se concentró 4 veces en comparación con el volumen de WAP de partida, en 0,5 ml de agua purificada estéril - concentrada 8 veces (concentrada 32 veces en comparación con el volumen de partida de mezcla de WAP III). Tras la reconstitución, mezcla de WAP III o LYO III reconstituido se diluyeron sucesivamente 5 veces en el medio de inanición apropiado y se añadieron 10 µl de cada dilución a un pocillo que contenía 100 µl de medio de inanición. La concentración de partida de mezcla de WAP III se designó 1 y las diluciones sucesivas se calcularon consecuentemente. La concentración de partida de LYO III se designó 32 y las diluciones sucesivas se calcularon consecuentemente. Concentraciones de varios factores de crecimiento en tanto WAP III como LYO III se detectaron por ELISA (Quantikine por R&D Systems, MN EE.UU.: TGF-β1 humano cat DB100B, FGF básico humano cat HSFB00D, VEGF humano cat DVE00, PDGF-AB humano cat DHD00B) y las concentraciones reales que estaban presentes en el pocillo (a la mayor concentración) durante el ensayo de proliferación son las siguientes: EGF-β1 - 170 y 4250 ng/ml; bFGF - 85 y 540 pg/ml; VEGF -1 y 13 ng/ml; y PDGF-AB - 73 y 33 ng/ml en pocillos tratados con WAP III y LYO III, respectivamente.

Como control patrón, se preparó una mezcla a medida de factores de crecimiento humanos recombinantes (denominada en el presente documento MasterMix; MM) con los siguientes componentes: TGF-β1 200 ng/ml, b-FGF 0,5 ng/ml, VEGF 5 ng/ml y PDGF-AB 300 ng/ml (los factores de crecimiento se compraron de R&D Systems; Cat. Número Cat. Número 240-B-010/CF, 233-FB-025/CF, 293-VE-010/CF y 222-AB-010, respectivamente). La mezcla MM también se diluyó sucesivamente 5 veces en medio de inanición y se añadió a los pocillos (10 µl). La proliferación se evaluó 72 horas después del inicio del tratamiento usando el reactivo de proliferación celular WST-1 (se usaron células sin ningún aditivo como fondo y se restaron de los valores de DO). Al final del periodo de incubación (4 horas), las placas se agitaron durante 1 min y la absorbancia de las muestras se midió como se indica anteriormente. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado. Con el fin de comparar los diferentes materiales basándose en un factor común, los resultados obtenidos se normalizaron (véase más adelante) a la concentración de PDGF-AB, un factor de crecimiento que provoca la proliferación de células 3T3, presente en todos los materiales probados. La normalización a PDGF-AB se llevó a cabo midiendo la concentración de PDGF-AB [un kit de ELISA comercial (Quantikine, R&D Systems, MN, EE.UU.; Cat. Número DHD00B) en LYO III reconstituido y calculando la concentración de PDGF-AB en las diluciones relativas. Los resultados de DO obtenidos por el reactivo de proliferación celular WST-1 se representaron contra los valores de concentración de PDGF-AB calculados. Se usó MasterMix (MM) como control positivo. La normalización se hizo a la concentración de PDGF-AB como se evalúa por ELISA específico.

Los resultados del efecto proliferativo de LYO III o mezcla de WAP III sobre células albinas 3T3-Swiss se muestran en la Fig. 10.

Los resultados muestran que concentraciones crecientes de LYO III o mezcla de WAP III afectaron el nivel de proliferación de células de fibroblastos albinos 3T3-Swiss siendo el efecto de LYO III más pronunciado mientras que se normalizó a la cantidad de PDGF-AB presente en las muestras. En particular, el efecto de ambos tratamientos fue incluso más pronunciado que el control positivo (MM).

Se llevó a cabo un ensayo de formación de tubo para evaluar el efecto angiogénico de LYO III y para explorar un posible efecto sinérgico de LYO III y sellante de fibrina o sus componentes. Con el fin de eliminar cualquier posible efecto de los aditivos sobre la unión de las células a la superficie de la placa, las células se sembraron primero y solo entonces se trataron con los diferentes aditivos.

Para este fin, se sembraron HUVEC a una concentración de  $50 \times 10^3$  células/ml (5000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos Costar tratadas con cultivo de tejido en 100 µl de medio de crecimiento completo (mismos componentes que antes). 24 h después de la siembra de células, el medio completo se desechó, los pocillos se lavaron dos veces con 100 µl de medio de inanición y se añadieron 100 µl de medio de inanición a cada pocillo (mismos componentes que antes).

24 horas después de cambiarse el medio, el ensayo se inició mediante la adición de 10 µl de tanto LYO III (reconstituido en 0,5 ml de agua estéril - concentrado 32 veces relativamente al volumen de mezcla de WAP III) o una combinación de LYO III y fibrina [formada con 1 UI/ml de trombina (concentración final en el pocillo) y 11,3 mg/ml (proteína total) de fibrinógeno [tanto la trombina como el fibrinógeno son componentes del sellante de fibrina EVICEL™ (Omrix Biopharmaceuticals Ltd.) diluido en medio de inanición]. Las concentraciones de TGF-β, bFGF, VEGF y PDGF-AB en los pocillos fueron como en la proliferación anterior. Células tratadas con trombina y/o fibrinógeno en las mismas concentraciones enumeradas anteriormente se usaron como referencia. 48 horas después de los diferentes tratamientos, las células se tiñeron con calceína AM 5 µM durante 30 min a 37 °C y se tomaron imágenes representativas usando microscopio Axiovert 200 a 100x aumentos y filtro de fluorescencia para

530 nm (Zeiss). Los resultados se presentan en la Fig. 11.

Como se representa en la Fig. 11, no se observó tubulogénesis en las células de control (A). Por tanto, es evidente que la trombina o el fibrinógeno solos tuvieron solo capacidad marginal para inducir cambios morfológicos en HUVEC como puede evaluarse del número muy bajo de células alargadas y formas tipo vaso (B y C, respectivamente). El tratamiento con fibrina (trombina y fibrinógeno; E) produjo re-disposición de las células hacia la tubulogénesis; sin embargo, no se detectaron estructuras de vaso pronunciadas. La adición de LYO III (D) a la monocapa de HUVEC promovió la tubulogénesis que aumentó adicionalmente mediante la adición de fibrina (F).

**Ejemplo 9: Extracto de plaquetas liofilizado preparado a partir de mezclas de plaquetas de aféresis lavadas (WAP) reducidas en leucocitos, tratado con S/D bajo bajas condiciones de agregados, pasteurizado y concentrado.**

En este experimento se preparó un extracto de plaquetas liofilizado a partir de un material congelado, antes de descongelar, del siguiente modo: Se pesaron individualmente diez bolsas de WAP, se limpiaron con 70 % de etanol, se abrieron cortando y el material congelado se colocó en un vaso de precipitados grande que se sumergió en un baño de agua ajustado a 25 °C. Se pesó la bolsa vacía y se usó la diferencia de peso entre las bolsas vacías y las bolsas llenas para calcular el peso neto de WAP (el peso neto de WAP de cada bolsa fue aproximadamente 200 g). La mezcla de materiales se mezcló lentamente a 25 °C hasta que se descongelaron completamente usando un agitador de acero inoxidable conectado a un agitador superior RW20 (IKA-Werke GmbH & Co., Staufen, Alemania) a 20 rpm. La osmolaridad de la mezcla de WAP fue 275 mOs [medida usando The Advanced™ Micro Osmometer Modelo 3300 (Advanced Instruments Inc, Norwood, MA, EE.UU.)]. Se añadieron 10 % de tampón de acetato-glicina (acetato sódico 200 mM, glicina 100 mM; a pH 6,8-7,4) y 1 % de HSA (v/v de la disolución de volumen final) a la mezcla de WAP. Con el fin de mantener el nivel de osmolaridad tan constante como fuera posible durante todo el proceso, la osmolaridad del tampón se ajustó a la del material de partida de WAP usando NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). En la siguiente etapa, se llevó a cabo tratamiento con S/D añadiendo lentamente 1 % de Triton X-100 y 0,3 % de TnBP (v/v) a las mezclas de muestras mientras que se mezclaban a 50 rpm. Con el fin de evitar inactivación viral inferior a la óptima debido a la posible presencia de materia en partículas, el tratamiento con S/D se dividió en dos partes. Primera, la muestra se agitó continuamente durante 30 minutos y luego se filtró a través de filtros Sartopure PP2 de 20, 5 y 1,2 µm y Sartopore 2 de 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne, Francia). Entonces, el material filtrado se devolvió a un vaso de precipitados sumergido en un baño de agua ajustado a 25 °C y se mezcló a 50 rpm durante 2 horas adicionales para continuar el proceso de inactivación viral. La eliminación de S/D se llevó a cabo usando columna de cromatografía de líquidos XK50 rellena de 295 ml de resina de cromatografía de eliminación de solvente-detergente SDR HyperD (Pall Corp) conjuntamente con una bomba peristáltica y un detector de UV/VIS UA-6 + grabadora tipo 11 (ISCO, NE, EE.UU.). Se cargaron 1800 ml de extracto de plaquetas tratado con S/D sobre la columna seguido de lavado con 540 ml de tampón de acetato-glicina (acetato sódico 200 mM, glicina 100 mM; a pH 6,8-7,4) + 1 % de HSA v/v. Se recogió un volumen total de 2700 ml de la columna (flujo a través). Se encontró que los agregados insolubles en agua, que pueden interferir con etapas posteriores de la producción, se forman durante el proceso de fabricación. También se encontró que la agregación se intensifica en presencia de calcio. Así, se decidió usar calcio para facilitar la precipitación de agregados en una etapa temprana, seguido de eliminación de estos agregados por filtración por clarificación. Consecuentemente, se añadió lentamente CaCl<sub>2</sub> (a concentración final 40 mM) al extracto tras el procedimiento de eliminación de S/D y el extracto se incubó durante 30 minutos a 25 °C mientras que se mezclaba a 50 rpm. A continuación, el producto se filtró usando filtros Sartopure PP2 de 20, 5 y 1,2 µm y Sartopore 2 de 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne, Francia). En la siguiente etapa, el extracto se sometió a estabilización y pasteurización como en el Ejemplo 4. Con el fin de transferir la disolución viscosa obtenida a un recipiente limpio, se diluyó con tampón de acetato-glicina (a una concentración final de acetato sódico 20 mM, glicina 10 mM en la disolución viscosa; a pH 6,8-7,4) y 1 % de HSA v/v hasta un peso total de 11.320 ml. La eliminación de los estabilizadores se llevó a cabo por diafiltración contra tampón de acetato-glicina (como antes) usando portacasete de membrana de filtración de flujo tangencial Centramate PE + 4 casetes de ultrafiltración de 10 kDa Omega Centramate (Pall). La diafiltración se llevó a cabo del siguiente modo: el extracto se concentró primero a un volumen de 3600 ml y a continuación se llevó a cabo la diálisis contra un volumen total de 10.800 ml de tampón de acetato-glicina (como antes) por una adición gradual del tampón y manteniendo el volumen de disolución a 3600 ± 200 ml. A continuación, la disolución dializada se concentró a un volumen de 473 ml, que es aproximadamente el 25 % del volumen de partida.

Para la estabilización, se añadió Manitol a la disolución a una concentración final del 2 % peso/peso. Con el fin de eliminar el material agregado, la muestra se filtró secuencialmente a través de filtros Sartopure PP2 de 20, 5 y 1,2 µm, y filtro Sartopore 2 de 0,45 µm. Se llevó a cabo esterilización por filtración bajo condiciones asépticas usando un filtro Sartopore 2 de 0,2 µm. A continuación, el producto se tomó en alícuotas en porciones de 4 ml bajo condiciones asépticas y se liofilizó como se ha desarrollado anteriormente. El material liofilizado se selló en atmósfera de nitrógeno en vacío parcial (0,6 bar). El extracto de plaquetas liofilizado preparado anteriormente se denomina en el presente documento "LYO IV".

La etapa de purificación viral de LYO IV incluyó tratamiento con S/D que incluyó una subetapa de filtración dentro del tratamiento de S/D. La filtración en esta etapa se llevó a cabo a través de filtros de 20, 5, 1,2 y 0,45 µm.

Además, se llevó a cabo una etapa de pasteurización, y una esterilización por filtración final. Durante la etapa de diálisis, el volumen de la disolución dializada se concentró 4 veces en comparación con el volumen de partida.

5 **Ejemplo 10: El efecto de LYO IV sobre la proliferación celular y cambios morfológicos en células de fibroblasto y sobre cambios morfológicos en HUVEC.**

Se llevó a cabo el efecto de LYO IV sobre la proliferación celular como se ha desarrollado en el Ejemplo 5. Se sembraron células albinas 3T3-Swiss a una concentración de  $25 \times 10^3$  células/ml (2500 células/pocillo) en placas de 96 pocillos Costar tratadas con cultivo de tejido en medio de crecimiento completo (componentes como se ha desarrollado anteriormente). 24 h después de la siembra de células, el medio de crecimiento completo se sustituyó con medio de inanición fresco (como antes). La proliferación se indujo 24 horas después de sustituir el medio mediante la adición de mezcla de WAP IV o LYO IV reconstituido. La reconstitución se llevó a cabo del siguiente modo: LYO IV, que se liofilizó a partir de una disolución de 4 ml (concentrada 4 veces en comparación con mezcla de WAP de partida), se reconstituyó en 0,5 ml de agua purificada estéril - concentrada 8 veces (32 veces concentrada en comparación con el volumen de partida de mezcla de WAP IV). Tras la reconstitución, LYO IV reconstituido o mezcla de WAP IV se diluyeron sucesivamente 5 veces en el medio de inanición apropiado y 10  $\mu$ l de cada dilución se añadieron a un pocillo que contenía 100  $\mu$ l de medio de inanición. La concentración de partida de mezcla de WAP IV se designó 1 y las diluciones sucesivas se calcularon en consecuencia (concentración relativa). La concentración de partida de LYO IV se designó 32 y las diluciones sucesivas se calcularon en consecuencia. Las concentraciones de varios factores de crecimiento en tanto WAP IV como LYO IV se detectaron por ELISA (mismos kits que antes) y las concentraciones reales presentes en el pocillo (a la mayor concentración) durante el ensayo de proliferación son las siguientes: TGF- $\beta$  - 230 y 2000 ng/ml; bFGF - 100 y 170 pg/ml; VEGF - 1,25 y 8,1 ng/ml; PDGF-AB - 57 y 27 ng/ml; y trombospondina-1 - 60 y 330 ng/ml en pocillos tratados con WAP IV y LYO IV, respectivamente.

MasterMix (MM) preparada como en el Ejemplo 8 se usó como control positivo. Esta mezcla se diluyó sucesivamente 5 veces en medio de inanición y se añadieron 10  $\mu$ l a los pocillos. La concentración máxima de MM se designó 30 (ya que la concentración de PDGF-AB en MM era 30 ng/ml) y las diluciones sucesivas se calcularon en consecuencia. La proliferación de las células se evaluó 48 horas después de empezar el tratamiento como se ha desarrollado anteriormente. Después de 4 horas de incubación con WST-1, la absorbancia de las muestras se midió como se ha indicado anteriormente. Los resultados obtenidos se normalizaron a PDGF-AB (como se ha explicado anteriormente). Todas las pruebas se hicieron por triplicado. Los resultados se presentan en la Fig. 12.

Los resultados muestran que LYO IV y mezcla de WAP IV tuvieron un efecto similar sobre el nivel de proliferación de fibroblastos albinos 3T3-Swiss. El efecto obtenido fue incluso más pronunciado que el control positivo (MM).

Para evaluar el efecto de LYO IV sobre cambios morfológicos de células albinas 3T3-Swiss, se tomaron imágenes de microscopio de contraste de fases tras los tratamientos (las células se sembraron como en el ensayo de proliferación en el Ejemplo 10, se trataron con 10  $\mu$ l de LYO IV reconstituido (en 0,5 ml de agua estéril), mezcla de WAP IV y la concentración máxima de MM (como en el Ejemplo 8) se añadió a 100  $\mu$ l de medio de inanición y las imágenes se tomaron 2 días tras el tratamiento). Las concentraciones de TGF- $\beta$ , bFGF, VEGF, PDGF-AB y trombospondina-1 en los pocillos fueron como en el ensayo de proliferación. Se muestran imágenes representativas en la Fig. 13.

Células de fibroblasto sin tratar poseen formas tipo diamante (Figura 13A). La adición de LYO IV (B) a fibroblastos albinos 3T3-Swiss promovió cambios morfológicos de las células de células tipo diamante a forma fusiforme, una característica de fibroblastos móviles. Estos cambios morfológicos observados fueron más fuertes que los cambios observados tras el tratamiento con mezcla de WAP IV (C) y el control positivo (MM; D).

Como se indica anteriormente, las formas fusiformes de células de fibroblasto 3T3 son un atributo del potencial de motilidad. En el siguiente experimento, la motilidad actual de las células se evaluó tras el tratamiento con LYO IV usando el ensayo de migración de la herida por arañazo (Liang et al. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. Nat Protoc. 2007;2(2):329-33). Se sembraron células albinas 3T3-Swiss a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ml (50.000 células/pocillo) en placas de 24 pocillos Costar tratadas en cultivo de tejido (Corning Life Science, MA EE.UU.) en 0,5 ml de medio de crecimiento completo (como antes). Antes de la siembra, el pocillo se recubrió con uno de los siguientes:

- 60 1. Recubrimiento de colágeno - 12,5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> de una disolución de colágeno (colágeno I, bovino, 5 mg/ml, Invitrogen, CA, EE.UU., Cat. Número A10644-01, preparado según el protocolo del fabricante para procedimientos de recubrimiento delgado, se usó una dilución de 50  $\mu$ g/ml en ácido acético 10 mM). El recubrimiento se aplicó según el protocolo del fabricante.
- 65 2. Recubrimiento de fibrinógeno - 250  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> del componente de fibrinógeno de sellante de fibrina EVICEL™ (Omrix Biopharmaceuticals Ltd.) diluido con medio DMEM a 1 mg/ml de fibrinógeno. Después de

1 hora de incubación a temperatura ambiente, la disolución se aspiró y los pocillos se lavaron con DMEM fresco.

