

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 291**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 35/19 (2015.01)

A61P 17/02 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2017** **PCT/EP2017/079809**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2018** **WO18091713**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2017** **E 17851829 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2024** **EP 3541398**

54 Título: **Un método para preparar un liberado de plaquetas que contiene factores de crecimiento, y sus usos**

30 Prioridad:

18.11.2016 EP 16199628

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.09.2024

73 Titular/es:

**POWER OF PLATELETS PTE. LTD. (100.0%)
4 Battery Road No. 25-01 Bank of China Building
Singapore 049908, SG**

72 Inventor/es:

**FAHMY, HOSSAM MOSTAFA y
GOORIS, THEO**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 980 291 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

Un método para preparar un liberado de plaquetas que contiene factores de crecimiento, y sus usos

La presente invención se refiere a un método para preparar un liberado de plaquetas que contiene factores de crecimiento de un concentrado de plaquetas de mamífero, de acuerdo con el preámbulo de la primera reivindicación.

Las plaquetas de mamíferos contienen una miríada de agentes bioactivos con importantes funciones fisiológicas. Entre ellas, los factores de crecimiento son de particular interés debido a su papel en la mejora de la proliferación de diferentes líneas celulares y regeneración de tejido, ambas son de gran importancia en medicina regenerativa y curación de heridas y úlceras.

El concepto de utilizar plasma rico en plaquetas (PRP) del propio paciente en odontología, cirugía plástica y medicina regenerativa ya se desarrolló a principios de los 1990. Las plaquetas se obtenían por centrifugación de la sangre total anticoagulada del propio paciente, o utilizando dispositivos especiales como Magellan de Medtronic o SmartPrep de Harvest. Sin embargo, este uso de plaquetas autólogas podría estar en riesgo con pacientes anémicos o en caso de la necesidad de utilizar grandes cantidades o durante largos periodos de tiempo. Una de las limitaciones más importantes del PRP autólogo es la necesidad de una máquina o laboratorio especializado para preparar los concentrados de plaquetas. Para que sean aptos para uso, las plaquetas en concreto se activan para hacer que liberen el contenido de sus gránulos alfa. Sin embargo, es indispensable utilizar el PRP en las horas siguientes después de su separación del paciente, ya que de lo contrario los factores de crecimiento que contiene el mismo corren el riesgo de perder una porción sustancial de su bioactividad.

Se han descrito diversas técnicas para preservar plaquetas. La adición de DMSO y trehalosa son dos ejemplos de métodos adecuados para prolongar la preservación de plaquetas, tanto para plaquetas que han sido sometidas a liofilización (secado en congelación) como para las que no. Las composiciones crioprotectoras utilizadas junto con los procesos de liofilización conducen a un resultado similar en relación con la preservación. Las desventajas de estas aproximaciones que simplemente utilizan conservantes y/o liofilización en plaquetas intactas, están relacionadas con el hecho de que proteínas, receptores y similares quedan retenidos en la superficie plaquetaria o dentro de las plaquetas. Por ejemplo, varios receptores de la membrana de las plaquetas permanecen intactos para unirse con factores extracelulares en respuesta a la activación plaquetaria, por ejemplo, para adhesión plaquetaria, agregación, etc.

Por lo tanto, sería beneficioso disponer de un método más universal que permitiera convertir plaquetas sanguíneas en un preparado que es adecuado para uso eficaz en una amplia variedad de aplicaciones, incluyendo curación de heridas, tratamiento de la piel, tratamiento de trastornos del tejido corporal (incluyendo órganos del cuerpo) como tejido pulmonar, y similares. De este modo, probablemente, el riesgo de interacción no deseada de dicho preparado con factores extracelulares debería ser mínimo.

WO2013113024 divulga un método de preparación de una composición adecuada para uso terapéutico o para uso como medio de cultivo, en el que las plaquetas se concentran y se someten a lisis para alterar la membrana de las plaquetas. Al menos 30% de las plaquetas pueden ser lisadas. Los lisados de plaquetas liofilizadas se forman en una composición que también contiene concentraciones liberadas de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas disponibles. WO2013113024 también divulga un método de tratamiento de tejido de mamífero, que comprende los pasos de aplicar a un sitio de tejido de mamífero para tratamiento, la composición descrita anteriormente que incluye lisados de plaquetas liofilizadas. En un ejemplo, los lisados de plaquetas liofilizadas se preparan a partir de plaquetas fuente, en las que al menos 30% de las plaquetas fuente se lisan para formar los lisados de plaquetas liofilizadas. Sin embargo, los lisados no están desprovistos de fibrinógeno y WO2013113024 no reconoce el problema de la infección viral o patogénica y no resuelve ese problema.

EP2389942 divulga un método para preparar un lisado de plaquetas que contiene factores de crecimiento inactivado, viralmente y desprovisto de factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) y factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que es adecuado para cultivo celular in vitro o ex vivo y para promover la proliferación y/o la diferenciación de células madre hacia el linaje de osteoblastos y/o condrocitos. El método comprende los pasos de poner en contacto e incubar un concentrado de plaquetas con 0.2 a 5 % de vol. de un solvente y/o un detergente durante un periodo de 5 minutos a 6 horas, a un pH de alrededor de 6.0 a alrededor de 9.0, y a una temperatura entre 2°C y 50°C, eliminar el solvente y/o el detergente mediante extracción con aceite para obtener una fase proteica acuosa, e incubar la fase proteica acuosa con carbón para eliminar el solvente/detergente. Un paso preliminar puede comprender preparar un concentrado de plaquetas inicial, mediante aféresis o mediante aislamiento de la capa leucocitaria a partir de sangre total, que puede ser fresca, caducada y almacenada líquida o caducada y almacenada congelada. En una realización preferible, el lisado de plaquetas comprende los factores de crecimiento TGF- β , IGF, EGF y/o bFGF. Sin embargo, el método divulgado en EP2389942 presenta varias desventajas. Aunque el lisado de plaquetas podría ser adecuado para cultivos celulares in vitro o ex vivo, se espera que sea insuficientemente eficaz para aplicación clínica con propósitos de medicina regenerativa, incluyendo curación de fracturas óseas, ya que el cóctel completo de

todos los factores derivados de plaquetas, en particular PDGF y VEGF, es necesario para uso clínico de lisados de plaquetas en medicina regenerativa, así como en la curación de heridas. La extracción con solventes da un bajo rendimiento de plaquetas, a menudo del 10-15 % de vol. con respecto al volumen original solamente. EP2389942 no incluye un paso de depleción de fibrinógeno, y no incluye un paso de liofilización. La inactivación viral con solvente/detergente sólo se aplica a virus con envoltura, pero no es capaz de inactivar virus sin envoltura, como el virus de Hepatitis A y el Parovirus B19, y el tratamiento con solvente/detergente tampoco elimina otros posibles contaminantes, como bacterias u otros microorganismos.