Se usaron pocillos sin recubrir como control. 6 horas después de la siembra de células, el medio de crecimiento completo se desechó, los pocillos se lavaron dos veces con 0,5 ml de medio de inanición y se añadieron 0,5 ml de medio de inanición fresco a cada pocillo (como antes). Después de la inanición durante la noche, la monocapa de células se hirió en el centro del pocillo con una punta de pipeta de plástico p200, las células desprendidas se lavaron junto con el medio de inanición y se añadieron 0,5 ml de medio de inanición fresco. La migración de las células (es decir, motilidad) se evaluó tras la adición de tanto mezcla de WAP IV, LYO IV reconstituido (en 2 ml de agua estéril), como PRP-R (concentrado de PRP) [preparado del siguiente modo: 60 ml de PRP de un único donante (preparado por y obtenido de MDA, Banco de Sangre, Israel) se activaron con 3 ml de 1000 UI/ml de trombina (de EVICEL™) y 2 ml de CaCl<sub>2</sub> 2 M, y a continuación se centrifugaron a 3000 g durante 10 min a 4 °C resultando 27 ml de sobrenadante que se usaron para el experimento]. Todas las disoluciones de tratamiento se diluyeron 1:10 en el pocillo (50 µl). Cada tratamiento se llevó a cabo por duplicado.

Las concentraciones de varios factores de crecimiento en tanto WAP IV como LYO IV fueron del siguiente modo: TGF-β - 920 y 8000 ng/ml; bFGF - 400 y 680 pg/ml; VEGF - 5 y 32,4 ng/ml; PDGF-AB - 228 y 108 ng/ml; y trombospondina 1 - 240 y 1320 ng/ml en los pocillos (respectivamente para WAP IV y LYO IV).

La anchura herida se capturó usando microscopio de contraste de fases (100x aumentos) en tres localizaciones diferentes en cada pocillo (6 imágenes por cada tratamiento) en el momento de tiempo 0 y después de 24 horas. En cada imagen, la anchura herida se midió 5 veces (15 veces por pocillo) y el cierre de la herida (una anchura de herida más estrecha) se calculó como el porcentaje de herida que queda 24 horas después del inicio del tratamiento en la misma localización.

Imágenes de contraste de fases representativas de la anchura herida en los diferentes tratamientos en los diferentes momentos de tiempo se muestran en la Fig. 14. La evaluación cuantitativa del cierre de herida como un porcentaje que queda 24 horas después del inicio del tratamiento en los diferentes grupos de tratamiento se muestra en la Fig. 15. Los resultados se presentan como la media de 6 duplicados ± D.E.

Los resultados muestran que sobre todas las superficies (pocillos recubiertos o sin recubrir) LYO IV promovió la motilidad de fibroblastos y el cierre del arañazo en la monocapa (la herida es más estrecha que el tratamiento de referencia de control) de una manera similar a la mezcla de WAP IV y PRP-R (que se ha informado como eficaz en la cicatrización en entorno *in vivo*, Lacci KM, Dardik A, 2010).

Los pocillos recubiertos con colágeno mostraron un efecto promotor de la motilidad ligeramente mayor en comparación con los pocillos recubiertos de fibrinógeno.

Se llevó a cabo el ensayo de formación de tubo para evaluar la capacidad de LYO IV para inducir cambios morfológicos de HUVEC. Estos cambios morfológicos están asociados a la angiogénesis. Para este fin, se sembraron HUVEC a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ml (10000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos Costar tratadas con cultivo de tejido en 100 µl de medio de inanición (como antes, excluyendo el 2 % de FCS). Con el fin de simular entorno de matriz extracelular, los pocillos se recubrieron con BME (50 µl/pocillo según el protocolo del fabricante) antes de la siembra de células.

Durante la siembra, se añadieron 10 µl de tanto mezcla de WAP IV como LYO IV (reconstituida en 2 ml de agua estéril, concentrada 8 veces relativamente al volumen de la mezcla de WAP IV) a los pocillos designados. La concentración de TGF-β, bFGF, VEGF, PDGF-AB y trombospondina 1 en los pocillos fue como en el ensayo de migración anterior. Se usaron HUVEC sin tratar sembradas sobre recubrimiento de BME como referencia. Después de 24 h, las células se tiñeron con calceína AM 5 µM durante 30 min a 37 °C y se tomaron imágenes representativas usando microscopio Axiovert 200 con 60x aumentos y filtro de fluorescencia para 530 nm (Zeiss). Los resultados se muestran en la Fig. 16.

Como se observa en la Fig. 16, LYO IV (B) tuvo la potencia tubogénica más fuerte en comparación con WAP IV (C) o células sin tratar (A) (el tratamiento con LYO IV produjo la formación de estructuras tipo vaso).

#### **Ejemplo 11: Evaluación del uso de nanofiltración como segunda etapa de inactivación viral.**

Se preparó una mezcla de material de WAP a partir de 10 donantes (2000 ml) como se ha desarrollado en el Ejemplo 1. Entonces, se añadieron 200 ml de tampón de acetato-glicina y 1 % de HSA v/v a la mezcla de WAP. Se tomó una muestra de 50 ml, se trató con S/D como se desarrolla más adelante y se guardó a -80 °C hasta que se ensayara. Tras el análisis, la muestra se descongeló a temperatura ambiente y a continuación se filtró (para eliminar cualquier materia en partículas) a través de filtro de jeringa de 0,45 µm (Millex-HV por Millipore; Cat. Número SLHV033RS). Solo se filtraron aproximadamente 25 ml (de los 50 ml) antes de que el filtro se obstruyera, por tanto se usó un filtro nuevo para el resto de la muestra. Se obtuvieron extractos por congelación y descongelación y

llevando a cabo un tratamiento con S/D.

Después de la descongelación, se llevó a cabo una etapa de eliminación de S/D usando la columna de cromatografía de líquidos HR 10x10 (Amersham Pharmacia Biotech) rellena de 8 ml de resina de cromatografía de eliminación de solvente-detergente SDR HyperD (Pall Corp.) conjuntamente con una bomba peristáltica y un detector de UV/VIS UA-6 + grabadora tipo 11 (ISCO, NE, EE.UU.). Los parámetros de flujo usados durante el proceso fueron: 1 ml/min con un límite de presión máxima de 1,0 bar.

La columna se preparó con 32 ml de agua purificada, seguido de 24 ml de tampón de acetato-glicina que incluye 1 % de HSA v/v. La columna se cargó con 40 ml de la muestra de extracto. Después de cargar la muestra de extracto, la columna se lavó primero con 14 ml de tampón de acetato-glicina que incluye 1 % de HSA v/v. Se llevó a cabo una segunda etapa de lavado usando 22 ml de tampón de acetato-glicina que incluye 10 % de etanol/NaCl 1 M/0,2 % de HSA. Se encontró en los experimentos de los presentes inventores que la última etapa de lavado aumentaba la recuperación de algunos factores de crecimiento, por ejemplo, PDGF-AB y PDGF-BB (véase el Ejemplo 12). A continuación, la columna se lavó con 16 ml de agua purificada. El volumen total del flujo a través recogido fue 80 ml. Para facilitar la precipitación de agregados en una etapa temprana, la precipitación con CaCl<sub>2</sub> se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 9. La filtración por clarificación de la muestra del extracto después del tratamiento con CaCl<sub>2</sub> se llevó a cabo usando filtro de cápsula de 5 µm (mdí Advanced Microdevices), seguido de filtro de jeringa de 0,45 µm (Millex-HV por Millipore; Cat. Número SLHV033RS).

Para eliminar agregados más pequeños, se llevó a cabo una etapa de pre-filtración antes de la etapa de nanofiltración pasando el material a través de filtros de 0,2 y 0,1 µm. Con el fin de filtrar la muestra de extracto de 80 ml entera, se usaron dos filtros de vacío de 0,2 µm (Nalgene Supor Mach V 50 mm) y cuatro filtros de jeringa de 0,1 µm (Millex VV por Millipore; Cat. Número SLW033RS). A continuación, el material filtrado se sometió a una etapa de nanofiltración. El sistema de nanofiltración se ensambló en línea del siguiente modo: tanque de gas nitrógeno a presión – regulador de la presión – carcasa de filtro SEALKLEEN (Pall Corp.) con presión de calibre de 2,5 bar (PG1) – válvula – filtro de 0,2 µm (Minisart por Sartorius; Cat. Número 16534) – filtro de 0,1 µm (Millipore; Cat. Número VVLP02500) – 1,0 bar de presión manométrica (PG2) – filtro PLANOVA 75N (Asahi Kasei; Cat. Número 75NZ-001) – 1,0 bar de presión manométrica (PG3) - filtro PLANOVA 35N (Asahi Kasei; Cat. Número 35NZ-001) – 1,0 bar de presión manométrica (PG4) – filtro PLANOVA 20N (Asahi Kasei; Cat. Número 20NZ-001).

El procedimiento de nanofiltración se llevó a cabo del siguiente modo:

Antes de cargar la muestra de extracto, el rendimiento del sistema se probó llenando la carcasa de filtro con 40 ml de agua purificada (PuW) y elevando la presión aumentando el flujo de gas nitrógeno en el sistema. Bajo condiciones normales, se espera que la disolución fluya a través del sistema con solo pequeñas caídas en la presión después de pasar a través de cada filtro de PLANOVA. Como se muestra en la Tabla 3 más adelante, se pasaron 40 ml de PuW a través del sistema sin una caída importante en la presión.

Después de verificar el rendimiento del sistema, la carcasa de filtro se llenó con tampón de acetato-glicina (acetato sódico 20 mM, glicina 10 mM; a pH 6,8-7,4) que contenía 1 % de HSA (el mismo tampón que está presente en la muestra de extracto). Los resultados en la tabla a continuación muestran que el nivel de presión y las velocidades de flujo permitieron que el tampón pasara a través del sistema entero. Sin embargo, cuando la muestra de extracto se cargó, dejó de pasar a través del sistema. Como se muestra en la tabla más adelante, la lectura de presión antes de PLANOVA 75N (PG2) fue 0,9 bar, mientras que la presión después de PLANOVA 75N y antes del filtro PLANOVA 35N (PG3) fue solo 0,2 bar, que indica que la muestra no pudo pasar fácilmente a través del filtro PLANOVA 75N.

Tabla 3: Nivel de presión y velocidades de flujo obtenidas cuando se somete DDW, tampón y extracto de plaquetas a nanofiltración.

	Volumen pasado (ml)	PG1 (bar)	PG2 (bar)	PG3 (bar)	PG4 (bar)	Tiempo (min)	Flujo (ml/min)
DDW	40	1.0	1.0	0.9	0.8	N/A	N/A
Tampón	0-5	1.0	1.0	0.65	0.45	12	0.4
	5-10	0.9	1.0	0.7	0.4	18	0.27
	10-15	0.8	0.9	0.7	0.4	21	0.24
	15-20	1.0	1.0	0.75	0.42	24	0.21
Muestra del extracto		0.9	0.9	0.2	0.0	0.0	0.0

Estos resultados muestran que no es factible utilizar la nanofiltración como segunda etapa de inactivación viral usando las condiciones desarrolladas anteriormente.

**Ejemplo 12: Extracto de plaquetas liofilizado preparado a partir de mezclas de plaquetas de aféresis lavadas (WAP) reducidas en leucocitos, tratado con S/D, eliminado de S/D usando cromatografía SDR HyperD usando condiciones de elución, pasteurizado y concentrado.**

5 En este experimento se preparó un extracto de plaquetas liofilizado del siguiente modo: Se pesaron individualmente diez bolsas de WAP, se limpiaron con 70 % de etanol, se abrieron cortando y el material congelado se colocó en un vaso de precipitados grande que se sumergió en un baño de agua ajustado a 25 °C. Se pesó la bolsa vacía y se usó la diferencia de peso entre las bolsas vacías y las bolsas llenas para calcular el WAP neto. El peso neto total de la mezcla de WAP fue 1947 g. La mezcla de materiales se mezcló lentamente a 25 °C hasta que se descongelaron completamente (misma condición de agitación que en el Ejemplo 9). La osmolaridad de la mezcla de WAP fue 265 mOs. Se añadieron 213 ml de tampón de acetato-glicina (a una concentración final de acetato sódico 20 mM, glicina 10 mM; a pH 6,8-7,4) y 1 % en v/v (de la disolución de volumen final) de albúmina de suero humano (HSA, Talecris EE.UU.) a la mezcla de WAP. Con el fin de mantener el nivel de osmolaridad tan constante como fuera posible durante todo el proceso, la osmolaridad del tampón se ajustó a la del material de partida de WAP usando NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Se llevó a cabo tratamiento con S/D como se ha descrito previamente añadiendo lentamente 1 % de Triton X-100 y 0,3 % de TnBP (v/v) a la mezcla de muestra mientras que se mezclaba a 50 rpm. Con el fin de evitar inactivación viral inferior a la óptima debido a la posible presencia de materia en partículas, durante el tratamiento con S/D la muestra se filtró. Brevemente, después de la adición de S/D la muestra se agitó continuamente durante 30 minutos y luego se filtró a través de filtros Sartopure PP2 de 20, 3 y 1,2 µm y Sartopore 2 de 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne, Francia). Entonces, el material filtrado se devolvió a un vaso de precipitados sumergido en un baño de agua ajustado a 25 °C y se mezcló a 50 rpm durante dos horas adicionales para continuar el proceso de inactivación viral.

25 La eliminación de S/D se llevó a cabo usando columna de cromatografía de líquidos XK50 rellena de 295 ml de resina de cromatografía de eliminación de solvente-detergente SDR HyperD (Pall Corp) conjuntamente con una bomba peristáltica y un detector de UV/VIS UA-6 + grabadora tipo 11 (ISCO, NE, EE.UU.). Se cargaron 1800 ml de extracto de plaquetas tratado con S/D (que contuvieron 1620 ml de material de plaquetas) sobre la columna, seguido de lavado con 600 ml de tampón de acetato-glicina + 1 % de HSA. Esto fue seguido de elución con 900 ml de tampón de acetato-glicina que contenía 10 % de etanol, NaCl 1 M y 0,2 % de HSA. La columna se lavó finalmente con 600 ml de agua purificada. Se recogieron el material sin unir y eluido. Se recogió un volumen total de 3600 ml de la columna. Para facilitar la precipitación de agregados, se añadió lentamente CaCl<sub>2</sub> (concentración final 40 mM) al extracto tras el procedimiento de eliminación de S/D, como se ha descrito previamente, y el extracto se incubó durante 30 minutos a 25 °C mientras que se mezclaba a 50 rpm. El producto se filtró usando filtros Sartopure PP2 de 20 y 3 µm y Sartopore 2 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne, Francia). En la siguiente etapa, el extracto se sometió a estabilización y pasteurización como en el Ejemplo 4. La eliminación de los estabilizadores se llevó a cabo por diafiltración contra tampón de acetato-glicina (como antes). A continuación, la disolución dializada se concentró a un volumen de 530 ml (que es aproximadamente el 29 % del volumen de partida).

40 Para la estabilización, se añadió Manitol a la disolución a una concentración final de 2 % en peso/peso. Con el fin de eliminar el material agregado, la muestra se filtró a través de filtro Sartopure PP2 de 3 µm y filtro Sartopore 2 de 0,45 µm. Se llevó a cabo filtración estéril bajo condiciones asépticas usando un filtro Sartopore 2 de 0,2 µm. A continuación, el producto obtenido (un volumen de 452 ml) se tomó en alícuotas en porciones de 4 ml bajo condiciones asépticas y se liofilizó como se ha desarrollado anteriormente. El material liofilizado se selló en atmósfera de nitrógeno en vacío parcial (0,6 bar). El extracto de plaquetas liofilizado preparado anteriormente se denomina en el presente documento "LYO V".

50 La etapa de purificación viral de LYO V incluyó tratamiento con S/D que incluyó una subetapa de filtración dentro del tratamiento con S/D. La filtración en esta etapa se llevó a cabo a través de filtros de 20, 3, 1,2 y 0,45 µm. La etapa de SDR incluyó lavar la columna usando disoluciones no isocráticas. La disolución no isocrática fue tampón de acetato-glicina que contenía 10 % de etanol, NaCl 1 M y 0,2 % de HSA. Además, se llevó a cabo una etapa de pasteurización y una esterilización por filtración final. Durante la etapa de diálisis, el volumen de la disolución dializada se concentró aproximadamente 3,5 veces en comparación con el volumen de partida.

55 El contenido de PDGF-AB se midió en el material antes cargar la muestra sobre la resina de cromatografía SDR y después de recoger la muestra de la resina SDR (tras la eliminación de solvente y detergente) en el proceso de producción de LYO II-LYO V. El porcentaje de recuperación de PDGF-AB en los diferentes procesos de producción (LYO II-LYO V) se muestra en la Tabla 4. Se midieron el contenido de PDGF-AB y bFGF usando un kit de ELISA comercial específico (inmunoensayo de PDGF-AB humano de Quantikine; fabricante: R&D Systems; cat. DHD00B, e inmunoensayos de bFGF humano de Quantikine HS cat. HSF00D; fabricante: R&D Systems, respectivamente).

Tabla 4: Recuperación de PDGF-AB y bFGF de columna de SDR en LYO II-V.

Número LYO	Paso	Contenido de PDGF-AB (ng)	Recuperación de PDGF-AB (%)	Contenido de bFGF (ng)	Recuperación de bFGF (%)
II	pre-SDR	24941		52	
	post-SDR	3942	16	18	35
III	pre-SDR	101313		160	
	post-SDR	10807	11	40	25
IV	pre-SDR	70609		218	
	post-SDR	9103	13	65	30
V	pre-SDR	86983		274	
	post-SDR	38884	45	102	37

Como se muestra en la Tabla 4, la adición de la etapa de elución con disolución no isocrática en la etapa de eliminación de S/D como se ha descrito anteriormente durante el procesamiento de LYO V produce mayor recuperación de PDGF-AB. La recuperación de PDGF-AB fue del 45 % con la etapa de elución en comparación con el 11-16 % de recuperación en ausencia de esta etapa – aumento de recuperación de aproximadamente 3 veces. Las concentraciones de PDGF-AB y bFGF también se midieron en el material liofilizado final tras la reconstitución con 4 ml de agua destilada doble (DDW). La concentración de PDGF-AB fue 15.028 pg/ml que se corresponde con  $2,26 \times 10^{-6}$  pg de PDGF-AB por plaqueta usado como material de partida. La concentración de bFGF fue 36 pg/ml que se corresponde con  $5,4 \times 10^{-9}$  pg de bFGF por plaqueta usado como material de partida.

#### **Ejemplo 13: El efecto de LYO V sobre la proliferación celular en células de fibroblasto.**

Se llevó a cabo el efecto de LYO V sobre la proliferación celular como se ha desarrollado en el Ejemplo 5 usando células albinas 3T3-Swiss.

Se reconstituyó LYO V, que se liofilizó a partir de una disolución de 4 ml y que se concentró 4 veces en comparación con el volumen de WAP de partida, en 0,5 ml de agua purificada estéril - concentrado 8 veces (32 veces concentrado en comparación con la concentración de partida de mezcla de WAP V). Tras la reconstitución, mezcla de WAP V o LYO V reconstituido se diluyeron sucesivamente 5 veces en el medio de inanición apropiado y se añadieron 10 µl de cada dilución a un pocillo que contenía 100 µl de medio de inanición. La concentración de partida de mezcla de WAP V se designó 1 y las diluciones sucesivas se calcularon en consecuencia. La concentración de partida de LYO V se designó 32 y las diluciones sucesivas se calcularon en consecuencia. Como patrón de control, se usó un PDGF-AB humano recombinante (R&D Systems; Cat. Número 222-AB-010). El PDGF-AB también se diluyó sucesivamente 5 veces en medio de inanición y se añadió a los pocillos (10 µl). Se detectaron concentraciones de varios factores de crecimiento en tanto WAP V como LYO V por ELISA (mismos kits que antes) y las concentraciones reales presentes en el pocillo (a la mayor concentración) durante el ensayo de proliferación son las siguientes: TGF-β - 159,4 y 169,8 ng/ml; bFGF 0,1 ng/ml y 0,029 ng/ml; VEGF - 0,89 y 1,05 ng/ml; PDGF-AB - 56,86 y 12 ng/ml en pocillos tratados con WAP V y LYO V, respectivamente.

La proliferación se evaluó 72 horas después del inicio del tratamiento usando el reactivo de proliferación celular WST-1 (se usaron células sin ningún aditivo como fondo y se restaron de los valores de DO). Al final del periodo de incubación (4 horas), las placas se agitaron durante 1 min y la absorbancia de las muestras se midió como se indica anteriormente. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado. Los resultados de DO obtenidos por el reactivo de proliferación celular WST-1 se representaron contra los valores de concentración de PDGF-AB calculados. Los resultados se muestran en la Fig. 17.

Los resultados muestran que concentraciones crecientes de LYO V o mezcla de WAP V afectaron el nivel de proliferación de células de fibroblastos albinos 3T3-Swiss siendo el efecto de LYO V ligeramente menos pronunciado. Esta evidente reducción fue debida a la normalización de los resultados a solo un factor de crecimiento (PDGF-AB) que está presente en la mezcla de LYO y cuya recuperación aumentó significativamente en comparación con los ejemplos previos. En particular, el efecto de ambos tratamientos (LYO V y WAP V) fue más pronunciado que PDGF-AB recombinante solo, que indica que otros componentes extraídos de plaquetas pueden potenciar sinérgicamente la proliferación de fibroblastos.

#### **Ejemplo 14: Comparación de las etapas de fabricación llevadas a cabo en LYO I - LYO IV preparadas en los ejemplos anteriores.**

La Tabla 5 resumen las principales etapas de fabricación llevadas a cabo en cada preparación de LYO.

Tabla 5: Principales etapas de fabricación llevadas a cabo en cada preparación de LYO.

Pase del proceso de fabricación principal	LYO I	LYO II	LYO III	LYO IV	LYO V
Tratamiento solvente-detergente	+	+	+	+	+
Pasteurización (inactivación viral por calor)		+	+	+	+
Concentración			+	+	+
Eliminación de agregados adicional				+	+
Paso de elución añadido a columna SDR*					+

\*La elución se llevó a cabo con una disolución no isocrática: tampón de acetato-glicina (acetato de sodio 20 mM y glicina 10 mM a pH 6,8 – 7,4) que contenía 10 % de etanol, NaCl 1 M y 0,2 % de HSA.

**Ejemplo 15: El nivel de contenido de agregados en el extracto de plaquetas preparado según la invención.**

La agregación no es deseable en productos farmacéuticos de proteína debido a que puede no solo comprometer la actividad biológica, sino también aumentar la probabilidad de efectos secundarios no deseables, por ejemplo, inmunogenicidad. La agregación también puede disminuir la estabilidad de las proteínas. En el siguiente ejemplo se determinó el contenido de agregados en los extractos de plaquetas preparados según la invención.

Para este fin, se determinó el nivel de agregación (turbidez) midiendo la densidad óptica a 320 nm (DO<sub>320</sub>) (que normalmente es indicativa de la presencia de agregados como se describe en espectroscopía de absorción ultravioleta, Mach H. et al., en Protein stability and folding, Ed. Shirley B.A. pp 91-114, 1995, Humana Press, New Jersey) y restando la lectura de DO<sub>320</sub> de albúmina de suero humano (HSA) que está presente a altas concentraciones en el extracto de plaquetas y se consideró que era una lectura de fondo. La turbidez normalizada (agregación) se obtuvo dividiendo la turbidez (absorbancia a 320 nm para una disolución sin diluir) entre la concentración de proteína [determinada por el ensayo de proteínas de Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, EE.UU.; Cat. número 23235)] antes de la resta.

Se calculó el nivel de agregados según la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{extracto de plaquetas } 0D320}{\text{mg de proteína/ml}} - \frac{\text{albúmina de suero humana } 0D320}{\text{mg de proteína/ml}} = \text{extracto de plaqueta } 0D320 \text{ por mg de proteína}$$

Un nivel de DO<sub>320</sub> calculado obtenido que fue inferior a  $\leq 0,03$  por mg de proteína se consideró un bajo contenido de agregados.

Se reconstituyeron diferentes extractos de plaquetas liofilizados preparados según los ejemplos anteriores (LYO II-V) en DDW (al mismo volumen que antes de la etapa de liofilización). En la siguiente etapa, se transfirió una muestra de 1 ml a cubetas de acrílico (Sarstedt, Cat. Número 67,740) y la DO se midió a 320 nm usando el espectrofotómetro Ultrospec 2100 pro (Amersham Pharmacia Biotech). En paralelo, el nivel de DO de HSA se midió a 320 nm (en los mismos parámetros que los extractos probados) y el nivel de agregados se calculó según la ecuación anterior (se usaron concentraciones de HSA diferentes y la lectura se dividió entre la proteína total de la disolución como se muestra en la ecuación).

Se encontró que el nivel de DO<sub>320</sub> calculado de todos los extractos de plaquetas probados era  $\leq 0,03$  por mg de proteína. Por tanto, los extractos de plaquetas preparados según la invención tuvieron bajo nivel de agregados.

**Ejemplo 16: Extracto de plaquetas liofilizado preparado a partir de mezclas de plaquetas de aféresis lavadas (WAP) reducidas en leucocitos, tratado con S/D, elución de SDR usando dos etapas de disoluciones no isocráticas, pasteurizado y concentrado.**

En este experimento se preparó un extracto de plaquetas liofilizado del siguiente modo: Se pesaron individualmente diez bolsas de WAP, se limpiaron con 70 % de etanol, se abrieron cortando y el material congelado se colocó en un vaso de precipitados grande que se sumergió en un baño de agua ajustado a 25 °C. Se pesó la bolsa vacía y se usó la diferencia de peso entre las bolsas vacías y las bolsas llenas para calcular el peso neto de

WAP. El peso neto total de mezcla de WAP fue 1906 gr. La mezcla de materiales se mezcló lentamente a 25 °C hasta que se descongeló completamente (misma condición de agitación que en el Ejemplo 9). La osmolaridad de la mezcla de WAP fue 267 mOs. Se añadieron 209 ml de tampón de acetato-glicina (a una concentración final de acetato sódico 20 mM, glicina 10 mM; a pH 6,8-7,4) y 0,2 % en v/v (de la disolución de volumen final) de albúmina de suero humano (HSA, Talecris EE.UU.) a la mezcla de WAP. Con el fin de mantener el nivel de osmolaridad tan constante como fuera posible durante todo el proceso, la osmolaridad del tampón se ajustó a la del material de partida de WAP usando NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Se llevó a cabo tratamiento con S/D como se ha descrito previamente añadiendo lentamente 1 % de Triton X-100 y 0,3 % de TnBP (v/v) a la mezcla de muestra mientras que se mezclaba a 50 rpm. Con el fin de evitar inactivación viral inferior a la óptima debido a la posible presencia de materia en partículas, la muestra se filtró durante el tratamiento con S/D. Primero, la muestra se agitó continuamente durante 30 minutos y luego se filtró a través de filtros Sartopure PP2 de 20 y 3 µm y Sartopore 2 de 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne, Francia). Entonces, el material filtrado se devolvió a un vaso de precipitados sumergido en un baño de agua ajustado a 25 °C y se mezcló a 50 rpm durante 2 horas adicionales para continuar el proceso de inactivación viral. La eliminación de S/D se llevó a cabo usando columna de cromatografía de líquidos XK50 rellena de 295 ml de resina de cromatografía de eliminación de solvente-detergente SDR HyperD (Pall Corp) conjuntamente con una bomba peristáltica y un detector de UV/VIS UA-6 + grabadora tipo 11 (ISCO, NE, EE.UU.). Se cargaron 1800 ml de extracto de plaquetas tratado con S/D (que contenía 1620 ml de material de plaquetas) sobre la columna, seguido de lavado con 600 ml de tampón de acetato-glicina + 0,2 % de HSA. La heparina se conoce por unirse a ciertos factores de crecimiento. Se exploró el efecto de la heparina en la recuperación de factores de crecimiento en la etapa de elución. Así, en este experimento, la elución se llevó a cabo con 600 ml de tampón de acetato-glicina que contenía 12,5 % de etanol, NaCl 0,5 M, 5 UI/ml de heparina (heparina sódica-Fresenius 5000 UI/ml, Bodene (PTY) Ltd, Sudáfrica) y 0,2 % de HSA. Esta etapa de elución fue seguida de una segunda etapa de elución llevada a cabo con 600 ml de tampón de acetato-glicina que contenía 10 % de etanol, NaCl 1 M y 0,2 % de HSA. La columna se lavó finalmente con 300 ml de agua purificada. Se recogieron y se mezclaron el material sin unir y eluido. Se recogió un volumen total de 3700 ml de la columna. El material recogido se filtró usando filtros Sartopure PP2 de 3 y 1,2 µm y Sartopore 2 de 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne, Francia). En la siguiente etapa, el extracto se sometió a estabilización y pasteurización como en el Ejemplo 4. La eliminación de los estabilizadores se llevó a cabo por diafiltración contra tampón de acetato-glicina (como antes). A continuación, la disolución dializada se concentró a un volumen de 450 ml (que es aproximadamente el 25 % del volumen de partida).

Para la estabilización, se añadió Manitol a la disolución a una concentración final del 2 % en peso/peso. Con el fin de eliminar material agregado, la muestra se filtró a través de filtro Sartopure PP2 de 3 µm y filtro Sartopore 2 de 0,45 µm. Se llevó a cabo esterilización por filtración bajo condiciones asépticas usando un filtro Sartopore 2 de 0,2 µm. A continuación, la muestra obtenida se tomó en alícuotas en porciones de 4 ml bajo condiciones asépticas y se liofilizó como se ha desarrollado anteriormente. El material liofilizado se selló en atmósfera de nitrógeno en vacío parcial (0,6 bar). El extracto de plaquetas liofilizado preparado anteriormente se denomina en el presente documento "LYO VI".

La etapa de purificación viral de LYO VI incluyó el tratamiento con S/D que incluyó una subetapa de filtración dentro del tratamiento con S/D. La filtración en esta etapa se llevó a cabo a través de filtros de 20, 3 y 0,45 µm. La etapa de SDR incluyó varias etapas de elución usando disoluciones no isocráticas, una de ellas comprendida de 5 UI/ml de heparina. Además, se llevó a cabo una etapa de pasteurización y una esterilización por filtración final. Durante la etapa de diálisis, el volumen de la disolución dializada se concentró 4 veces en comparación con el volumen de partida.

Se midió el contenido de PDGF-AB y bFGF en el material antes de cargar la muestra sobre la resina de cromatografía SDR y después de recoger la muestra de la resina SDR (tras la eliminación de solvente y detergente) en el proceso de producción de LYO II-LYO IV y en LYO VI. El porcentaje de recuperación de PDGF-AB y bFGF después de la columna de SDR en los diferentes procesos se muestra en la Tabla 6. El contenido de PDGF-AB y bFGF se midió usando el kit de ELISA comercial específico descrito anteriormente.

55

60

65

Tabla 6: Recuperación de PDGF-AB y bFGF de columna SDR en LYO II-VI.

LYO	Paso	Contenido de PDGF-AB (ng)	Recuperación de PDGF-AB (%)	Contenido de bFGF (ng)	Recuperación de bFGF (%)
II	pre-SDR	24941		52	
	post-SDR	3942	16	18	35
III	pre-SDR	101313		160	
	post-SDR	10807	11	40	25
IV	pre-SDR	70609		218	
	post-SDR	9103	13	65	30
V	pre-SDR	86983		274	
	post-SDR	38884	45	102	37
VI	pre-SDR	103811		196	
	post-SDR	42898	41	110	56

Como se muestra en la Tabla 6, la adición de una etapa de elución que comprende heparina mejoró significativamente no solo la recuperación de PDGF-AB, sino también la recuperación de bFGF. La recuperación de bFGF fue del 56 % en comparación con el 37 % de recuperación en ausencia de heparina en la disolución no isocrática (LYO V) – aumento de aproximadamente 1,5 veces en la recuperación. Cuando se compara la recuperación de bFGF en LYO VI con la recuperación en LYO II-IV, se observó un aumento de aproximadamente 2 veces.

La concentración de PDGF-AB y bFGF también se midió en el material de LYO VI final tras la reconstitución con 4 ml de agua destilada doble (DDW). La concentración de PDGF-AB y bFGF fue 4.578 y 127 pg/ml, respectivamente, que se corresponde con  $7 \times 10^{-7}$  pg de PDGF-AB por plaqueta y  $1,95 \times 10^{-8}$  pg de bFGF por plaqueta usado como material de partida.

#### **Ejemplo 17: El efecto de LYO VI sobre la proliferación celular en células de fibroblasto.**

Se llevó a cabo el efecto de LYO VI sobre la proliferación celular como se ha desarrollado en el Ejemplo 5 usando células albinas 3T3-Swiss.

Se reconstituyó LYO VI, que se liofilizó a partir de una disolución de 4 ml y que se concentró 4 veces en comparación con el volumen de WAP de partida, en 0,5 ml de agua purificada estéril - concentrado 8 veces en comparación con el extracto de plaquetas antes de la liofilización (en total, se concentró 32 veces en comparación con el volumen de partida de mezcla de WAP VI). Tras la reconstitución, la mezcla de WAP VI o LYO VI reconstituido se diluyeron sucesivamente 5 veces en el medio de inanición apropiado y se cargaron 10  $\mu$ l de cada dilución en un pocillo que contenía 100  $\mu$ l de medio de inanición. La concentración de partida de mezcla de WAP VI se designó 2,5 (ya que representa 2,5  $\mu$ l del extracto de plaquetas antes de la liofilización - se usaron 10  $\mu$ l de WAP que está 4 veces diluido en comparación con el extracto de plaquetas antes de la liofilización) y las diluciones sucesivas se calcularon en consecuencia.

La concentración de partida de LYO VI probado se designó 80 (ya que representa 80  $\mu$ l del extracto de plaquetas antes de la liofilización - 10  $\mu$ l de un material concentrado 8 veces tras la reconstitución del polvo liofilizado) y las diluciones sucesivas se calcularon en consecuencia. Se midieron las concentraciones de varios factores de crecimiento en tanto WAP VI como LYO VI por ELISA (mismos kits que antes). Las concentraciones reales añadidas al pocillo (a la mayor concentración) durante el ensayo de proliferación son las siguientes: TGF- $\beta$  - 180 y 2000 ng/ml; bFGF - 120 y 1000 pg/ml; VEGF - 1,1 y 11,7 ng/ml; PDGF-AB - 84,4 y 36,6 ng/ml; y EGF - 3,6 y 24,4 ng/ml, en pocillos tratados con WAP VI y LYO VI, respectivamente.

Como control positivo se usó PRP-R. PRP-R se preparó a partir de mezcla de PRP de 10 donantes. Brevemente, se centrifugaron 10 bolsas de sangre completa, 400 ml/bolsa (obtenidas de MDA, Banco de sangre, Israel) a 850 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se obtuvieron 80 ml del sobrenadante de cada bolsa, a continuación se centrifugaron por separado a 850 x g durante 10 minutos adicionales a temperatura ambiente. Se recogieron 30 ml (obtenidos de cada bolsa) del sobrenadante de PRP y se guardaron durante la noche a 2-8 °C. La PRP se activó al día siguiente con 1,5 ml de 1000 UI/ml de trombina y 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 2 M durante 1 hora a

temperatura ambiente, y a continuación se centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante de los 10 donantes se mezcló finalmente y se mezclaron juntos durante aproximadamente 10 minutos por movimiento vibrante. Esta mezcla de disolución madre de PRP-R (volumen total de 170 ml) se usó como material de PRP-R de partida para este experimento. Las concentraciones de TGF- $\beta$ , bFGF, VEGF, PDGF-AB y EGF en PRP-R fueron del siguiente modo: - 15 ng/ml; - 2 pg/ml; - 90 pg/ml; - 9 ng/ml; y - 80 pg/ml. PRP-R preparado se diluyó sucesivamente 5 veces en el medio de inaniación apropiado, y 10  $\mu$ l del PRP-R de partida y de cada dilución se añadieron a los pocillos. La concentración de partida de PRP-R se designó 10 (ya que es equivalente al extracto de plaquetas antes de la liofilización).

La proliferación se evaluó 48 horas después del inicio del tratamiento por incubación con el reactivo de proliferación celular WST-1 (se usaron células sin ningún aditivo como fondo y se restaron de los valores de DO). Al final del periodo de incubación (4 horas), las placas se agitaron durante 1 min y la absorbancia de las muestras se midió como se ha indicado anteriormente. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado. Los resultados de DO obtenidos por el reactivo de proliferación celular WST-1 se representaron contra los valores de concentración del extracto de plaquetas que en realidad se añadieron a las células (como se ha explicado anteriormente). Los resultados se muestran en la Fig. 18. Los resultados muestran que concentraciones crecientes de LYO VI, mezcla de WAP VI y PRP-R aumentaron el nivel de proliferación de células de fibroblastos albinos 3T3-Swiss siendo el efecto de LYO VI menos pronunciado.