US8734854 divulga un método para liberar factores de crecimiento a partir de sangre total o plasma de un paciente en un medio no destructivo. Los factores de crecimiento obtenidos a partir de dicho método son adecuados para aplicación tópica en un área de la superficie de la herida para promover la curación de la herida, para inyección en tejido blando como un tendón desgarrado para promover crecimiento y curación del tejido. En otro método, los factores de crecimiento se liberan de una fuente de sangre total y se liofilizan mediante liofilización convencional. El producto liofilizado se puede reconstituir con salina normal para el tratamiento de la herida de un paciente o para uso en un procedimiento quirúrgico. Aunque US8734854 divulga que el producto final se puede liofilizar, la liofilización por sí sola ha demostrado ser insuficiente para eliminar de forma confiable patógenos. Además, los factores de crecimiento obtenidos a partir del método de US8734854 no están desprovistos de fibrinógeno.

Otros factores de crecimiento conocidos liberados de plaquetas incluyen los desarrollados por Cambium Medical Technologies Allogeneic Pooled Human Platelet Lysate. Este producto aún no está presente como un producto comercial y, aunque se dice que está desprovisto de fibrinógeno, no hay indicios de que haya sido sometido a un tratamiento de reducción patogénica/viral.

Numerosos artículos discuten el papel de los factores de crecimiento liberados de plaquetas como un sustituto del suero fetal bovino. Se ofrece una revisión en Platelet Lysate as Replacement for Fetal Bovine Serum in Mesenchymal Stromal Cell Cultures, Transfus Med Hemother 2013; 40: 326-335.

EP2757879 divulga un método para preparar un lisado de plaquetas, capaz de actuar como un coadyuvante para el aislamiento y/o crecimiento y/o expansión de células madre, fibroblastos o células dendríticas. El método comprende los pasos de (a) aislar una fracción de capa leucocitaria de una mezcla de muestras de sangre total obtenidas de al menos dos sujetos; (b) exponer la fracción de capa leucocitaria aislada a un agente fotoquímico y a radiación UV para eliminar cualquier agente contaminante presente; (c) someter la fracción de capa leucocitaria a al menos un ciclo de congelación/descongelación para lograr la lisis de las plaquetas contenidas en la misma; (d) centrifugar la fracción y recolectar la fase líquida. El lisado de plaquetas así obtenido se puede utilizar entonces como un coadyuvante para el cultivo, crecimiento y/o expansión de células madre, en particular mesenquimales, de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, fibroblastos y células dendríticas. Sin embargo, el lisado de plaquetas obtenido con el método divulgado en EP2757879 no está desprovisto de fibrinógeno, es dudoso si los ciclos de congelación/descongelación son capaces de provocar una liberación eficaz de factores de crecimiento y si la actividad de los factores de crecimiento se ve afectada o no por los ciclos repetidos de congelación/descongelación, y el método sólo utiliza un único paso de eliminación de patógenos.

Están disponibles comercialmente lisados de plaquetas, por ejemplo, los de Macopharma. Desafortunadamente, estos lisados están disponibles como grandes volúmenes congelados, que necesitan ser reducidos a alícuotas de menor tamaño después de la descongelación, con el riesgo potencial de contaminación microbiológica. El lisado plaquetario humano de Millipore, PLTMax, y los suministrados por Zenbio también están disponibles solamente en grandes volúmenes congelados; están destinados únicamente para fines de investigación y no para uso terapéutico ex vivo.

De acuerdo con T. Burnouf et al., Biomaterials 76 (2016), 371-387 los factores de crecimiento y las citocinas almacenados en gránulos plaquetarios se pueden liberar por activación directa utilizando la adición de una solución salina de cloruro de calcio, por formación de fibrina y degranulación plaquetaria, o utilizando trombina. Otras técnicas para inducir la liberación de factores de crecimiento y otras biomoléculas de las plaquetas incluyen ciclos repetidos de congelación/descongelación, sonicación sola o en combinación con ciclos de congelación/descongelación, o un tratamiento con solvente/detergente que también inactiva los virus envueltos en lípidos. Sin embargo, se piensa que someter las plaquetas a ciclos repetidos de congelación/descongelación impacta a los factores de crecimiento. El riesgo de transmisión de agentes infecciosos se gestiona mediante pruebas obligatorias de cada donación individual y no utilizando donaciones confirmativas. Se aconseja la realización de pruebas obligatorias para detección de VIH-1/VIH-2, anticuerpos, antígeno de superficie de hepatitis B, anticuerpos del virus de hepatitis C.

Por lo tanto, sigue siendo necesario un método para la preparación de factores de crecimiento derivados de plaquetas que proporcione un rendimiento óptimo de los factores de crecimiento y que muestre un riesgo mínimo para la presencia de patógenos, incluyendo virus con envoltura lipídica, así como sin envoltura y bacterias.

Por lo tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar un método para la preparación de factores de crecimiento derivados de plaquetas a partir de un concentrado de plaquetas de mamífero que permita lograr un rendimiento óptimo de los factores de crecimiento, que muestre un riesgo mínimo para la presencia de virus envueltos, así como no envueltos, bacterias, hongos y otros microorganismos transmitidos por la sangre.

5 En una realización preferible es un objetivo de esta invención proporcionar un método para la preparación de factores de crecimiento derivados de plaquetas con inactivación patógena mejorada, no sólo de los patógenos más comunes, sino también de patógenos que no pueden o difícilmente pueden ser inactivados con las técnicas existentes.

10 Otra realización preferible de esta invención tiene como objetivo proporcionar un liberado de plaquetas que es adecuado para uso en medicina regenerativa y tratamiento de heridas. Una realización preferible adicional tiene como objetivo proporcionar un liberado de plaquetas que se pueda utilizar como un sustituto del suero bovino fetal en medio de cultivo celular.

15 El problema de proporcionar un método para la preparación de factores de crecimiento derivados de plaquetas a partir de un concentrado de plaquetas de mamífero que proporcione un rendimiento óptimo de factores de crecimiento, en el que los factores de crecimiento derivados de plaquetas muestren un riesgo mínimo para la presencia de patógenos, incluyendo virus con envoltura lipídica así como sin envoltura, bacterias y otros patógenos transmitidos por la sangre descritos anteriormente, se puede resolver de acuerdo con la presente invención con un método que muestre las características técnicas de la porción caracterizadora de la primera reivindicación.