**Ejemplo 18: Extracto de plaquetas liofilizado preparado a partir de mezclas de plaquetas de aféresis lavadas (WAP) reducidas en leucocitos, tratado con S/D, incubado con sulfato de dextrano, eluido en SDR con sulfato de dextrano, pasteurizado y concentrado.**

En este experimento se preparó un extracto de plaquetas liofilizado del siguiente modo: Se pesaron individualmente diez bolsas de WAP, se limpiaron con 70 % de etanol, se abrieron cortando y el material congelado se colocó en un vaso de precipitados grande que se sumergió en un baño de agua ajustado a 25 °C. Se pesó la bolsa vacía y se usó la diferencia de peso entre las bolsas vacías y las bolsas llenas para calcular el WAP neto. El peso neto total de la mezcla de WAP fue 1916 gr. La mezcla de materiales se mezcló lentamente a 25 °C hasta que se descongeló completamente (misma condición de agitación que en el Ejemplo 9). La osmolaridad de la mezcla de WAP fue 272 mOs. Se añadieron 211 ml de tampón de acetato-glicina (a una concentración final de acetato sódico 20 mM, glicina 10 mM; a pH 6,8-7,4) y 0,2 % en v/v (de la disolución de volumen final) de albúmina de suero humano (HSA, Talecris EE.UU.) en la mezcla de WAP. Con el fin de mantener el nivel de osmolaridad tan constante como fuera posible durante todo el proceso, la osmolaridad del tampón se ajustó a la del material de partida de WAP usando NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.).

Se llevó a cabo tratamiento con S/D como se ha descrito previamente añadiendo lentamente 1 % de Triton X-100 y 0,3 % de TnBP (v/v) a la mezcla de muestra mientras que se mezclaba a 50 rpm. Con el fin de evitar la inactivación viral inferior a la óptima debido a la posible presencia de materia en partículas, el tratamiento con S/D se dividió en dos partes. Primera, la muestra se agitó continuamente durante 30 minutos y luego se filtró a través de filtros Sartopure PP2 de 20 y 3  $\mu$ m y Sartopore 2 de 0,45  $\mu$ m (Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne, Francia). Entonces, el material filtrado se devolvió a un vaso de precipitados sumergido en un baño de agua ajustado a 25 °C y se mezcló a 50 rpm durante 2 horas adicionales para continuar el proceso de inactivación viral.

Se sabe que el sulfato de dextrano se une a ciertos factores de crecimiento. Así, se examinó el efecto de la adición del sulfato de dextrano sobre la recuperación de factores de plaquetas. Se añadió sulfato de dextrano (Sigma-Aldrich, Canadá; Cat. número D4911) a la muestra a una concentración final de 1 % (peso/peso) y se incubó a 25 °C mientras se agitaba a 50 rpm durante 20 minutos. La muestra se filtró usando filtro Sartopore PP2 de 5  $\mu$ m para eliminar materia en partículas.

A continuación, la eliminación de S/D se llevó a cabo usando columna de cromatografía de líquidos XK50 rellena de 295 ml de resina de cromatografía de eliminación de solvente-detergente SDR HyperD (Pall Corp) conjuntamente con una bomba peristáltica y un detector de UV/VIS UA-6 + grabadora tipo 11 (ISCO, NE, EE.UU.). La columna se equilibró con 900 ml de tampón de acetato-glicina que contenía 1 % de sulfato de dextrano y 0,2 % de HSA. Se cargaron 1800 ml de extracto de plaquetas tratado con S/D y sulfato de dextrano (que contenía 1620 ml de material de plaquetas) sobre la columna, seguido de una etapa de elución con 600 ml de tampón de acetato-glicina con 12,5 % de etanol, NaCl 0,5 M, 0,1 % de sulfato de dextrano y 0,2 % de HSA. Esto fue seguido de lavado con 600 ml de tampón de acetato-glicina que contenía 1 % de sulfato de dextrano y 0,2 % de HSA (considerar como no isocrática en comparación con la disolución usada en la etapa previa). A continuación, la columna se lavó con 300 ml de agua purificada. Se recogió un volumen total de 3000 ml de la columna. El material recogido se filtró usando filtros Sartopure PP2 de 3 y 1,2  $\mu$ m y Sartopore 2 de 0,45  $\mu$ m (Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne, Francia). En la siguiente etapa, el extracto se sometió a estabilización y pasteurización como en el Ejemplo 4. La eliminación de los estabilizadores se llevó a cabo por diafiltración contra tampón de acetato-glicina (como antes). A continuación, la disolución dializada se concentró a un volumen de 480 ml (que es aproximadamente el 27 % del volumen de partida).

Para la estabilización, se añadió Manitol a la disolución a una concentración final del 2 % peso/peso. Con el fin de eliminar el material agregado, la muestra se filtró secuencialmente a través de filtro Sartopure PP2 de 3 µm y filtro Sartopore 2 de 0,45 µm. Se llevó a cabo esterilización por filtración bajo condiciones asépticas usando un filtro Sartopore 2 de 0,2 µm. A continuación, el producto obtenido se tomó en alícuotas en porciones de 4 ml bajo condiciones asépticas y se liofilizó como se ha desarrollado anteriormente. El material liofilizado se selló en atmósfera de nitrógeno en vacío parcial (0,6 bar).

El extracto de plaquetas liofilizado preparado anteriormente se denomina en el presente documento "LYO VII". La etapa de purificación viral de LYO VII incluyó tratamiento con S/D que incluyó una subetapa de filtración dentro del tratamiento con S/D. La filtración en esta etapa se llevó a cabo a través de filtros de 20, 3 y 0,45 µm. El extracto de plaquetas se trató con sulfato de dextrano antes de la eliminación en SDR. La etapa de SDR incluyó varias etapas de elución usando disoluciones no isocráticas en presencia de sulfato de dextrano. Además, se llevó a cabo una etapa de pasteurización, y una esterilización por filtración final. Durante la etapa de diálisis el volumen de la disolución dializada se concentró aproximadamente 4 veces en comparación con el volumen de partida.

Se midió el contenido de PDGF-AB y bFGF en el material antes cargar la muestra sobre la resina de cromatografía SDR y después de recoger la muestra de la resina de SDR (tras la eliminación del solvente y detergente) en el proceso de producción de LYO II-LYO IV y en LYO VII. El porcentaje de recuperación de PDGF-AB y bFGF en los diferentes procesos de producción se muestra en la Tabla 7. Se midió el contenido de PDGF-AB y bFGF usando el kit de ELISA comercial descrito anteriormente.

Tabla 7: Recuperación de PDGF-AB y bFGF de columna SDR en LYO II-IV y en LYO VII

LYO	Paso	Contenido de PDGF-AB (ng)	% de recuperación de PDGF-AB	Contenido de bFGF (ng)	% de recuperación de bFGF
II	Pre-SDR	24941		52	
	Post-SDR	3942	16	18	35
III	Pre-SDR	101313		160	
	Post-SDR	10807	11	40	25
IV	Pre-SDR	70609		218	
	Post-SDR	9103	13	65	30
V	Pre-SDR	86983		274	
	Post-SDR	38884	45	102	37
VI	Pre-SDR	103811		196	
	Post-SDR	42898	41	110	56
VII	Pre-SDR	176249		130	
	Post-SDR	154262	88	110	85

Como se muestra en la Tabla 7, la adición de incubación con sulfato de dextrano y elución en presencia de sulfato de dextrano mejoró significativamente la recuperación de ambos, PDGF-AB y bFGF. La recuperación de bFGF fue el 85 % y la recuperación de PDGF-AB fue el 88 %. Sorprendentemente, la recuperación de PDGF-AB del material de partida en LYO VII aumentó del 1,5 % en LYO VI al 51 % en LYO VII. Además, la recuperación de VEGF del material de partida en LYO VII aumentó del 37 % en LYO VI al 73 % en LYO VII.

La concentración de PDGF-AB y bFGF también se midió en el material de LYO VII final tras la reconstitución con 4 ml de agua destilada doble (DDW). La concentración de PDGF-AB y bFGF fue 194.353 y 64 pg/ml, respectivamente, que se corresponde con  $3,12 \times 10^{-5}$  pg de PDGF-AB por plaqueta y  $1,03 \times 10^{-8}$  pg de bFGF por plaqueta usado como material de partida.

Estos hallazgos indican que la adición de sulfato de dextrano a las etapas de proceso tiene un efecto favorable sobre la recuperación de factores también aguas abajo de la columna de SDR.

#### **Ejemplo 19: El efecto de LYO VII sobre la proliferación celular en células de fibroblasto.**

Se llevó a cabo el efecto de LYO VII sobre la proliferación celular como se ha desarrollado en el Ejemplo 5 usando células albinas 3T3-Swiss.

Se reconstituyó LYO VII, que se liofilizó a partir de una disolución de 4 ml y que se concentró aproximadamente 4 veces en comparación con el volumen de WAP de partida, en 0,5 ml de agua purificada estéril - concentrado 8 veces (una concentración total de aproximadamente 32 en comparación con el volumen de partida de mezcla de WAP VII). Tras la reconstitución, la mezcla de WAP VII o LYO VII reconstituido se diluyeron sucesivamente 5 veces en el medio de inanición y se añadieron 10 µl de cada dilución a un pocillo que contenía 100 µl de medio de inanición. Como se ha explicado anteriormente, la concentración de partida de la mezcla de WAP VII se designó 2,5 y las diluciones sucesivas se calcularon en consecuencia, y la concentración de partida de LYO VII se designó 80 y las diluciones sucesivas se calcularon en consecuencia. Se midieron concentraciones de varios factores de crecimiento en tanto WAP VII como LYO VII por ELISA (mismos kits que antes) y las concentraciones reales añadidas al pocillo (a la mayor concentración) durante el ensayo de proliferación son las siguientes: TGF-β - 260 y 2800 ng/ml; bFGF - 190 y 510 pg/ml; VEGF - 1,1 y 21 ng/ml; PDGF-AB - 114 y 1550 ng/ml; PDGF-BB - 21 y 150 ng/ml; y EGF - 3,1 y 33,1 ng/ml, en WAP VII y LYO VII, respectivamente.

Adicionalmente, WAP VI y LYO VI, preparados como en el Ejemplo 16, se probaron en el mismo ensayo para la comparación de actividad (10 µl de las diluciones sucesivas descritas en el Ejemplo 16; la normalización a unidades del extracto de plaquetas se llevó a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 17).

La proliferación se evaluó 48 horas después del inicio del tratamiento usando el reactivo de proliferación celular WST-1 (se usaron células sin ningún aditivo como fondo y se restaron de los valores de DO). Al final del periodo de incubación con el reactivo (4 horas), las placas se agitaron durante 1 min y la absorbancia de las muestras se midió como se indica anteriormente. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado. Los resultados de DO obtenidos por el reactivo de proliferación celular WST-1 se representaron contra las unidades de extracto de plaquetas antes de la liofilización que en realidad se añadieron a las células (como se ha explicado anteriormente). Se llevaron a cabo análisis de dosis-respuesta sigmoides usando el software GraphPad Prism y los valores de CE<sub>50</sub> se muestran en el gráfico. Los resultados se muestran en la Fig. 19. Los resultados muestran claramente que LYO VII (CE<sub>50</sub> 1,26) es más potente en la inducción de la proliferación de fibroblastos en comparación con LYO VI (CE<sub>50</sub> 4,10), mientras que sus materiales de partida WAP VII y WAP VI (CE<sub>50</sub> 0,36 y 0,32, respectivamente) afectaron el nivel de proliferación de fibroblastos al mismo grado. El efecto proliferativo de LYO VII fue más pronunciado y más próximo a WAP de partida que de LYO VI.

**Ejemplo 20: Comparación de las etapas de fabricación llevadas a cabo en LYO II-VII preparado en los ejemplos anteriores.**

La Tabla 8 resume las etapas de fabricación llevadas a cabo en todas las preparaciones de LYO.

Tabla 8: Etapas de fabricación llevadas a cabo en todas las preparaciones de LYO.

Pasos del proceso de fabricación	LYO I	LYO II	LYO III	LYO IV	LYO V	LYO VI	LYO VII
Tratamiento solvente-detergente	+	+	+	+	+	+	+
Pasteurización (inactivación viral por calor)		+	+	+	+	+	+
Concentración			+	+	+	+	+
Eliminación de agregados adicional				+	+		
Incubación adicional con sulfato de dextrano							+
Paso de elución añadido a columna SDR usando una solución no isocrática					+*	+**	+***
* La elución se llevó a cabo en presencia de etanol y NaCl. * La elución se llevó a cabo en presencia de heparina. *** La elución se llevó a cabo en presencia de sulfato de dextrano.							

**Ejemplo 21: La relación entre varios factores de crecimiento en extractos de plaquetas preparados según la invención.**

El siguiente ejemplo muestra la relación entre varios factores de crecimiento en el extracto de plaquetas preparado según la invención; y examina si la relación obtenida es próxima a la relación fisiológica. La relación fisiológica se calculó según los valores del factor de crecimiento en el suero. Los valores se obtuvieron de los prospectos del kit de ELISA específico usado para las mediciones de factores de crecimiento anteriormente.

El suero es plasma sanguíneo sin fibrinógeno u otros factores de coagulación. El suero contiene factores liberados por plaquetas activadas.

Se midieron los niveles de TGF-b1, PDGF-AB y VEGF en LYO VII (tras su reconstitución en 4 ml de DDW) usando el kit de ELISA comercial específico descrito anteriormente, y se calcularon las relaciones entre PDGF-AB : TGFb1 y PDGF-AB : VEGF. El nivel de factores de crecimiento y las relaciones se muestran en la Tabla 9 y 10, respectivamente, a continuación.

Tabla 9: Niveles\* de TGF-b1, PDGF-AB y VEGF en LYO VII y en el suero.

Factor de crecimiento	Suero**	LYO VII
TGF-b1	40	343
PDGF-AB	20	194
VEGF	0.22	2.6
* Los valores son en ng/ml. * Media de valores detectables en el suero obtenida de los prospectos del kit de ELISA específico usado para las mediciones anteriores.		

Tabla 10: Relación de factores de crecimiento calculada en LYO VII y en el suero.

	Proporción PDGF-AB : TGF-b1	Proporción PDGF-AB : VEGF
Suero	0.5	90.9
LYO VII	0.56	74

Los resultados presentados en la Tabla 10 muestran que LYO VII comprende una relación de PDGF-AB : TGF-b1 de 0,56 (similar a la relación fisiológica en el suero - 0,5); y una relación de PDGF-AB : VEGF de 74. Se encontró que ambas relaciones estaban dentro de la relación calculada en los materiales de partida (WAP) de los ejemplos anteriores.

**Ejemplo 22: La actividad de coagulación de extracto de plaquetas preparado según la invención.**

El siguiente experimento tuvo como objetivo determinar si LYO VI-VII tiene una actividad pro-coagulante. La presencia de factores de coagulación activados en los extractos de plaquetas se evaluó por la prueba de medición del tiempo de tromboplastina parcial no activada (NAPTT). Esta prueba se basa en el ensayo descrito en la Farmacopea Europea 7.0.; 2.6.22: Activated coagulation factors monograph (01/2008:20622); en la Farmacopea Europea de Estrasburgo (Francia), Consejo de Europa, 2009.

En general, la prueba incluye la adición de fosfolípidos (cefalina de cerebro de conejo, Pel-Freez, Cat. Número 41053-2) y calcio a plasma humano para permitir el inicio de la cascada de coagulación. Los factores de coagulación no activos contenidos en el plasma patrón humano (Unicalibrator, Diagnostica Stago, cat. 0625 o Coagulation Reference, TC technoclone, ref. 5220120) experimentan activación tras la adición de una muestra que contiene factores de coagulación activos que conducen a la transformación de protrombina del plasma en trombina activa. Como resultado, el fibrinógeno del plasma se transforma inmediatamente en fibrina insoluble (formación de coágulos) y el tiempo de coagulación puede medirse por un coagulómetro (instrumento de coagulación STart4, Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, Francia). El proceso de activación de factores en la muestra de control de referencia anterior normalmente dura 4-7 minutos. En un experimento paralelo, una muestra de extracto de plaquetas se añade al plasma patrón humano y se mide el tiempo de coagulación como antes. El resultado obtenido se divide entre el resultado de la muestra de control de referencia. La relación calculada sirve de medida de la actividad pro-coagulante de la muestra de extracto de plaquetas probada. Una relación inferior a 1 significa que la muestra probada contiene factores de coagulación activados y así tiene una actividad pro-coagulante.

El extracto de plaquetas probado se reconstituyó con 4 ml de agua purificada (PuW) antes de la medición.

Tabla 11: Actividad pro-coagulante de LYO VI-VII.

	Proporción* tiempo de muestra/tiempo de control
LYO VI	1.2
LYO VII	1.3
* Promedio de tres mediciones.	

Los resultados presentados en la Tabla 11 muestran que el extracto de plaquetas preparado según la invención no tiene una actividad pro-coagulante como se ha evaluado por el ensayo de NAPTT.

**Ejemplo 23: Determinación de la presencia de factores de coagulación en el extracto de plaquetas preparado según la invención.**

El siguiente experimento tuvo como objetivo determinar si LYO VI-VII comprenden factores de coagulación. La presencia de factores de coagulación (factores activados y no activados) en los extractos de plaquetas se determinó por el tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT) [también conocido como el tiempo de coagulación con cefalina y caolín (KCCT); o tiempo de tromboplastina parcial con caolín (PTTK)].

El APTT es una prueba de cribado de la coagulación general de la vía de coagulación intrínseca que puede evaluar el potencial de muestras derivadas del plasma para experimentar coagulación. El APTT detecta la presencia de los siguientes factores de coagulación: factores XII, XI, IX, VIII, X, V, II (pro-trombina) y I.

El ensayo implica la recalcificación de plasma en presencia de una cantidad normalizada de cefalina (es decir, fosfolípidos) y un activador del factor XII (caolín). El ensayo se diseña como una prueba de límite, en la que la muestra probada no debe mostrar coagulación después de 999 segundos.

El ensayo se llevó a cabo usando reactivos de KIT C.K. PREST®, Diagnostica Stago, ref. 00597 (que contiene reactivo 1 y reactivo 2) según las instrucciones del fabricante. LYO probado se reconstituyó con 4 ml de agua purificada (PuW) antes de llevar a cabo la prueba de APTT.

Tabla 12: Determinación de la presencia de factores de coagulación.

Muestra	Réplicas (nombre)	Tiempo de coagulación (seg)	Media (seg)	Duplicado de RSD* (%)
Solución de idoneidad Sys (Control Positivo)	1	30.0	30.4	1.6
	1	30.7		
	2	30.9	30.9	
	2	30.8		
LYO VI	1	>999	>999	
	1	>999		
	2	>999		
	2	>999		
LYO VII	1	>999	>999	
	1	>999		
	2	>999		
	2	>999		

\*RSD - Desviación estándar relativa.

Los resultados muestran que según la prueba de APTT, el extracto de plaquetas según la invención es deficiente en uno o más de los factores de coagulación XII, XI, IX, VIII, X, V, II y I, haciendo el extracto no coagulable.

**Ejemplo 24: El efecto del extracto de plaquetas preparado según la invención sobre el nivel de angiogénesis y curación global en un modelo *in vivo*.**

El efecto del extracto de plaquetas preparado según la invención sobre la angiogénesis y la curación global se examinó usando el modelo de implantación subcutánea en ratas. Este modelo se usa comúnmente para evaluar la respuesta del tejido, angiogénesis y curación global en el tejido implantado [Organización Internacional para la Normalización (ISO) 10993-6, Biological Evaluation of Medical Devices - Part 6: Tests for Local Effects After Implantation (2007)].

Los dos parámetros se evaluaron 3 y 7 días tras la implantación.

Se usaron 10 ratas hembra en este experimento. Cada animal tuvo dos bolsillos subcutáneos quirúrgicamente creados en los tejidos subcutáneos a lo largo de ambos lados del lomo (4 bolsillos en total). Cada bolsillo se llenó con uno de los siguientes artículos probados: sellante de fibrina + 1X extracto de plaquetas, sellante de fibrina + 0,1X extracto de plaquetas (10 % de la cantidad de extracto de plaquetas usada en 1X), sellante de fibrina solo y solución salina.

Preparación y administración de los artículos probados:

Sellante de fibrina + 1X extracto de plaquetas - Se preparó 1X extracto de plaquetas reconstituyendo un extracto de plaquetas liofilizado preparado a partir de una disolución de extracto de plaquetas de 4 ml como en el Ejemplo 16 (similar a la preparación de LYO VI) con 2 ml de disolución de fibrinógeno (una disolución como en el componente BAC de sellante de fibrina EVICEL™, Omrix Biopharmaceuticals Ltd.). Se mezclaron 100 µl de mezcla de extracto de plaquetas-fibrinógeno con 100 µl de disolución de trombina (una disolución como en el componente de trombina de sellante de fibrina EVICEL™, Omrix Biopharmaceuticals Ltd., pero diluido a una concentración de 20 UI/ml en disolución de cloruro de calcio 40 mM; la concentración de trombina final fue 10 UI/ml). La mezcla de extracto de plaquetas-fibrinógeno-trombina de 200 µl se administró a uno de los bolsillos anteriormente creados.

Sellante de fibrina + 0,1X extracto de plaquetas - Se preparó 1X extracto de plaquetas liofilizando 400 µl de disolución de extracto de plaquetas preparada como en el Ejemplo 16 y reconstituyendo el liofilizante con 2 ml de disolución de fibrinógeno. Se mezclaron 100 µl de la mezcla de extracto de plaquetas-fibrinógeno de ml con 100 µl de disolución de trombina diluida (las disoluciones de fibrinógeno y trombina diluida usadas son como se han especificado anteriormente). Se administró la mezcla de extracto de plaquetas-fibrinógeno-trombina de 200 µl en un segundo bolsillo.

Las cantidades de varios factores de crecimiento en realidad administrados en 0,1X y 1X, respectivamente: TGF-β1: 5,27 y 52,7; PDGF-AB 0,1 y 1,05; bFGF 0,0024 y 0,024; y VEGF 0,023 y 0,23 ng (administrados con 200 µl de sellante de fibrina).

Sellante de fibrina - Se mezclaron 100 µl de disolución de fibrinógeno con 100 µl de disolución de trombina diluida (como antes). La mezcla final se administró en el tercer bolsillo.

Solución salina – Se administraron 200 µl de solución salina en el cuarto bolsillo y se usaron como grupo de control.

La administración de los cuatro artículos probados se llevó a cabo adyacente a un marcador de localización [polietileno de alta densidad esterilizado con vapor (HDPE) 1 mm x 1 mm x 5 mm de tamaño] localizado dentro de cada bolsillo (con el fin de marcar la localización exacta de la administración para evaluaciones posteriores).

Se sacrificaron humanamente cinco animales en cada momento de tiempo (día 3 y 7 después del implante) y los cuatro sitios de implante (de cada animal en cada momento de tiempo) se recogieron y se sumergieron en 10 % de formalina tamponada neutra. Se cortaron múltiples secciones de cada sitio de implante y las secciones se procesaron para evaluación microscópica. Las secciones de histología se tiñeron con hematoxilina y eosina.

La angiogénesis y curación global en la región implantada de los diferentes grupos probados se evaluaron microscópicamente usando la escala de clasificación subjetiva especificada:

Escala de clasificación de angiogénesis:

0 = ninguna; 1 = mala: limitada, focal o segmentaria con penetración limitada del artículo, 1-3 yemas neovasculares y estructuras de soporte fibroblástico limitadas; 2 = favorable: focal, multifocal o difusa con penetración en el artículo y grupos de capilares evidentes con soporte fibroblástico adecuado; 3 = buena: artículo completamente penetrado por tejido y capilares con estructuras de soporte fibroblástico; y 4 = excelente: mejor de lo esperado para el intervalo de estudio evaluado.

Escala de clasificación de cicatrización global:

0 = ninguna; 1 = mala: inferior al sitio de implante de control, inferior a lo esperado para el procedimiento quirúrgico y tiempo después del implante; 2 = favorable: casi o igual que los sitios de implante de control, aproximadamente lo que se espera para el procedimiento quirúrgico y tiempo después del implante; 3 = buena: ligeramente mejor que lo esperado para el procedimiento quirúrgico y tiempo después del implante; y 4 = excelente: superior a lo esperado para el tiempo después del implante.

El valor de puntuación promedio para la angiogénesis y curación de los diferentes artículos probados se muestra en la Tabla 13 más adelante.

Tabla 13: Puntuación promedio de angiogénesis y curación global tras la implantación de los diferentes artículos probados en los diferentes intervalos de tiempo.

Intervalo de Estudio (días)	Artículo probado	Puntuación de angiogénesis	Puntuación de curación global*
3 días	Sellador de fibrina + 1X extracto de plaquetas	1.0	NA
	Sellador de fibrina + 0.1X extracto de plaquetas	1.0	NA
	Sellador de fibrina	1.0	NA
	Solución salina	0.8	NA
7 días	Sellador de fibrina + 1X extracto de plaquetas	2.0	3-4
	Sellador de fibrina + 0.1X extracto de plaquetas	1.4	2-3
	Sellador de fibrina	1.0	1-2
	Solución salina	0.0	2

\* La curación global no pudo puntuarse apropiadamente 3 días tras la implantación debido al intervalo de estudio muy corto (sin tiempo suficiente para que la "curación" fuera microscópicamente evidente).

No se observó efecto perjudicial tras el tratamiento con los diversos artículos probados en ambos intervalos (como se ha determinado microscópicamente por la presencia de bajos números de macrófagos y linfocitos en el sitio del implante).

No se observaron diferencias significativas o tendencia entre los diferentes artículos probados en los dos parámetros probados 3 días después de la implantación. Así, el intervalo de 3 días sirvió de nivel inicial para el restante intervalo del estudio.

7 días después del implante, el sellante de fibrina + 1X extracto de plaquetas se asoció a más angiogénesis y mejor curación global en comparación con los otros artículos probados (véase la Tabla 13 con la puntuación promedio). El grado de angiogénesis del 7 día para el sellante de fibrina + 1X extracto de plaquetas fue superior al observado 3 días después del implante.

El sellante de fibrina + 0,1X extracto de plaquetas mostró una tendencia hacia más angiogénesis y mejor curación global en comparación con sellante de fibrina solo y artículos probados de solución salina.

**Ejemplo 25: El efecto de diferentes condiciones no isocráticas durante una etapa de elución en la etapa de**

**eliminación de S/D.**

En el siguiente ejemplo se examinó el efecto de diferentes condiciones de elución durante la etapa de eliminación de S/D en HIC sobre la recuperación de PDGF-AB y bFGF.

Los experimentos se llevaron a cabo usando dos tipos diferentes de resinas hidrófobas: HyperD SDR (PALL) y C-18 (Aguas). Ambas están basadas en sílice. C-18 tiene un resto de polímero hidrófobo de 18 carbonos, mientras que HyperD tiene un polímero hidrófobo reticulado a perlas de sílice e implica una adsorción en modo mixto de un efecto de exclusión molecular [Guerrier L et al. "Specific sorbent to remove solvent-detergent mixtures from virus-inactivated biological fluids". J Chromatogr B Biomed Appl. 1995 Feb 3;664(1):119-125]. Se rellenaron 2 ml de la resina en una columna Bio-Rad de 1 cm de diámetro (experimentos a pequeña escala). La velocidad de flujo máxima usada fue: 0,3 ml/min.

En todos los experimentos a continuación, el lisado de plaquetas tratado con S/D se preparó del siguiente modo: 10 ml de plaquetas de aféresis lavadas (WAP) reducidas en leucocitos que contenían acetato sódico 20 mM, glicina 10 mM y 1 % de HSA v/v (de la disolución de volumen final) se descongelaron a 37 °C (el material de mezcla de WAP se congeló después de la adición de tampón de acetato-glicina-HSA). En la siguiente etapa, se añadieron 1 % de Triton X-100 y 0,3 % de TnBP a la disolución, y la disolución se incubó y se mezcló (sobre un agitador rotatorio para tubos) a temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C) durante 2 horas para la lisis de plaquetas y tratamiento antiviral. A continuación, el lisado se filtró a través de filtros de jeringa de 10  $\mu$ m y 5  $\mu$ m para eliminar cualquier materia en partículas.

A menos que se indique lo contrario, la columna rellena con las resinas se lavó antes de cargar el lisado tratado con S/D con 10 ml de agua purificada, y se equilibró con 10 ml de tampón de acetato-glicina-HSA (mismas concentraciones que antes; al nivel de pH probado). En la siguiente etapa, 9 ml del lisado tratado con S/D se cargaron sobre la columna, seguido de lavado con 10 ml de tampón de acetato-glicina + HSA (mismas concentraciones que antes; al nivel de pH probado). Esta etapa de lavado fue seguida de diferentes etapas de elución con 10 ml de un tampón de acetato-glicina-HSA complementado (una disolución no isocrática) como se desarrolla más adelante. El material lavado y eluido se recogió y se mezcló.

En todos los experimentos, el contenido de PDGF-AB y bFGF se midió en el lisado antes cargar la muestra a la resina de cromatografía y después de recoger la muestra de la resina (tras la eliminación del solvente y detergente), y el porcentaje de recuperación del factor se calculó en las etapas de elución diferentes. El contenido de ambos factores se midió usando el kit de ELISA comercial específico descrito anteriormente.

El primer conjunto de experimentos examinó el efecto del contenido de NaCl y el nivel de pH del tampón de acetato-glicina-HSA durante la eliminación de S/D sobre la recuperación de PDGF-AB. Se complementó tampón de acetato-glicina-HSA con diferentes concentraciones de NaCl (0,3-1,5 M), y se llevó a cabo una etapa de elución en SDR usando el tampón complementado como disolución no isocrática.

Tabla 14: El efecto de la concentración de NaCl y pH sobre la recuperación de PDGF-AB de resina SDR o C-18.

	Resina	pH	Concentración de NaCl (M)	Recuperación de PDGF-AB (%)
1	C-18	5.5	0.3	19.0
2	C-18	7	0.5	19.8
3	C-18	7	0.7	20.6
4	C-18	7	1	31.4
5	C-18	5.5	1	30.5
6	C-18	7	1.5	24.4
7	SDR	7	0.7	30.2
8	SDR	7	1.5	32.4

Los resultados muestran que si se usa una resina C-18, existe una correlación positiva entre la concentración de NaCl en el tampón de elución y la recuperación de PDGF-AB tras HIC usando una concentración que oscila de 0,3 M hasta NaCl 1 M. Se obtuvieron resultados óptimos a una concentración de 1 M (recuperación de aproximadamente el 30 % de PDGF-AB). El pH probado no afectó la recuperación.

Si se usa resina de SDR, se obtuvieron recuperaciones similares en todas las concentraciones probadas de

NaCl (0,7 y 1,5 M). Por tanto, se observó que se obtuvo una mayor recuperación de PDGF-AB si se usa SDR como resina en comparación con si se usa C-18 como resina (compárese la recuperación de PDGF-AB en 3 y 7).

Otro conjunto de experimentos examinó el efecto de la adición de tanto NaCl como etanol al tampón de acetato-glicina-HSA durante la eliminación de S/D sobre la recuperación de PDGF-AB de una columna SDR o C-18. Para este fin, se complementó tampón de acetato-glicina-HSA con diferentes concentraciones de NaCl y etanol y una etapa de elución en SDR se llevó a cabo usando el tampón complementado como disolución no isocrática.

Tabla 15: Eficiencia de elución de NaCl y etanol sobre la recuperación de PDGF-AB de columna de SDR o C-18.

	Resina	pH	NaCl (M)	EtOH (%)	Recuperación de PDGF-AB (%)
1	C-18	7	0.5	10	28.2
2	C-18	7	0.5	20	32.1
3	C-18	7	1.0	20	48.8
4	SDR	7	0.5	20	46.8
5	SDR	7	1.0	10	41.7
6	SDR	7	1.0	20	73.1

Los resultados muestran que añadir etanol a la disolución, además de NaCl, produjo una mayor recuperación en comparación con usar NaCl solo (compárese 1 y 2 de la Tabla 15 con 2 de la Tabla 14; y 3 de la Tabla 15 con 4 de la Tabla 14). También se observó que la recuperación de PDGF-AB máxima se obtuvo con NaCl 1 M y 20 % de etanol en ambos tipos de resina teniendo la resina SDR una mayor recuperación.

En el conjunto previo de experimentos se mostró que se obtuvo una recuperación de PDGF-AB máxima con tampón de acetato-glicina-HSA complementado con NaCl 1 M y 20 % de etanol en ambos tipos de resina. En el siguiente conjunto de experimentos se evaluó la eficacia de la eliminación de material de S/D (TritonX-100 y TnBP) bajo las mismas condiciones (tampón de acetato-glicina-HSA complementado con NaCl 1 M y 20 % de etanol). Digno de mención, el límite aceptable de cada uno de Triton X-100 y TnBP en productos derivados de la sangre es 5 µg/ml. La concentración de Triton X-100 y TnBP en las fracciones recogidas se midió tras la etapa de eliminación de S/D. Se determina Triton x-100 por HPLC de fase inversa con un detector de UV, y se determina TnBP por cromatografía de gases capilar usando un detector de ionización de llama. El nivel de material de S/D también se evaluó en un lisado tratado con S/D preparado de una manera similar a LYO IV que no se sometió a elución por condiciones no isocráticas (preparación a gran escala, pero el procedimiento se detuvo tras la etapa de eliminación de S/D). Los resultados se muestran en la Tabla 16 más adelante.

Tabla 16: Concentración de material de S/D en el material recogido después de cromatografía en SDR o C-18.

	Resina	pH	NaCl (M)	EtOH (%)	TritonX-100 (mg/ml)	TnBP (mg/ml)
1	C-18	7	0.5	10	0.3	<0.2
2	C-18	7	0.5	20	0.2	<0.2
3	C-18	7	1.0	20	0.6	<0.2
4	SDR	7	0.5	20	0.3	<0.2
5	SDR	7	1.0	20	5.7	2.5
similar a LYOIV	SDR	7	1.0	10	<0.2	NA*
*NA – no disponible						

Los resultados muestran que llevar a cabo una etapa de elución con NaCl 1 M y 20 % de etanol (determinada como eficaz para la recuperación de PDGF-AB en los experimentos previos) se produjo en presencia de cantidades relativamente altas de material de S/D (por ejemplo, una concentración de Triton X-100 de 5,7 ó 0,6 µg/ml) en la disolución de plaquetas. Sin embargo, cuando se usaron menores concentraciones de NaCl y/o etanol, menores concentraciones de tanto TritonX-100 como TnBP se detectaron en la disolución de plaquetas tras la etapa de eliminación de material de S/D.

Por tanto, los resultados muestran que bajo las mismas condiciones experimentales, se detectó menos material de S/D si se usa resina C-18 en comparación con usar resina SDR (compárese 2 con 4; y 3 con 5).

5 En la siguiente etapa, se examinó la recuperación de b-FGF llevando a cabo una etapa de elución durante la etapa de SDR con una combinación de NaCl y etanol. Se examinaron diferentes fuerza iónicas y diferentes concentraciones de etanol. En este experimento se usó resina SDR.

10 Tabla 17: El efecto de NaCl y etanol añadido al tampón de acetato-glicina-HSA sobre la recuperación de bFGF de la columna de SDR.

	pH	NaCl (M)	EtOH (%)	Recuperación de b-FGF (%)
15 1	8	0	0	9.6
2	7	0.5	20	15.4
20 3	8	0.5	20	24.3
4	7	1	10	18.5
5	8	1	10	21.5

25 Los resultados mostraron que las condiciones no isocráticas probadas que se mostró que mejoraban eficazmente la recuperación de PDGF-AB tuvieron un efecto más pequeño sobre la recuperación de b-FGF (compárese 1 con 2-5).

30 Con el fin de intentar aumentar la recuperación de b-FGF y adicionalmente aumentar la recuperación de PDGF-AB durante la etapa de elución, se examinó el efecto de la adición de heparina de la disolución no isocrática. Se probó heparina, ya que se sabe que se une a algunos factores de crecimiento. En este experimento se usó una resina de SDR. Los resultados de la recuperación de b-FGF bajo las diferentes condiciones de elución se muestran en la Tabla 18 a continuación.