20 Para ello, el método para preparar un lisado de plaquetas que contiene factores de crecimiento de esta invención comprende los pasos consecutivos de

a. someter el concentrado de plaquetas a un primer paso de reducción de la concentración de patógenos con el propósito de alterar tanto ADN como ARN de los microorganismos presentes en el concentrado de plaquetas, en el que los microorganismos incluyen virus envueltos, no envueltos, o bacterias, hongos, etc;

25 b. someter el concentrado de plaquetas a un paso de activación poniéndolo en contacto con un agente activador para ocasionar que las plaquetas liberen al menos parte de los gránulos alfa y factores de crecimiento presentes en el mismo, proporcionando así un liberado de plaquetas fluido;

30 c. someter el liberado de plaquetas fluido a un paso de reducción de la concentración de fibrinógeno y recuperar un liberado de plaquetas fluido desprovisto de fibrinógeno; este paso tiene como objetivo reducir la concentración de fibrinógeno en el liberado de plaquetas fluido;

d. someter el liberado de plaquetas fluido desprovisto de fibrinógeno a un segundo paso de reducción de la concentración de patógenos con el propósito de alterar virus envueltos;

e. someter el liberado de plaquetas a filtración estéril y recuperar del paso de filtración un líquido filtrado que contiene los factores de crecimiento;

35 f. dividir el líquido filtrado en porciones individuales, en las que el volumen de la porción individual se ajusta de forma que cada porción contiene aproximadamente el mismo número de plaquetas; y

g. someter a liofilización las porciones individuales de líquido filtrado así obtenidas

El método para preparar un lisado de plaquetas que contiene factores de crecimiento de esta invención comprende los pasos consecutivos de

40 (a) someter el concentrado de plaquetas a un primer paso de reducción de la concentración de patógenos. En una realización preferible, el primer paso de reducción de la concentración de patógenos comprende un paso de incubar el concentrado de plaquetas con un agente fotoquímico activo y exponer el concentrado de plaquetas a irradiación UV. Este paso permite obtener un concentrado de plaquetas con un contenido reducido de patógenos, debido a la inactivación o disrupción del ARN y/o ADN de los microorganismos presentes en el concentrado de plaquetas. En particular, se obtiene un concentrado de plaquetas en el cual se reduce la concentración de virus envueltos y no envueltos. Este primer paso también puede permitir inactivar otros microorganismos transmitidos por la sangre contenidos en el concentrado de plaquetas;

45 (b) someter el concentrado de plaquetas así tratado a un paso de activación, poniendo en contacto el concentrado de plaquetas con un agente activador para ocasionar que las plaquetas liberen al menos parte de su contenido, en particular al menos parte de los gránulos alfa presentes en las plaquetas, así como el contenido de estos gránulos alfa, incluyendo los factores de crecimiento, y para proporcionar un liberado de plaquetas. El liberado de plaquetas suele adoptar la forma de una composición fluida, la cual contiene lo que queda de las plaquetas activadas y el contenido de las plaquetas que se ha liberado en el paso de activación. Como resultado de este paso de activación, se liberarán dosis suprafisiológicas de factores de crecimiento y

citocinas de las plaquetas a la composición o solución que comprende el concentrado de plaquetas, además de fibrinógeno. Esto es importante dado que los gránulos alfa suelen contener la mayoría de los factores de crecimiento. La activación de las plaquetas de mamíferos y sus concentrados se puede lograr poniéndolos en contacto con un activador plaquetas capaz de inducir la ruptura de las plaquetas y de provocar la liberación de al menos parte de su contenido, incluyendo dosis suprafisiológicas de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas. Los activadores adecuados incluyen soluciones acuosas de sales de calcio, por ejemplo, cloruro de calcio, trombina, colágeno, tromboxano A2 y adenosín difosfato (ADP). La adición de trombina ocasiona la formación de un enorme coágulo que contiene prácticamente todo el contenido del concentrado de plaquetas. La incubación a una temperatura cercana a la corporal, alrededor de 37°C durante un tiempo que es lo suficientemente largo, a menudo 3 horas o más, hace que el coágulo se encoja hasta un tamaño insignificante, con la expresión de todos los factores de crecimiento dentro de las plaquetas atrapadas. Por lo tanto, la presente invención puede conseguir que se libere un volumen de factores de crecimiento suspendidos en plasma que es casi idéntico al volumen inicial del concentrado de plaquetas.

(c) Someter el liberado de plaquetas fluido a un paso de reducción de fibrinógeno y recuperar un liberado desprovisto de fibrinógeno fluido. Este paso contiene de hecho los pasos de aislamiento del coágulo de fibrina formado después de la interacción del fibrinógeno liberado de las plaquetas con el agente activador añadido en el paso anterior para ocasionar la liberación del contenido de las plaquetas. Es aconsejable eliminar en la medida de lo posible el fibrinógeno que se libera tras la activación de las plaquetas, ya que puede dar lugar a la formación de un gel semisólido que podría causar molestias cuando el plasma sanguíneo que se ha enriquecido con plaquetas (PRP), se utilice posteriormente por ejemplo como inyección intra lesional en lesiones del sistema musculoesquelético incluyendo tendones, ligamentos y articulaciones, o en rejuvenecimiento facial o en cualquier otro tratamiento. No obstante, la concentración de fibrinógeno de las plaquetas sanguíneas es inferior a la del plasma. El método de esta invención puede contener además el paso de aislar fibrinógeno del liberado de plaquetas y recuperar para uso posterior el liberado de plaquetas desprovisto de fibrinógeno;

(d) someter el liberado de plaquetas desprovisto de fibrinógeno a un segundo paso de reducción de la concentración de patógenos para alterar o inactivar los virus envueltos, y recuperar una fase proteica acuosa que contiene los factores de crecimiento. El objetivo principal de este paso es confirmar la eliminación de virus envueltos, como los virus con envoltura lipídica HBC, HCV y VIH. El uso de dos pasos ortogonales de inactivación de patógenos (paso a y paso d) como se hace en la presente invención es particularmente importante, ya que permite lograr la inactivación tanto de virus sin envoltura como con envoltura, así como la inactivación de microorganismos más grandes como bacterias y parásitos como protozoos. El método de esta invención responde con ello a un requisito esencial de las regulaciones modernas de los productos derivados de la sangre de la industria biofarmacéutica. Este paso garantiza que se minimice el riesgo de interacción no deseada con factores extracelulares.

(e) someter el liberado de plaquetas desprovisto de fibrinógeno a filtración estéril con el propósito de eliminar cualquier resto de material sólido y bacterias y recuperar los factores de crecimiento que contienen el filtrado líquido o fluido. Como las plaquetas proceden de sangre de mamíferos, el filtrado líquido o fluido tendrá principalmente una base acuosa o será una solución acuosa que comprende una fase proteica.

En el método descrito anteriormente, los pasos se realizan preferiblemente de forma consecutiva en el orden descrito

Además del primer paso (a) que permite lograr la inactivación de virus no envueltos presentes en el concentrado de plaquetas, el método de esta invención también contiene un paso para inactivar virus envueltos, generalmente virus envueltos en lípidos, que pueden estar contenidos en ya sea el concentrado de plaquetas o en las plaquetas como tal. Un método preferible para lograr esto es someter el liberado de plaquetas a o ponerlo en contacto con un solvente y/o detergente con el propósito de disolver las membranas lipídicas contenidas en el liberado y destruir los ácidos nucleicos contenidos en el mismo, seguido de un paso de extracción preferiblemente con aceite para eliminar el solvente y/o detergente que contiene las membranas lipídicas disueltas, y un paso de filtración para eliminar cualquier sólido restante. Debido a la presencia de un paso de extracción y filtración, los virus envueltos en lípidos, así como otros patógenos como bacterias y parásitos como protozoos, pueden ser inactivados, y los lípidos plasmáticos y plaquetarios que pueden estar contenidos en el concentrado inicial de plaquetas pueden ser eliminados. Los pasos del proceso de extracción con aceite y filtración permiten una preparación fácil, rápida y eficiente de un liberado de plaquetas que contiene factores de crecimiento inactivados de virus y bacterias, en el que las concentraciones de solvente y detergente cumplen los límites aprobados por autoridades reguladoras para productos terapéuticos parenterales derivados de la sangre.

La presente invención nos proporciona un método para preparar un liberado de plaquetas que contiene factores de crecimiento, con el que se puede minimizar el riesgo de transmisión de enfermedades residuales transmitidas por la sangre por un factor incalculable, especialmente en el caso de productos plaquetarios que se originan a partir de un producto sanguíneo que ha sido sometido sistemáticamente a la eliminación de leucocitos. En concreto, la eliminación de leucocitos tiene el efecto de que la capacidad de auto esterilización

de la sangre se pierde en gran medida, y a menudo se pierde por completo. Esto es importante, ya que el plasma constituye un medio óptimo para supervivencia o crecimiento de una gran variedad de patógenos.

Además, debido a la combinación seleccionada de tratamientos de inactivación de patógenos, se puede garantizar la seguridad absoluta de los factores de crecimiento derivados de plaquetas obtenidos con la presente invención. Por lo tanto, se pueden proporcionar mezclas de factores de crecimiento derivados de plaquetas inactivados viralmente, que se pueden estandarizar de forma eficiente para uso en tratamientos terapéuticos, terapia celular o cultivo celular. El doble paso de inactivación viral/patogénica califica que el producto obtenido mediante el proceso de esta invención se pueda utilizar con seguridad en investigación clínica y expansión de células madre mesenquimales para aplicación in vivo. Como resultado, se obvia la necesidad del uso de plaquetas autólogas con un paciente, con las limitaciones asociadas. Además, en lugar de imponer el uso de plaquetas autólogas, la presente invención abre la posibilidad de utilizar liberado de plaquetas obtenido a partir de un conjunto de productos sanguíneos de mamífero, que proceden de varios sujetos, con riesgo mínimo de transmisión de enfermedades transmitidas por la sangre, que pueden proceder de uno o más de los sujetos de los que procede el concentrado de plaquetas.

El método de esta invención no sólo es adecuado para preparar factores de crecimiento derivados de plaquetas humanas, sino que también se puede utilizar con ajustes mínimos para producir factores de crecimiento derivados de equinos a partir de plaquetas animales, por ejemplo, a partir de plaquetas de caballo con aplicaciones médicas similares. Los factores de crecimiento derivados de plaquetas liofilizadas reconstituidas se pueden utilizar además como una alternativa al suero bovino fetal en medio de cultivo celular y en expansión de células madre mesenquimales.

Considerando el hecho de que, en parte debido al riesgo de contaminación bacteriana y a la pérdida de actividad funcional para hemostasis, las plaquetas suelen tener una vida útil limitada de 5 o 7 días, cuando se utilizan clínicamente por vía intravenosa para la corrección de trombocitopenia cuantitativa o funcional, suelen desecharse cada año un elevado número de unidades plaquetarias de más de 5 o 7 días. Al permitir que las reservas de plaquetas caducadas se utilicen para la preparación de productos derivados de plaquetas, como el liberado de plaquetas de esta invención, el método de la invención revela un interés económico prometedor.

Esta invención permite además maximizar la cantidad de volumen de liberado obtenida, llevando a cabo los pasos del proceso en la secuencia descrita anteriormente. Las técnicas modernas, como el sistema Mirasol™, permiten someter grandes cantidades de concentrados de plaquetas recolectados por aféresis de plaquetas a inactivación de patógenos, con riesgo mínimo de reducir el volumen de plaquetas recolectadas. Al realizar el paso de extracción con aceite sólo después de haber llevado a cabo una primera inactivación viral, la pérdida o reducción de la cantidad de liberado disponible como consecuencia de los tratamientos de eliminación de patógenos, puede reducirse a un mínimo.

Dado que se puede evitar el uso de ciclos de congelación/descongelación, la presente invención presenta la ventaja adicional de que existe un riesgo mínimo de que el contenido en las proteínas principales de los factores de crecimiento obtenidos en la misma, como albúmina e inmunoglobulinas, así como la concentración de factores de crecimiento en el liberado distintos de los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) y factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), como TGF-β1, EGF e IGF, se vean afectados negativamente.