35 Tabla 18: El efecto de heparina combinada con NaCl/etanol durante una etapa de elución sobre la recuperación de b-FGF de columna de SDR.

	pH	Heparina (IU/ml)	NaCl (M)	EtOH (%)	Recuperación de b-FGF (%)
40 1	7	10	0	0	16.4
2	7	100	0	0	17.5
45 3	7	2	0.5	12.5	44.3
4	7	5	0.5	12.5	44.8
5	7.5	5	0.5	15	44.2
50 6	7	30	0.5	15	55
7	7.3	5	1.0	10	22.1

55 Los resultados mostraron que la heparina sola a concentraciones de 10 y 100 UI/ml tuvo un bajo efecto positivo (compárese 1 y 2 de la Tabla 18 con 1 de la Tabla 17). Sin embargo, la combinación de heparina a un intervalo de concentración de 2-30 UI/ml con NaCl a una concentración de 0,5 M y etanol a un intervalo de concentración de 12,5-15 % produjo una elevada recuperación sinérgica de b-FGF en comparación con usar heparina sola (compárese 3-6 con 1-2). Un aumento en la concentración de NaCl de 0,5 M a 1 M junto con reducción de la concentración de etanol al 10 % produjo una disminución de la recuperación a aproximadamente el 22 %.

60 Los resultados también mostraron que bajo las condiciones probadas, la adición de heparina durante la etapa de elución no afectó la recuperación de PDGF-AB (datos no mostrados).

65 Con el fin de intentar aumentar adicionalmente la recuperación de PDGF-AB y b-FGF de la columna de

SDR, en el siguiente experimento el lisado se incubó con sulfato de dextrano antes de la etapa de eliminación de S/D y/o se añadió a las etapas de elución. Al igual que la heparina, el sulfato de dextrano es un polisacárido sulfatado que puede unirse a diversos factores de crecimiento y estabilizar b-FGF y VEGF [Kajio, Kawahara & Kato (1992) FEBS v306 p243-6; Huang et al., (2007) Biomacromolecules v8 p1607-14]. Los lavados y las eluciones se llevaron a cabo en el orden desarrollado en la Tabla 19.

Se probó sulfato de dextrano (0,1 % o 1 %) solo o en combinación con NaCl y EtOH. La incubación del lisado con sulfato de dextrano (condición I-L) se llevó a cabo durante 15 min a temperatura ambiente.

Tabla 19: Recuperación de PDGF-AB y FGF en condiciones diferentes

Con.	Incubación antes de eliminación de S/D	Tampón eq.	Tampón de elución 1			Tampón de elución 2			PDGF-AB (%)	b-FGF (%)
			NaCl (M)	EtOH (%)	S.D. (%)	NaCl (M)	EtOH (%)	S.D. (%)		
A*	ninguno	AGH	0.5	12.5	5 IU/ml Heparin	1	10	---	27	49
B*	ninguno	AGH	1	10	---	0.5	12.5	5 IU/ml Heparin	29	26
C*	ninguno	AGH	---	---	1	1	10	1	38	22
D*	ninguno	AGH	1	10	1	---	---	1	36	28
E*	ninguno	AGH	---	---	1	0.5	12.5	0.1	38	32
F*	ninguno	AGH	0.5	12.5	0.1	---	---	1	38	40
G*	ninguno	AGH	0.5	12.5	0.1	1	10	1	44	33
H*	ninguno	AGH	1	10	1	0.5	12.5	0.1	47	33
I**	1% S.D.	AGH + S.D. 1%	0.5	12.5	0.1	---	---	1	53	40
J**	1% S.D.	AGH + S.D. 1%	1	10	1	0.5	12.5	0.1	60	46
K	1% S.D.	AGH + S.D. 1%	0.5	12.5	0.1	---	---	1	62	51
L	1% S.D.	AGH + S.D. 1%	1	10	1	0.5	12.5	0.1	55	40

\*Las condiciones incluyeron una etapa de lavado con Ac-Gly-HSA antes de la elución 1.

\*\* Las condiciones incluyeron una etapa de elución adicional con tampón de acetato-glicina-HSA antes de la elución 1 y 2.

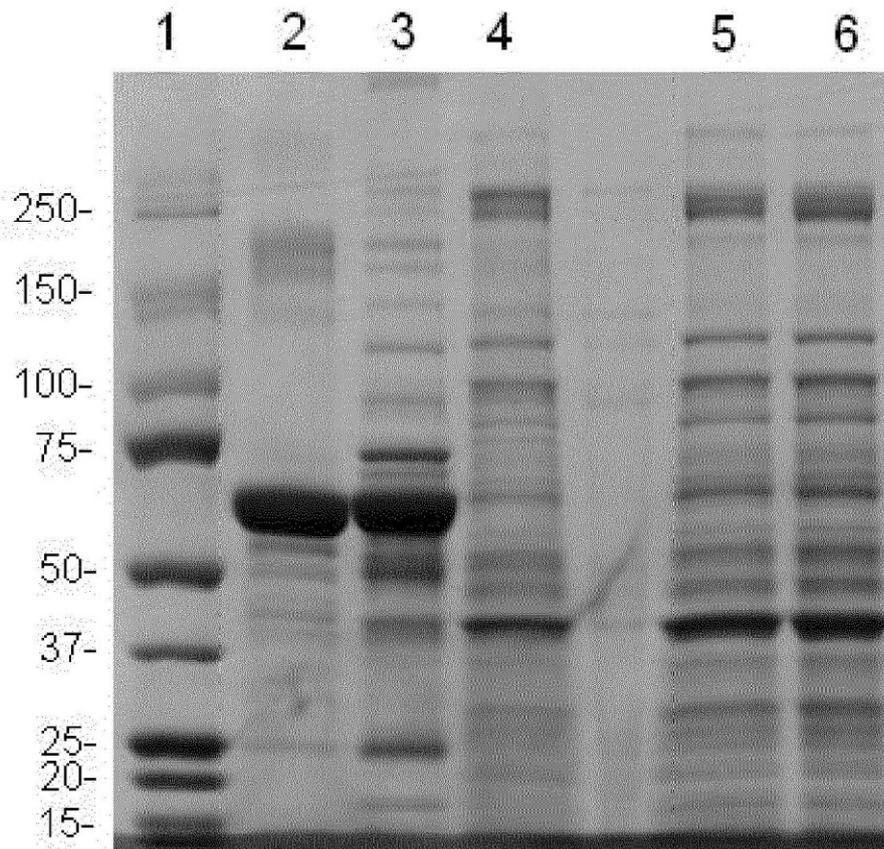
“Condiciones”- se abrevia Con.; “Equilibrio”- se abrevia Eq.; “Acetato-glicina-HSA” - se abrevia AGH; “Sulfato de dextrano”- se abrevia S.D.

Como se observa en la Tabla 19, la secuencia de disoluciones de elución desempeña una función en el nivel de recuperación de PDGF-AB y b-FGF. Por ejemplo, compárese la recuperación de la condición A con B o E y F, en la que el orden de elución se invirtió y se afectó la recuperación de los factores de crecimiento.

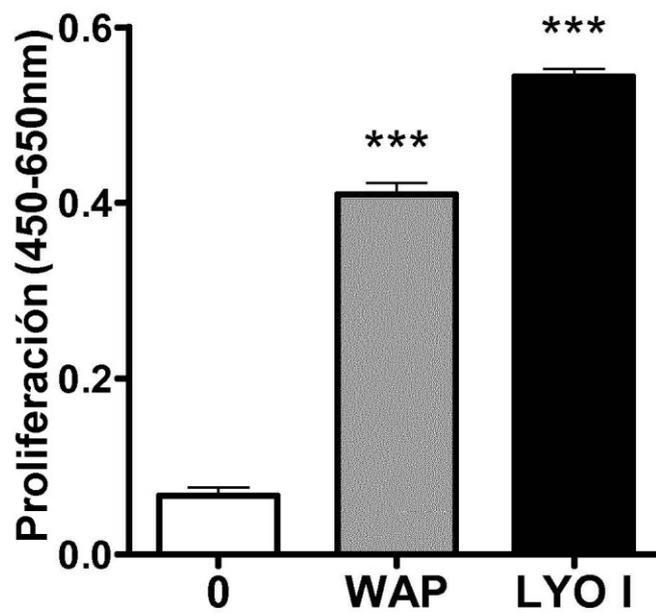
Por tanto, la composición de tampón afecta la recuperación de los factores de crecimiento probados, siendo la condición K la más favorable para la recuperación de PDGF-AB y b-FGF (62 % y 51 %, respectivamente).

**REIVINDICACIONES**

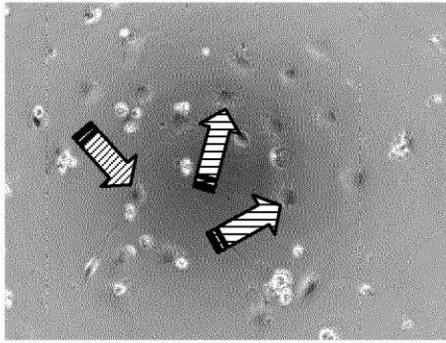
- 5 **1.** Un extracto de plaquetas seguro para virus activo derivado de múltiples donantes que comprende una mezcla de factores de crecimiento celular de plaquetas biológicamente activas y/o factores tróficos para su uso en terapia, el extracto de plaquetas comprendiendo PDGF-AB, b-FGF, VEGF y TGFb1, en donde la proporción para PDGF-AB: VEGF es por lo menos 74 y la proporción para PDGF-AB: TGFb1 es por lo menos 0,56, en donde el extracto se vuelve seguro para virus mediante dos pasos de inactivación viral ortogonal, y en donde los pasos de inactivación viral comprenden tratamiento de inactivación viral de solvente detergente (S/D) y pasteurización.
- 10 **2.** El extracto de la reivindicación 1, en donde los pasos de inactivación viral comprenden:
- 15 (a) llevar a cabo un tratamiento de inactivación viral de solvente detergente (S/D);  
 (b) eliminar el S/D por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), en donde la HIC comprende los pasos de: cargar el lisado en HIC, y recoger un material eluido bajo condiciones no isocráticas; y  
 (c) realizar un segundo tratamiento de inactivación viral ortogonal, en donde el segundo tratamiento de inactivación es la pasteurización.
- 20 **3.** El extracto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el extracto está enriquecido por lo menos 3 veces con PDGF-AB y/o por lo menos 1,8 veces con bFGF en comparación con un extracto sometido a S/D y eliminación de S/D por HIC en ausencia de un lavado con una solución no isocrática.
- 4.** El extracto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el extracto comprende menos de 3 mg/ml de IgG y menos de 0,98 mg/ml de fibrinógeno.
- 25 **5.** El extracto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el extracto está en forma sólida.
- 6.** El extracto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el extracto se proporciona con un agente de administración.
- 30 **7.** El extracto de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el agente de administración está hecho de material natural y/o sintético seleccionado del grupo que consiste de polímeros, hidrogeles, alcohol polivinílico, polietilenglicol, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, gelatina, alginato, matrices de colágeno, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(2-hidroxietilmetacrilato), agar, celulosa regenerada oxidada, péptidos autoensamblados, ácido poli(glicólico), ácido poli (láctico), fibrina y combinaciones de los mismos.
- 35 **8.** Un extracto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en la curación de tejidos; reconstrucción de órganos; regeneración de tejidos y/o tratamiento de la inflamación.
- 40 **9.** El extracto para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho uso comprende administrar el extracto con un agente de administración.
- 10.** Un kit que comprende un recipiente que contiene un extracto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 45 **11.** El kit de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende además un agente de administración.
- 12.** El kit de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el agente de administración está hecho de material natural y/o sintético seleccionado del grupo que consiste de polímeros, hidrogeles, alcohol polivinílico, polietilenglicol, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, gelatina, alginato, matrices de colágeno, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(2-hidroxietilmetacrilato), agar, celulosa regenerada oxidada, péptidos autoensamblados, ácido poli(glicólico), ácido poli(láctico), fibrina y combinaciones de los mismos.
- 50
- 55
- 60
- 65



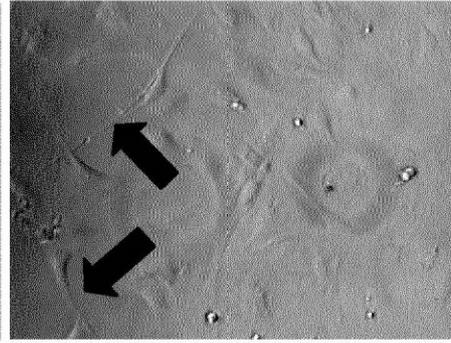
**Fig. 1**



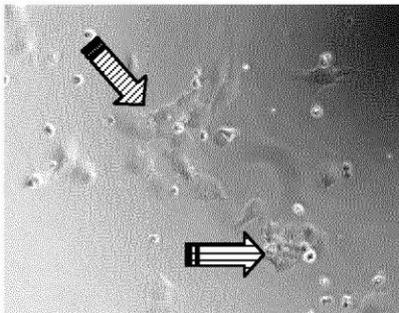
**Fig. 2**



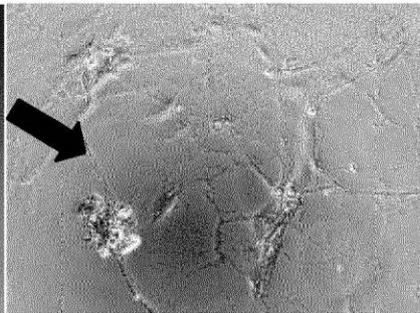
**Fig. 3A**



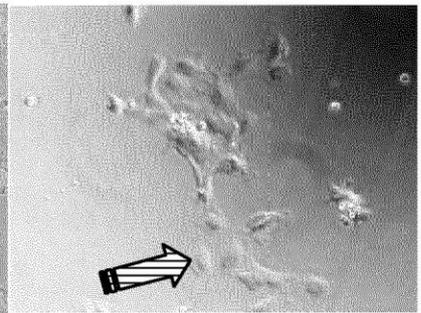
**Fig. 3B**



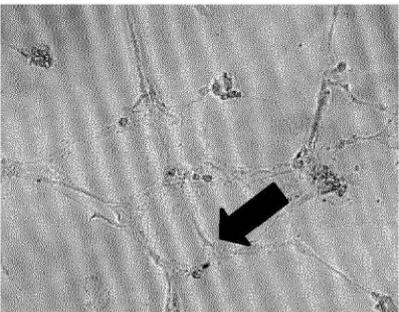
**Fig. 4A**



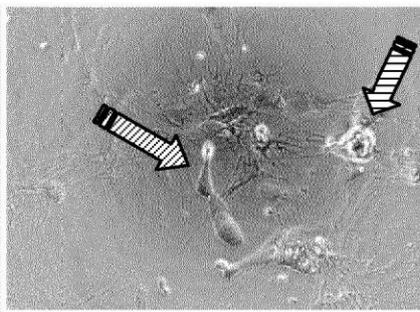
**Fig. 4B**



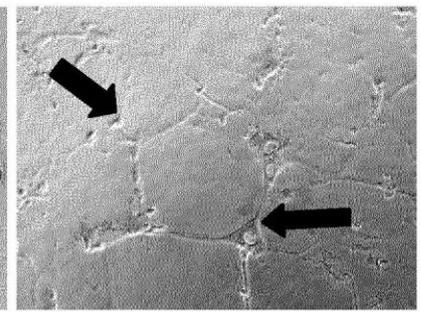
**Fig. 4C**



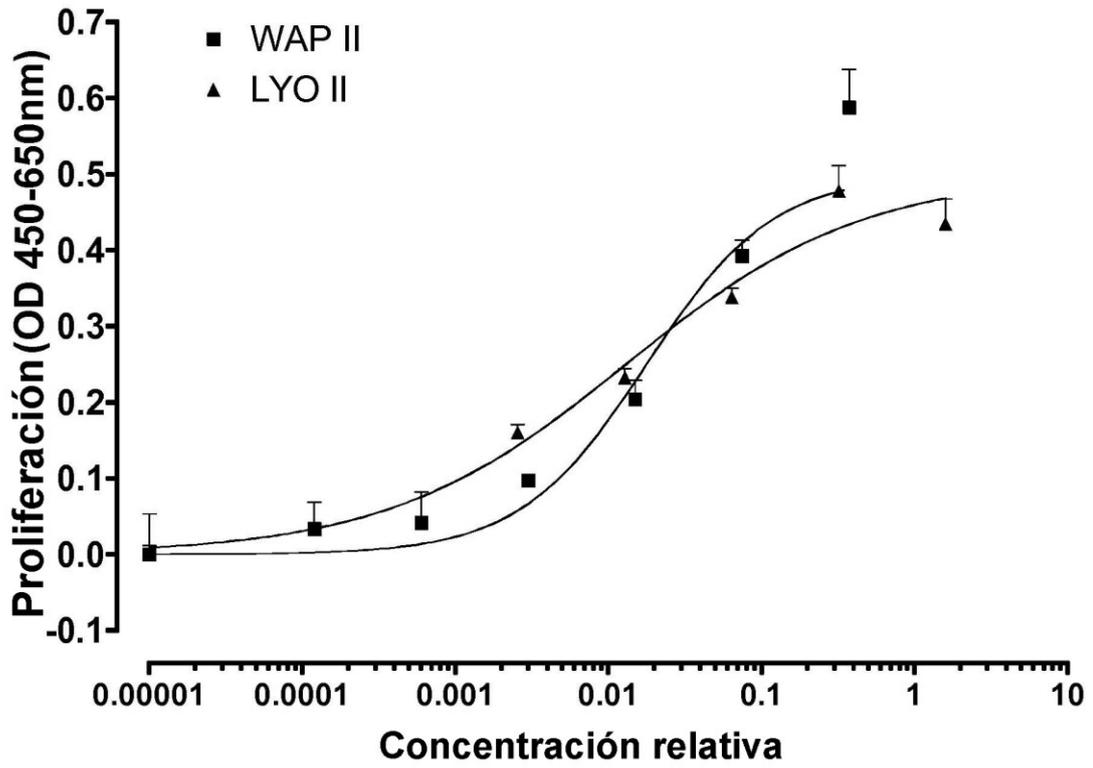
**Fig. 4D**



**Fig. 4E**



**Fig. 4F**



	WAP II	LYO II
INFERIOR	= 0.0	= 0.0
SUPERIOR	= 0.5000	= 0.5000
LOGEC50	-1.750	-1.884
LADERA	1.052	0.5604
EC50	0.01778	0.01305