En una realización preferible, el liberado de plaquetas que contiene factores de crecimiento obtenido con el método de esta invención se puede liofilizar en viales de volumen pequeño que pueden reconstituirse fácilmente en un solo paso añadiendo agua o una solución salina, de acuerdo con las necesidades reales. De este modo, el volumen se selecciona preferentemente de modo que contiene un número de factores de crecimiento que es suficiente para un tratamiento. La concentración intra e inter lotes de factores de crecimiento por vial se puede estandarizar ajustando el volumen de factores de crecimiento liberados dispensado en cada vial de acuerdo con el recuento inicial de plaquetas, es decir, la cantidad de plaquetas que se somete a los pasos consecutivos (a) hasta (e) descritos anteriormente. En una realización preferible, el filtrado líquido obtenido en el paso (e) anterior se divide en volúmenes individuales, en los que cada volumen individual se ajusta de manera que se origine de entre 2×10^5 y 2×10^7 plaquetas por cm^3 , preferiblemente alrededor de 2×10^6 plaquetas por cm^3 . Si se desea, el liberado de plaquetas se puede enriquecer para un determinado conjunto de factores de crecimiento, dependiendo del uso previsto. Al estandarizar el número de factores de crecimiento para cada vial, se puede obviar la necesidad de hacer alícuotas más pequeñas a partir de un volumen de reserva mayor, con los riesgos potenciales de contaminación y pérdida de actividad debido a los ciclos repetidos de descongelación y congelación a los que debe someterse la reserva para permitir la extracción de una pequeña alícuota deseada.

En lo anterior, la expresión "concentrado de plaquetas" se refiere a cualquier fluido, ya sea biológico o artificial, que contiene plaquetas. Ejemplos no limitantes de tales fluidos incluyen diversas formas de sangre total, plasma sanguíneo, plasma rico en plaquetas, plaquetas concentradas en cualquier medio, o similares, derivados de fuentes de mamíferos, que pueden ser humanas o animales. El fluido será generalmente de base acuosa. Por lo tanto, el fluido puede ser autólogo o puede ser un conjunto de fluidos alogénicos que se originan a partir de

varios sujetos diferentes, por ejemplo, de aféresis o concentrados de plaquetas derivados de la capa leucocitaria con un cierto contenido mínimo de plaquetas, preparados rutinariamente en los bancos de sangre. Usualmente, la fabricación será estandarizada de productos alogénicos comerciales. Por lo general, los concentrados de plaquetas se prepararán utilizando el método de capa leucocitaria, que emplea sangre total, el método PRP, o plaquetas de aféresis, que proceden de porciones de sangre donadas individualmente y almacenadas. Se prefiere el uso de las últimas, en particular cuando se someten adicionalmente a depleción leucocitaria previa al almacenamiento. Además, los concentrados de plaquetas que no pueden transfundirse porque han alcanzado el límite de almacenamiento de cinco a siete días, se pueden congelar, almacenarse y utilizarse como suplemento del medio de crecimiento.

El concentrado de plaquetas se puede mantener en plasma o en una mezcla de plasma y una solución aditiva. Para poder aumentar la vida útil, los concentrados de plaquetas pueden consistir en grandes conjuntos de concentrados de plaquetas congelados.

El término "concentrado" o "concentrando" se puede referir a la separación de las plaquetas de la mayor parte del plasma, sangre total u otro fluido del que esté presente, pero también se puede referir al producto original como tal, por ejemplo, a sangre total o plasma. Para producir un concentrado se puede utilizar centrifugación, espectrometría, filtración, decantación, sedimentación por gravedad u otros métodos de concentración de plaquetas a partir de fluidos que contienen plaquetas. Cuando se concentran plaquetas, puede ser deseable utilizar un anticoagulante (particularmente para centrifugación o sedimentación por gravedad) junto con la fuente de plaquetas para prevenir coagulación durante la separación de las plaquetas de otros componentes de la sangre, el plasma u otro fluido. El término "anticoagulante" se refiere a composiciones que inhiben la coagulación cuando se concentran o recolectan plaquetas para uso de acuerdo con ejemplos de la presente divulgación. Los anticoagulantes generalmente están disponibles como inhibidores de la síntesis del factor de coagulación, inhibidores de trombina o fármacos antiplaquetarios. Los inhibidores de la síntesis del factor de coagulación que inhiben la producción de determinados factores de coagulación en el hígado incluyen composiciones como warfarina (Coumadin). Los inhibidores de la trombina interfieren con la coagulación de la sangre bloqueando la actividad de la trombina, e incluyen composiciones como heparina y lepirudina (Refludan). Los fármacos antiplaquetarios interactúan con las propias plaquetas, e incluyen fármacos como aspirina, ticlopidina (Ticlid), clopidogrel (Plavix), tirofiban (Aggrastat), eptifibatida (Integrilin), etc.

En lo anterior, el término "liberado de plaquetas" se refiere a la composición obtenida cuando un concentrado de plaquetas se somete a un paso de activación y el contenido liberado por las plaquetas se recupera como se ha descrito anteriormente, en particular el paso b como se describió anteriormente.

En lo anterior, "someter el concentrado de plaquetas a un paso de activación o a un tratamiento de activación" significa destruir las plaquetas alterando su membrana celular para lograr que las plaquetas liberen su contenido granular, en particular los gránulos alfa contenidos en las plaquetas. Las plaquetas activadas pueden liberar una amplia variedad de compuestos contenidos en las mismas, entre otros, proteínas, micro vesículas celulares por ejemplo micropartículas derivadas de membrana plasmática, exosomas, factores de crecimiento como VEGF, bFGF, PDGF, TGF- β y otras citocinas. Esto se puede hacer químicamente, mecánicamente, por homogeneización de fluidos, o sonicación, o por lisis. Pero de acuerdo con esta invención, la activación se lleva a cabo preferentemente poniendo en contacto el concentrado de plaquetas con un agente activador, ya que esto permite maximizar la liberación del contenido de plaquetas en el liberado de plaquetas fluido. Los agentes de lisis adecuados incluyen trombina, colágeno, tromboxano A2 o ADP y soluciones de sal de calcio o una mezcla de dos o más de los mismos. Un ejemplo de una sal de calcio adecuada es cloruro de calcio. Sin embargo, también se puede utilizar cualquier otro agente de lisis que la persona experta considere adecuado.

El lisado mecánico se puede llevar a cabo, por ejemplo, utilizando un ciclo de congelación-descongelación, al congelar una suspensión de plaquetas y descongelando después el material a temperatura superior a la ambiente, por ejemplo, de 30°C a 45°C. Este método ocasiona que las células se hinchen y se rompan al formarse cristales de hielo, seguido de una contracción al descongelarse. La hinchazón y contracción cíclicas ocasionan finalmente la rotura de las plaquetas. Dependiendo del número de ciclos de congelación y descongelación, se pueden lograr diversos grados de citólisis de plaquetas, por ejemplo, al menos 30%, al menos 50%, al menos 70%, al menos 90%, o hasta 100% de citólisis, por recuento de plaquetas. Dentro de la presente invención se puede considerar lisis mecánica, pero preferiblemente se prescinde de ella debido a la sospecha de pérdida de calidad del liberado.

Dentro del alcance de esta invención, "liberados de plaquetas liofilizadas" incluye "liberados de plasma ricos en plaquetas liofilizadas" o "LPRRL" como un tipo específico de liberado de plaquetas liofilizadas, sin estar limitado al mismo.

Dentro del alcance de esta invención, "anticoagulante" es una composición que inhibe la coagulación cuando se concentran o recolectan plaquetas para uso de acuerdo con la presente invención. Los anticoagulantes generalmente están disponibles como agentes complejantes/quelantes de iones de calcio, inhibidores de la síntesis del factor de coagulación, inhibidores de trombina o fármacos antiplaquetarios. Los inhibidores de la síntesis del factor de coagulación que inhiben la producción de determinados factores de coagulación en el

hígado incluyen composiciones como warfarina (Coumadin). Los inhibidores de trombina incluyen composiciones como heparina y lepirudina (Refludan). Los fármacos antiplaquetarios interactúan con las propias plaquetas e incluyen fármacos como aspirina, ticlopidina (Ticlid), clopidogrel (Plavix), tirofiban (Aggrastat), eptifibatida (Integrilin), etc.

- 5 La irradiación UV llevada a cabo en el paso a del método de esta invención implica preferiblemente exponer el liberado de plaquetas a irradiación UVA, preferiblemente una exposición a radiación UVA de una densidad de energía de entre 1 y 10 J/cm², más preferiblemente alrededor de 3 J/cm². La exposición a la irradiación UV se lleva a cabo preferentemente después de que el liberado de plaquetas se haya incubado con un agente fotoquímico, en particular un psoraleno, en particular amotosaleno, o riboflavina.
- 10 En el paso (d) del método de esta invención donde el liberado de plaquetas se pone en contacto con un solvente y/o detergente para disolver la membrana de virus envueltos u otros patógenos, preferentemente se hace uso de un solvente para incubar el concentrado de plaquetas seleccionado del grupo de di- o trialkilfosfatos, y es preferentemente tri-n-butilfosfato. Los detergentes adecuados para uso en el paso (d) del método de esta invención incluyen detergentes seleccionados del grupo de derivados de polioxietileno de ácidos grasos,
- 15 ésteres parciales de anhídridos de sorbitol, detergentes no iónicos, desoxicolato de sodio y sulfobetainas, y es preferible Triton X-45, Triton X-100 o Tween 80.

- La cantidad de aceite utilizada en el paso de extracción subsecuente para eliminar el solvente y/o detergente y los componentes disueltos en los mismos, puede variar dentro de un amplio intervalo, pero preferiblemente la cantidad de aceite oscila de 2 a 20 % en peso, preferiblemente de 5 a 15 % en peso, más preferiblemente
- 20 de 5 a 10 % en peso, basándose en el volumen total de la mezcla del concentrado de plaquetas y el solvente y/o el detergente. De este modo se hace uso preferente de un aceite de grado farmacéutico, por ejemplo, aceite de castor. En un proceso de extracción, normalmente se añade un cierto volumen de aceite al liberado de plaquetas y se somete a agitación en un mezclador de sangre durante un cierto periodo de tiempo, normalmente 30, 20 o 15 minutos o menos. A continuación, el recipiente en el que se realiza la extracción se puede suspender
- 25 en una posición invertida durante cierto periodo de tiempo, por ejemplo 10 minutos o menos o más, para obtener una fase superior de aceite y una fase inferior de liberado de plaquetas, que se separa por gravedad de la fase superior. Este paso puede repetirse una o dos o más veces, dependiendo de la eficacia de extracción.

- El método de la presente invención puede incluir después del paso de extracción e, al menos un paso de centrifugación para separar las plaquetas del aceite y una fase proteica acuosa. Generalmente, el liberado de
- 30 plaquetas se somete a centrifugación a baja temperatura, típicamente por debajo de 10°C, preferiblemente por debajo de 5°C, típicamente alrededor de 4°C, preferiblemente en una posición invertida para separar cualquier remanente de aceite en una fase superior y el liberado de plaquetas en una fase inferior que se obtiene por gravedad.

- El método de la presente invención puede incluir después del paso de filtración e, un paso de liofilización, para prolongar la vida útil del liberado de plaquetas. Antes de ser sometido a liofilización, el filtrado líquido o fluido
- 35 obtenido en el paso e se puede dividir en varios volúmenes, ajustándose el volumen de manera que cada volumen contenga el liberado de una cantidad predeterminada de plaquetas por cm³, por ejemplo, el liberado de alrededor de 2×10^5 a 2×10^7 plaquetas, más preferiblemente el liberado de alrededor de 2×10^6 plaquetas por cm³, pero cualquier otra concentración de plaquetas se puede seleccionar por la persona experta. El
- 40 producto obtenido con el método de esta invención combina las características de ser liofilizado en volúmenes razonables que son adecuados para uso inmediato sin necesidad de una división adicional en alícuotas adecuadas, con facilidad de almacenamiento y reconstitución, y de estar desprovisto de fibrinógeno.

En una realización preferible, para lograr la crioprotección de los factores de crecimiento, antes de la liofilización se suministra albúmina humana al filtrado líquido obtenido en el paso e.

- 45 Dentro del alcance de esta invención, "liofilización" se refiere a un proceso de secado en congelación o deshidratación que se utiliza a menudo para conservar plaquetas. Sin embargo, la liofilización también se puede utilizar no sólo como un proceso conservante, sino también como un tratamiento para lisar plaquetas, para lisar aún más las plaquetas después de la congelación-descongelación inicial o se realiza otra técnica de lisis. En otras palabras, de acuerdo con ejemplos de la presente divulgación, después de que se forman los liberados
- 50 como se describe en la presente, la liofilización proporciona el beneficio añadido de preservar los factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas y otros contenidos inicialmente encerrados en o unidos a la superficie de las plaquetas, pero que se liberan cuando las plaquetas se lisan como se describe en la presente, por ejemplo, lisis por congelación-descongelación. El proceso se lleva a cabo típicamente congelando el material y reduciendo la presión circundante para permitir que el agua congelada en el material sublime directamente de
- 55 la fase sólida a la fase gaseosa.

Si se desea, el concentrado de plaquetas se puede someter a un paso de eliminación de leucocitos antes de someter las plaquetas a un paso de activación para ocasionar la liberación de su contenido. La eliminación de leucocitos tiene como objetivo principal reducir el riesgo de aparición de complicaciones no deseadas asociadas con glóbulos blancos transfundidos presentes en unidades de glóbulos rojos y plaquetas.