	WAP II	LYO II
R <sup>2</sup>	0.9287	0.9615

Fig. 5

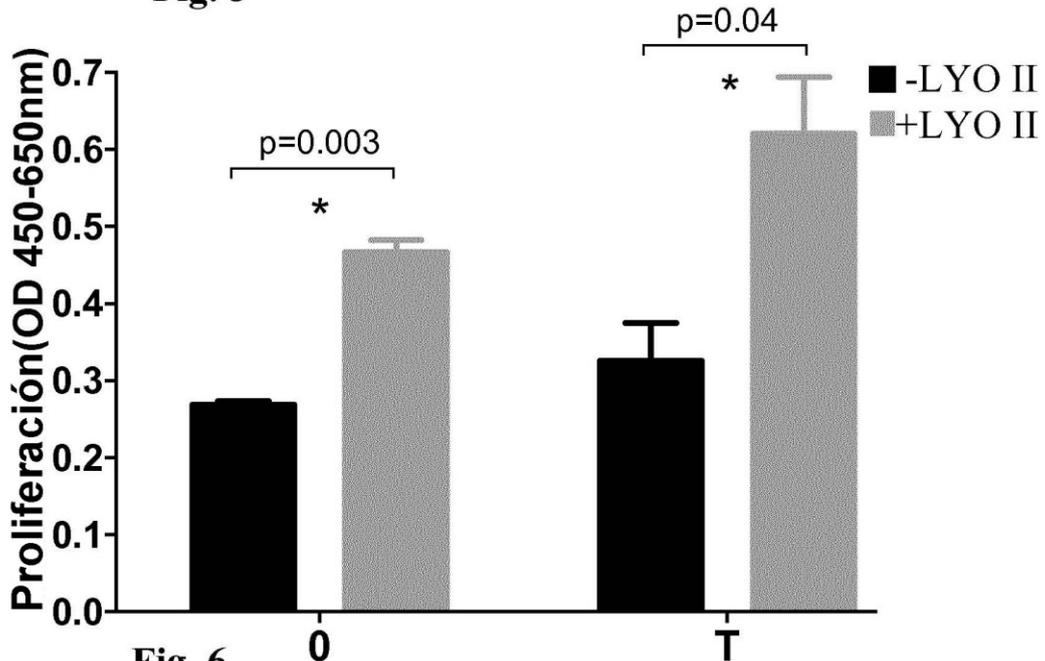
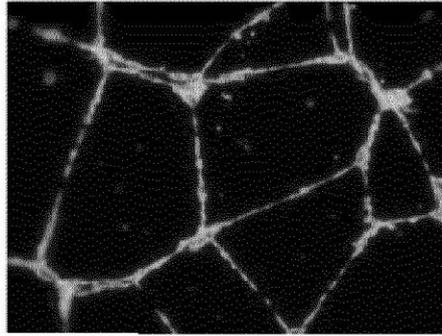
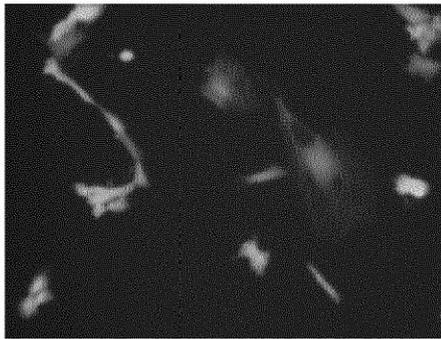


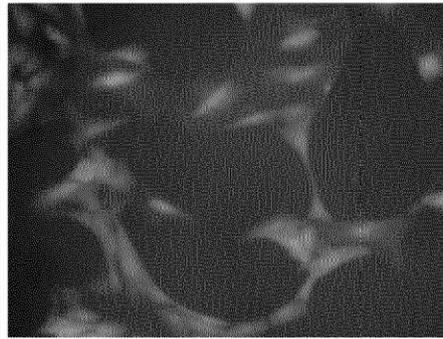
Fig. 6



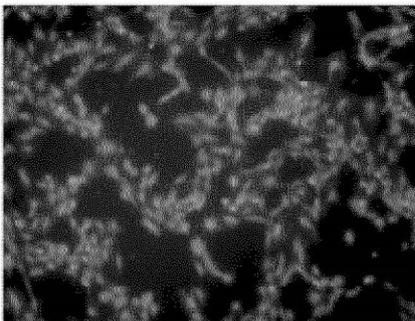
**Fig. 7**



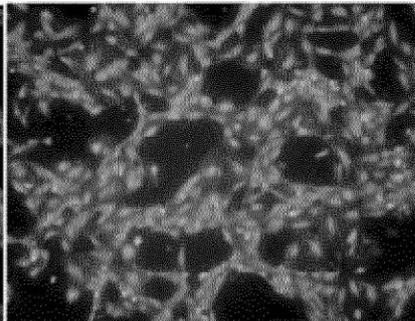
**Fig. 8A**



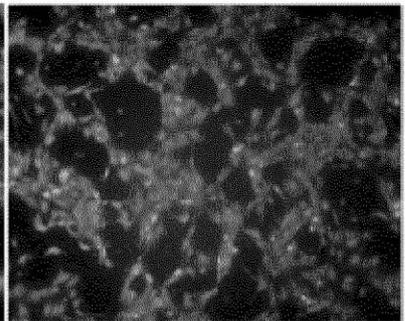
**Fig. 8B**



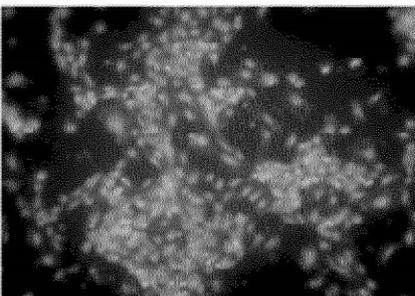
**Fig. 9A**



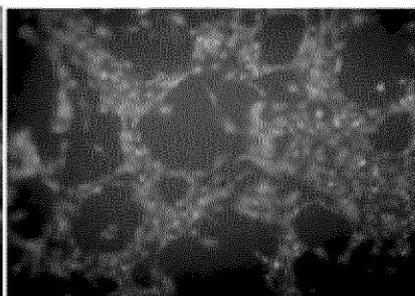
**Fig. 9B**



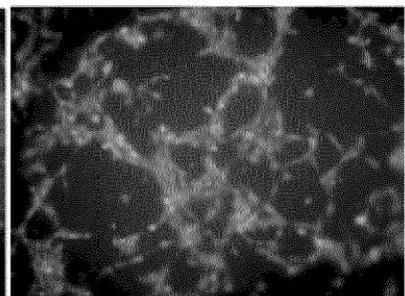
**Fig. 9C**



**Fig. 9D**



**Fig. 9E**



**Fig. 9F**

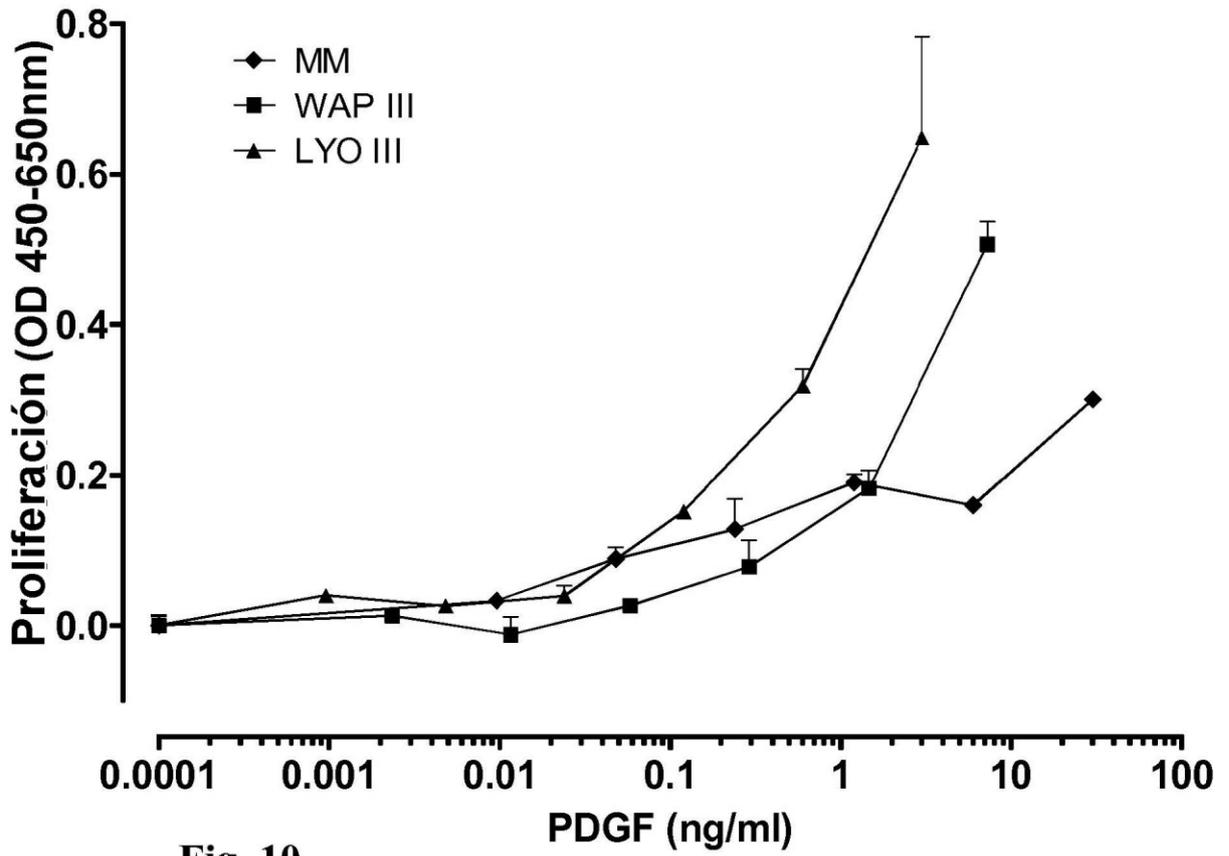


Fig. 10

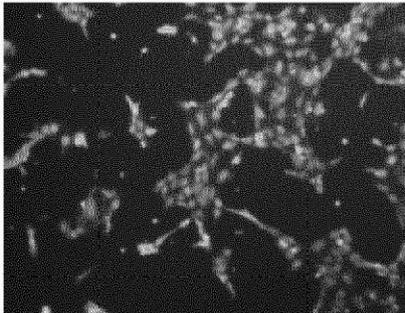


Fig. 11A

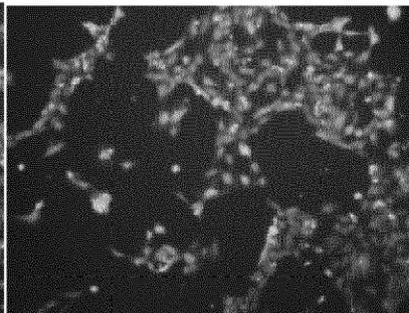


Fig. 11B

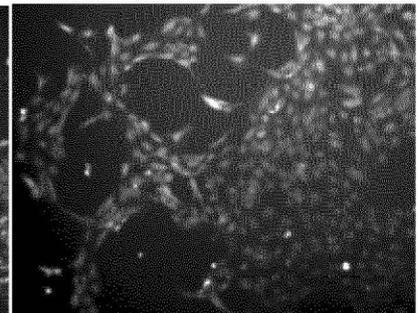


Fig. 11C

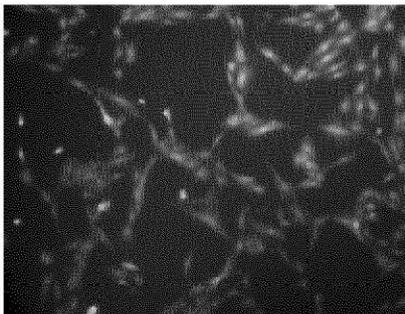


Fig. 11D

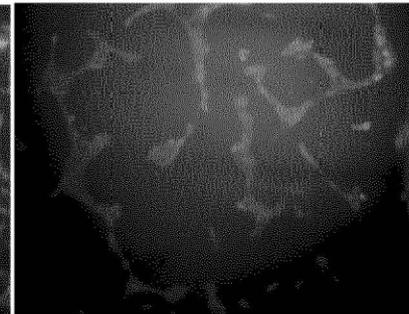


Fig. 11E

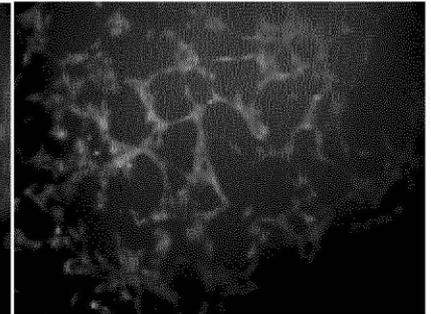


Fig. 11F

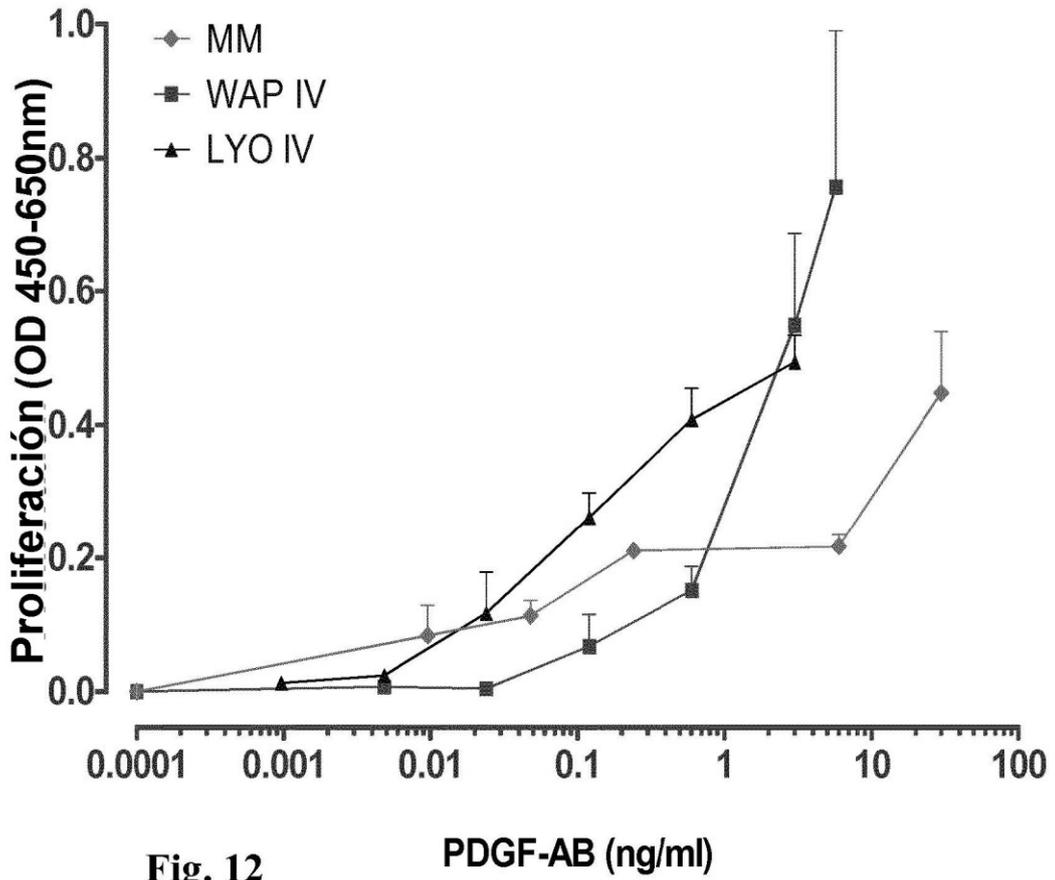


Fig. 12

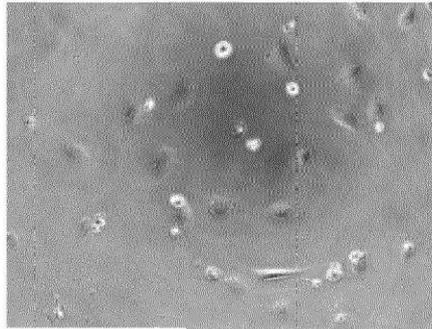


Fig. 13A



Fig. 13B

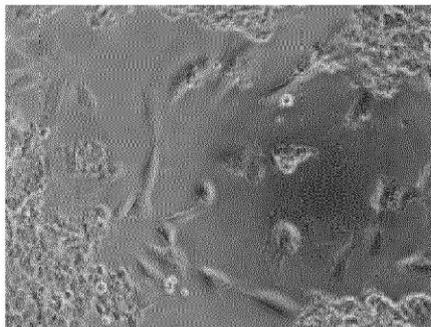


Fig. 13C

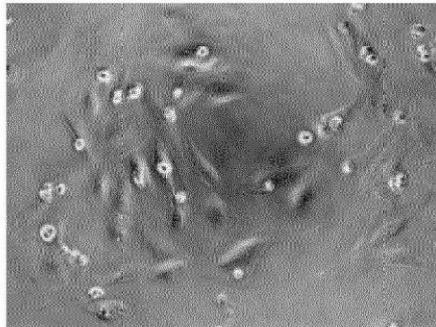
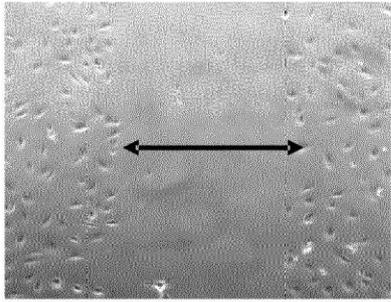
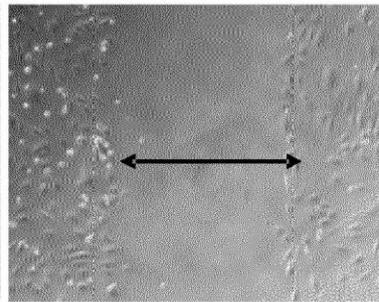