El método de la presente invención está destinado para la preparación de un liberado de plaquetas sanguíneas desprovisto de fibrinógeno, rico en factores de crecimiento de concentrado de plaquetas de mamífero que pueden ser plaquetas de humano o de animales, por ejemplo, plaquetas de caballo. El liberado puede estar liofilizado o no.

- 5 Los liberados de plaquetas obtenidos con el método de esta invención se pueden utilizar para tratar heridas, úlceras o quemaduras. Los liberados de plaquetas se pueden aplicar en forma seca o forma rehidratada antes de la aplicación, o como un gel. Alternativamente, incluso si la piel no está dañada por una herida, úlcera o quemadura, se puede utilizar para reparar otros tipos de daños que se producen como resultado de envejecimiento, fotodaño, enfermedad patológica o degenerativa, o similares. La concentración de las
10 plaquetas en los liberados de plaquetas obtenidos con el método de esta invención puede variar dentro de intervalos amplios, pero preferiblemente la concentración es tan alta como sea posible para lograr un efecto máximo.

- En lo anterior, el término "herida" se refiere a cualquier daño en cualquier tejido de un sujeto, incluyendo daño a la piel, así como daño a tejidos más profundos. De este modo, la herida puede ser causada accidentalmente o intencionadamente, o puede haber sido causada por el curso normal de una condición patológica, de enfermedad o degenerativa. Por ejemplo, el daño puede ser como resultado de una lesión o cirugía. Ejemplos
15 no limitantes de lesiones incluyen úlceras, quemaduras, huesos rotos, pinchazos, cortes y rasguños, laceraciones, incisiones quirúrgicas, inflamación, infección y similares.

- Los liberados de plaquetas se pueden administrar utilizando los métodos de administración conocidos por la persona experta, incluyendo el uso de fluidos, aerosoles, pulverizaciones, brumas, lociones, cremas, ungüentos, geles, gomas, gotas o polvos nebulizados, frascos dispensadores, tejido preempapado, jeringas, vendas, parches dérmicos o emplastos, etc. En una realización preferible, el liberado de plaquetas obtenido con el método de esta invención se puede almacenar en una forma estable en un kit para uso en situaciones de emergencia para tratar heridas. El liberado de plaquetas se puede reconstituir para uso inmediato cuando
25 sea necesario. En otro aspecto, la presente invención se refiere a un aerosol, un fluido de tratamiento, una pulverización, una bruma, una loción, una crema, un ungüento, un gel, una goma, un vendaje, un parche dérmico, un emplasto que contiene los factores de crecimiento contenidos en el liberado de plaquetas obtenido con el método de esta invención.

- Los liberados de plaquetas obtenidos con el método de esta invención pueden contener cantidades aumentadas de factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, etc. Ejemplos de factores de crecimiento y otros materiales que pueden estar presentes en el liberado incluyen, sin limitación, PDGF, PDAF, VEGF, PDEGF, PF-4, TGF-B, FGF-A, FGF-B, TGF-A, IGF-1, IGF-2, BTG, TSP, vWF, PAI-1, IgG, IgM, IgA, KGF, EGF, FGF, TNF, IL-1, KGF-2, fibropéptido A, fibrinógeno, albúmina, osteonectina, gro-alfa, vitronectina, dímero D de fibrina, factor V, antitrombina III, macroglobulina α_2 , angiogenina, Fg-D y elastasa. Con mayor detalle, los
35 factores de crecimiento, citocinas o similares que pueden estar presentes e incluir, sin limitación, LIF, factores de crecimiento anticancerígenos como IGFBP3, eicosanoides como PGs o leucotrienos, IL-1 TNF alfa, INFs, TNF- α , IL-6, IL-1 (a/b), metabolitos prostanoïdes, componentes del complemento, intermediarios reactivos de oxígeno, metabolitos de ácido araquidónico, factores de coagulación, nitratos y quimiocinas. Los factores de crecimiento derivados humanos, las quimiocinas, citocinas y hormonas pueden incluir alfa defensina, alfa sinucleína, beta sinucleína, 4-1 BBL, 6Ckina, FGF ácido, activina A, activina R1b, angiopoietina 2, B-DNF, BAFF, BCA-1, BCA-1, BD-1, BMP-2, BMP-4, BMP-7, BMPRA1, BDNF, CNTF, CTGF, CTI_A-4Fc, CXCL1, CXCL2, cardiotrofina-1, Cripto, Cistatina C, Dkk-1, EGF AOF, EGF, EMAP II, ENA-78, EPO, Eotaxina, FGF básico AOF, FGF-10, FGF-16, FGF 17, FGF 18, FGF19, FGF4, FGF6, FGF7, FGF8, FGF8b, FGF9, Flt3, G-CSF, GDNF, GMCSF, HGF, HGH, IFN alfa A, IFN alfa A/D, IFN alfa D, IFN alfa α_2b , IFN, beta 1A, IFN-gamma, IGF1, IGF1i, IGFBP-4, IGFBP6, IL1 alfa, IL-1Beta, IL10, IL11, IL12, IL13, IL15, IL17, IL17A, IL17F, IL18, IL19,
45 IL2, IL20, IL21, IL23, IL28A, IL28B, IL29, IL3, IL31, IL33, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, ITAC, KGF2, Calicreína1 1, Calicreína4, Calicreína7, LEFTY-A, LIF, Leptina, MCSF AOF, MCSF, MCP-1, MCP2, MCP3, MCP4, MDC, MIG, MIP1 alfa, MIP1 beta, MIP3 alfa, MIP3 beta, MIP4, MIP5, midcina, NAP2, NT3, NT4, Neurtactina, neurturina, Oncostatina, osteoprotegerina, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PTN, ligando Rank, receptor Rank, RANTES< SCF, SCFAOF, SDF-1 alfa, SDF-1 Beta, CD4, CD40L, TNF-RI, TNFRII, TARC, TECK, TGF alfa, TGF1 Betal, TGF Beta2, TGF Beta3, TNF beta/linfotóxina, TNF-alfa, TPO, TRAIL, TWEAK y VEGF.
50

- El liberado de plaquetas obtenido con el método de la presente invención tiene dos indicaciones principales en las que ha demostrado ser de valor significativo, aunque también se puede utilizar en otras indicaciones. La primera indicación es su uso como agente terapéutico para aumentar la proliferación de células de linaje múltiple en medicina regenerativa y en el manejo de heridas que no se curan y úlceras resistentes. En estas aplicaciones, el liberado de plaquetas que contiene factores de crecimiento utilizado se ha preparado a partir de plaquetas de humano o de caballo. El liberado de plaquetas obtenido con el método esta invención también se puede utilizar en medios de cultivo celular, en particular células madre, fibroblastos o células dendríticas. La
55 segunda indicación es como un sustituto del suero fetal bovino en medio de cultivo celular. Los liberados de plaquetas desprovistos de fibrinógeno evitan los efectos indeseables de la formación de gel, y someter el liberado a dos pasos de reducción patogénica/viral garantiza la seguridad del producto. Como resultado, los
60

concentrados de plaquetas autólogas ya no son una necesidad, y el concentrado de plaquetas de mamífero que se utiliza en el método de esta invención puede comprender un conjunto de plaquetas que se originan a partir de diferentes sujetos mamíferos.