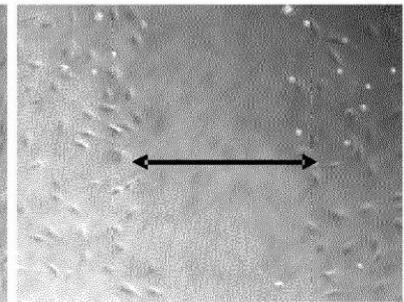
Fig. 13D



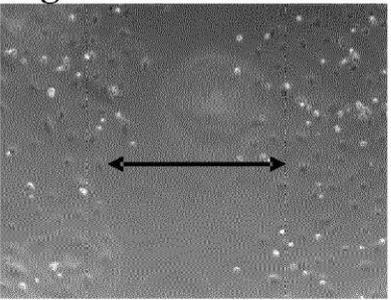
**Fig. 14A**



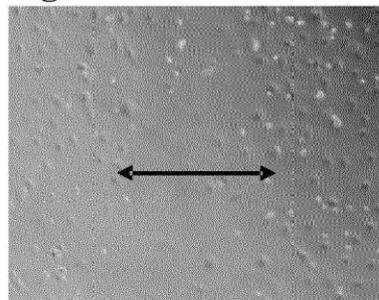
**Fig. 14B**



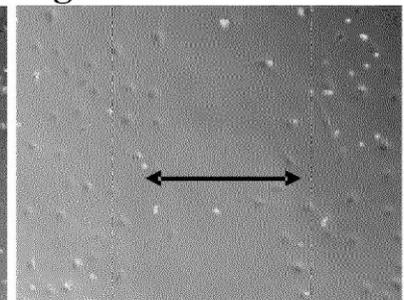
**Fig. 14C**



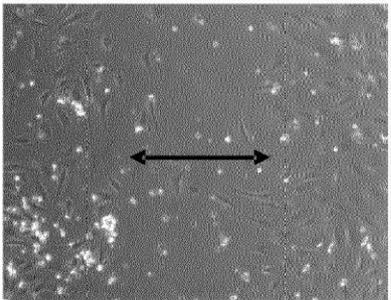
**Fig. 14D**



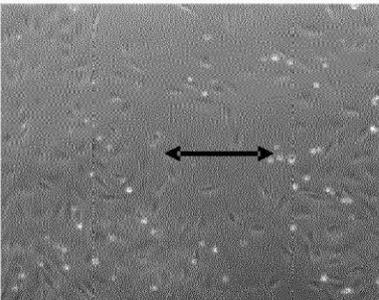
**Fig. 14E**



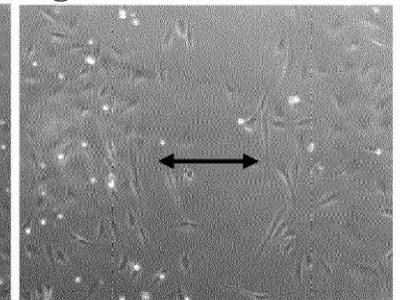
**Fig. 14F**



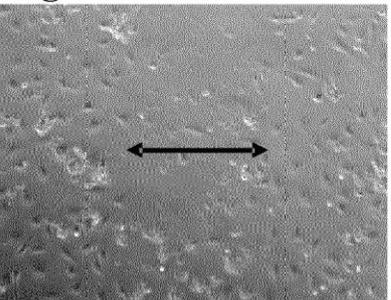
**Fig. 14G**



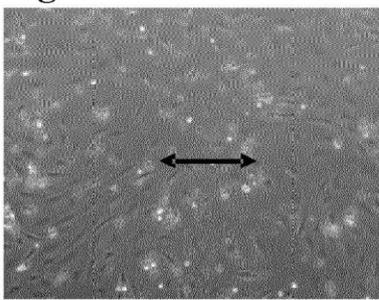
**Fig. 14H**



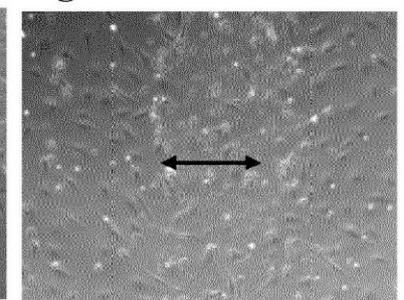
**Fig. 14I**



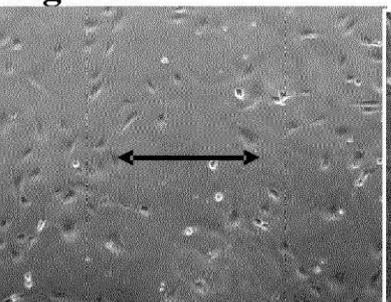
**Fig. 14J**



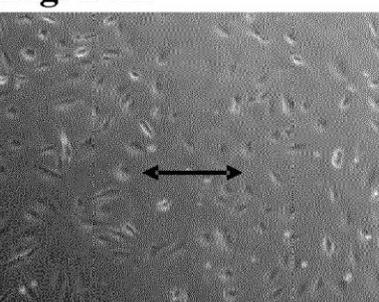
**Fig. 14K**



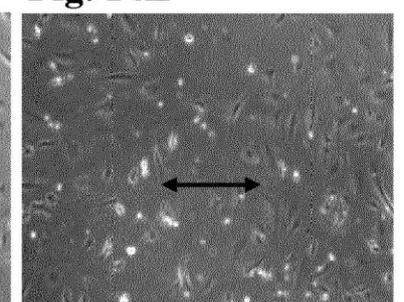
**Fig. 14L**



**Fig. 14M**



**Fig. 14N**



**Fig. 14O**

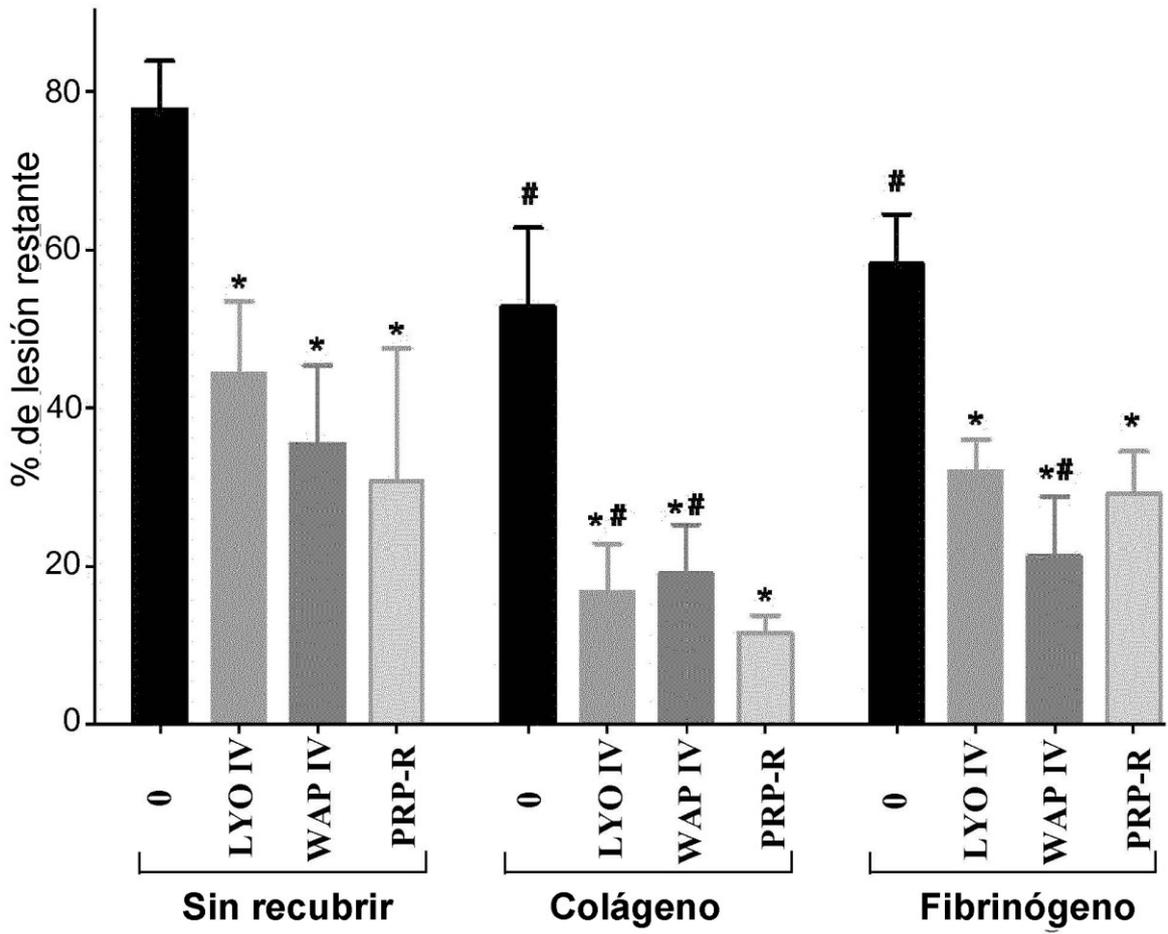


Fig. 15

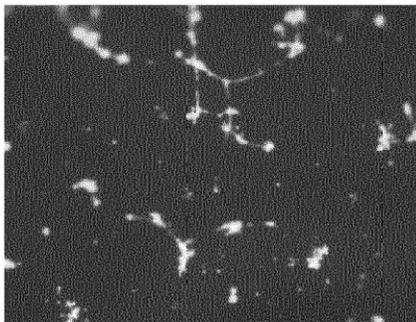


Fig. 16A

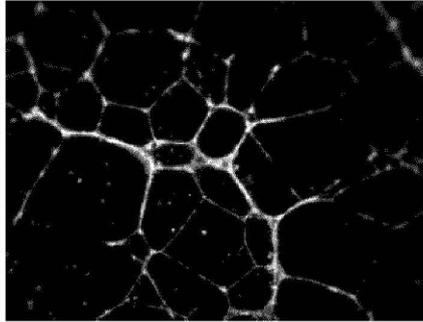


Fig. 16B

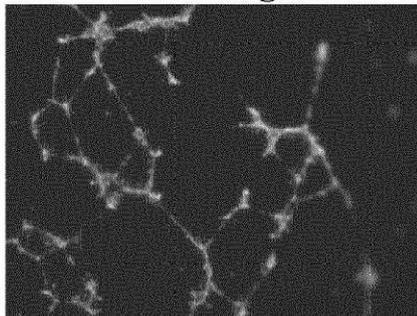


Fig. 16C

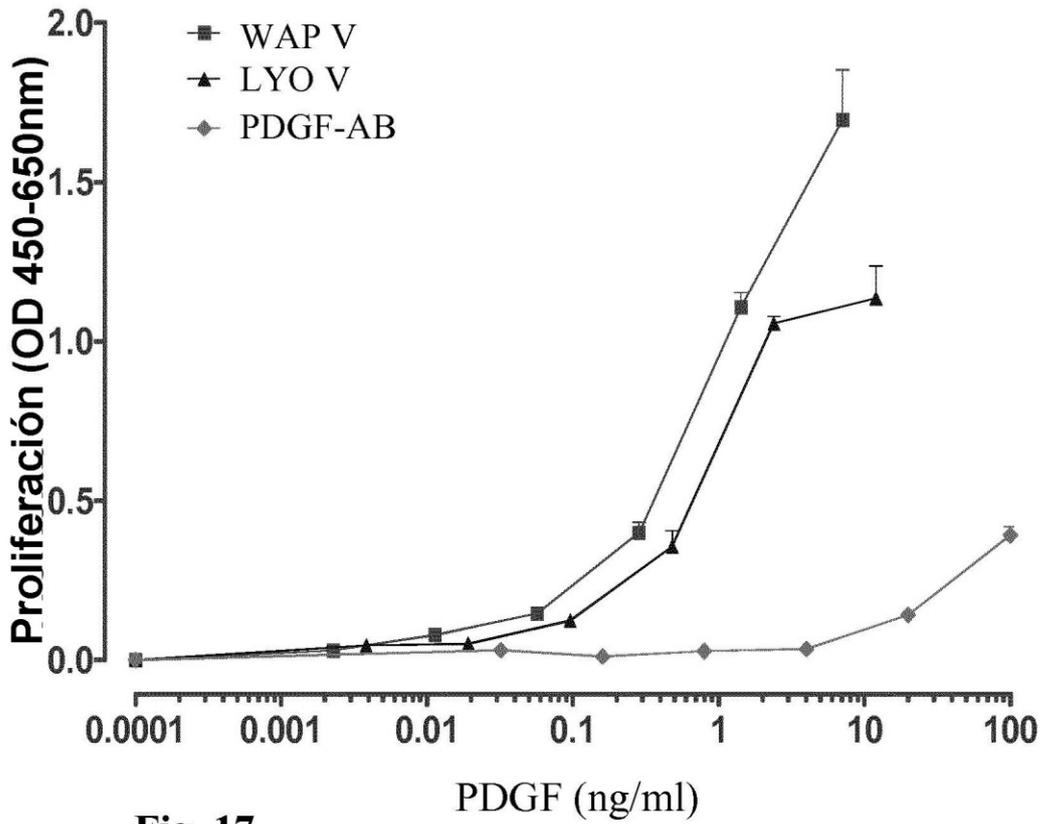


Fig. 17

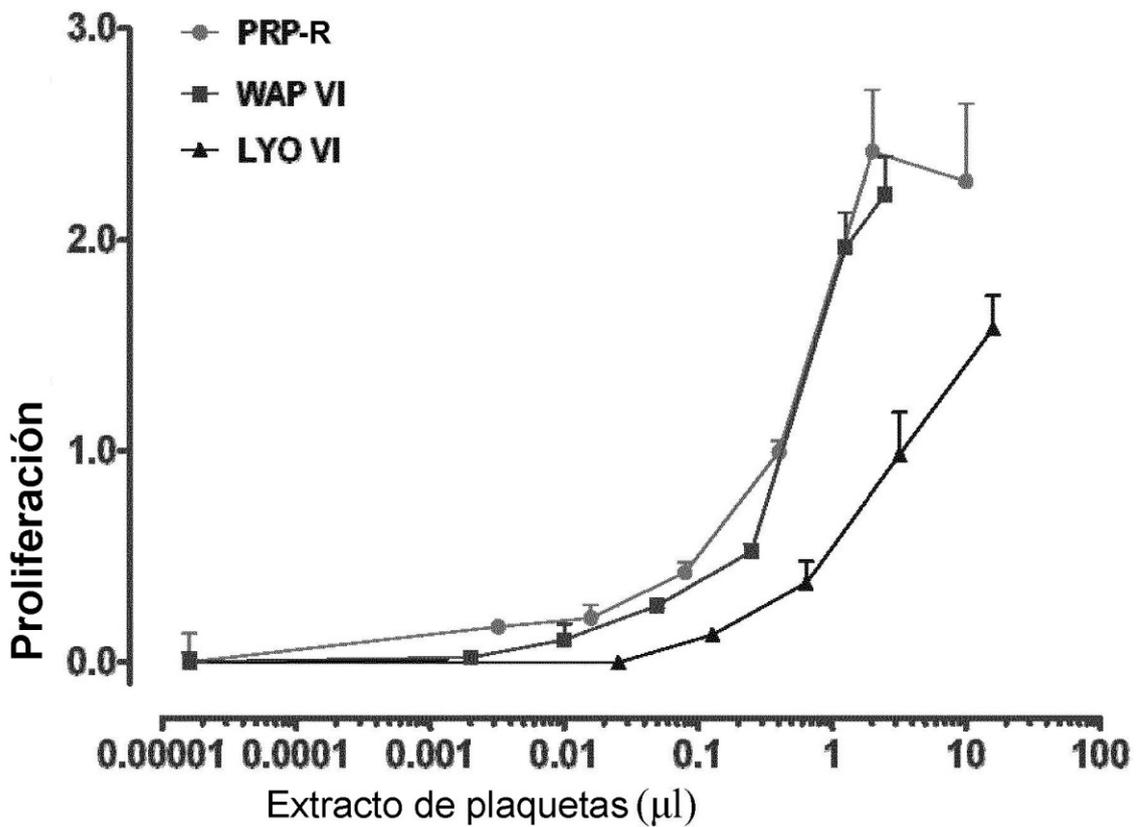
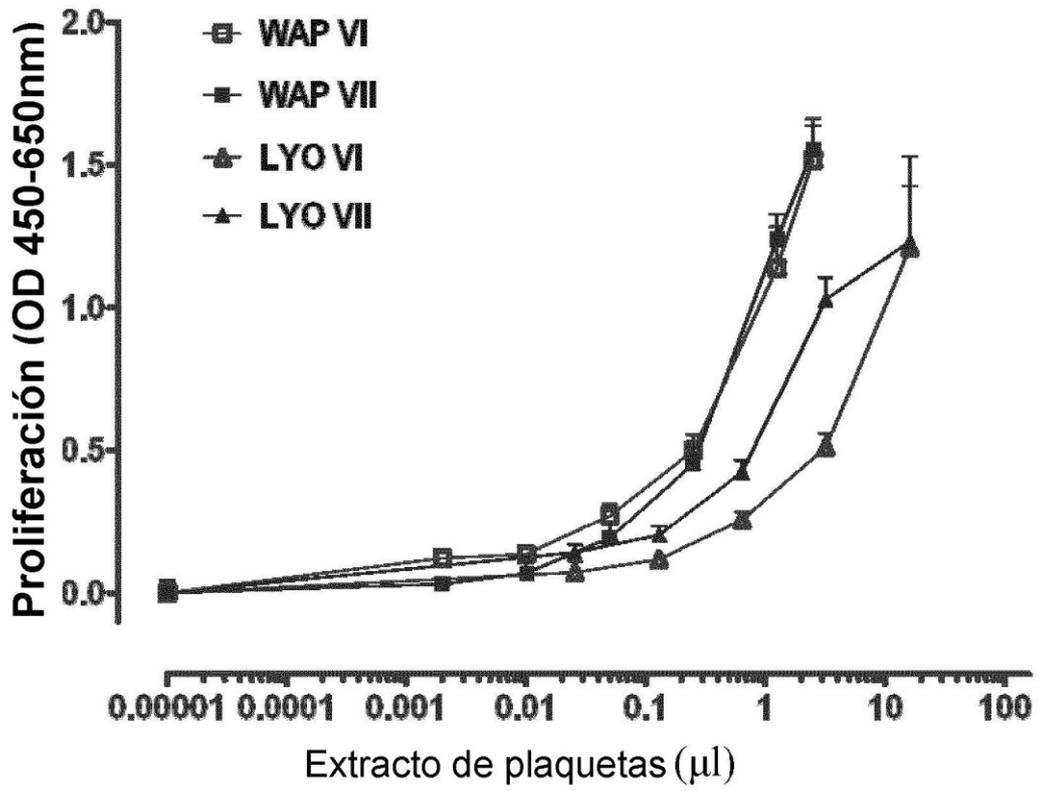


Fig. 18



	LYO VI	LYO VII	WAP VI	WAP VII
EC50	4.101	1.263	0.3204	0.3552

Fig. 19