La presente invención se ilustra con más detalle en el ejemplo a continuación.

5 Ejemplo 1

Se conectó un humano a una máquina de aféresis (Haemonetics_MCS +9000^a) para obtener un concentrado rico en plaquetas, con un recuento de plaquetas de 3-5 veces el recuento inicial. El concentrado rico en plaquetas se incubó con Riboflavina y se irradió con rayos UV mediante el sistema MIRASOL™ como un primer paso de reducción de patógenos. A continuación, se añadió Trombina^b estéril en una concentración adecuada de 500 unidades/cmm para activar las plaquetas en dicho concentrado. Esto dio lugar a la liberación subsecuente de gránulos plaquetarios de dosis suprafisiológicas de factores de crecimiento y citocinas. Además, las plaquetas activadas liberaron el contenido de fibrinógeno de los gránulos alfa, la cual es activada por trombina para formar un coágulo insoluble. Cuando se centrifugó, el concentrado de plaquetas tratado con trombina se separó en un sobrenadante que comprendía un líquido o fluido rojo claro que consistía esencialmente en plaquetas lisadas, cuyo contenido eran dosis suprafisiológicas de factores de crecimiento liberados de gránulos plaquetarios, y un depósito de coágulo de fibrina insoluble. El sobrenadante se transfirió a un nuevo recipiente para los siguientes pasos de preparación. El liberado de plaquetas se trató con un sistema de solvente y detergente (TNBP^c al 0.3% y Tween 20^d al 1%), durante 1 hora a 31°C. Este paso es capaz de alterar los virus envueltos (principalmente HBC, HCV y VIH). A continuación, el solvente y el detergente se eliminan mediante tres pasos consecutivos de extracción con aceite vegetal. Se añade aceite de castor estéril (7.5% del volumen total) al liberado de plaquetas y se somete la mezcla a agitación en un mezclador de sangre durante 15 minutos, después se suspende el recipiente en una posición invertida durante 10 minutos para obtener una fase superior de aceite y una fase inferior de lisado de plaquetas, que se separa por gravedad de la fase superior. Este paso se repite otras dos veces, luego el liberado de plaquetas se centrifuga durante 20 minutos a 4 °C y 1500g, en una posición invertida para separar cualquier resto de aceite en una fase superior y el liberado de plaquetas en una fase inferior que se obtiene por gravedad

A continuación, el liberado de plaquetas se somete a un paso de filtración estéril para asegurar la eliminación de cualquier contaminante bacteriano y luego el filtrado líquido o fluido se dispensa en volúmenes predeterminados, (ajustados de acuerdo con los recuentos iniciales de plaquetas del concentrado para asegurar un equivalente de alrededor de 1 millón de plaquetas por cm³) en viales de vidrio y liofilizar dicho filtrado que consiste principalmente en factores de crecimiento derivados de plaquetas.

Ejemplo 2.

El liberado de plaquetas obtenido en el ejemplo 1 se utilizó para lograr rejuvenecimiento facial. Se inyectó un vial que procedía de 2×10^6 plaquetas en cada lado de la cara de una mujer en la barbilla, mejilla y el pliegue nasolabial. El enrojecimiento, dolor y la hinchazón se pudo reducir considerablemente. El efecto regenerativo dura al menos 6 meses.

Experimento comparativo.

Se inyectó un volumen que contenía 2×10^6 plaquetas autólogas en cada lado de la cara de una mujer, que sufría los mismos defectos que en el ejemplo 2. El enrojecimiento, dolor y la hinchazón solamente se pudieron reducir de forma limitada.

Ejemplo 3.

El liberado de plaquetas obtenido en el ejemplo 1 se utilizó para lograr alivio del dolor en el tratamiento del dolor de espalda baja. Se inyectaron dos viales que procedían de 2×10^6 plaquetas en la parte inferior de la espalda. El dolor se pudo reducir significativamente. El tratamiento se repitió una semana después, mediante la inyección de un vial. El efecto regenerativo duró varios meses.

Ejemplo 4.

El liberado de plaquetas obtenido en el ejemplo 1 se incorporó a un apósito para heridas de hidrogel de alginato de sodio colágeno, y se aplicó a una úlcera diabética que no se había podido curar por más de 6 meses. En pocos días se logró curación significativa de la herida.

50 Ejemplo 5.

Se preparó un liberado de plaquetas de acuerdo con el método del ejemplo 1, esta vez utilizando sangre de caballo. Se inyectaron dos viales que se originaron de 2×10^6 plaquetas en un músculo lesionado de un caballo. El tratamiento se repitió al cabo de una semana. El músculo se curó sin que quedara ninguna lesión.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un liberado de plaquetas que contiene factores de crecimiento a partir de un concentrado de plaquetas de mamífero fluido, que comprende los pasos consecutivos de
 - a. someter el concentrado de plaquetas a un primer paso de reducción de la concentración de patógenos con el propósito de alterar tanto ADN como ARN de microorganismos presentes en el concentrado de plaquetas;
 - b. someter el concentrado de plaquetas a un paso de activación poniéndolo en contacto con un agente activador, con el propósito de ocasionar que las plaquetas liberen al menos parte de los gránulos alfa y factores de crecimiento presentes en el mismo, proporcionando así un liberado de plaquetas fluido;
 - c. someter el liberado de plaquetas fluido a un paso de reducción de la concentración de fibrinógeno y recuperar un liberado de plaquetas fluido desprovisto de fibrinógeno;
 - d. someter el liberado de plaquetas fluido desprovisto de fibrinógeno a un segundo paso de reducción de la concentración de patógenos con el propósito de alterar virus envueltos;
 - e. someter el liberado de plaquetas a filtración estéril y recuperar del paso de filtración un líquido filtrado que contiene los factores de crecimiento,
 - f. dividir el líquido filtrado en porciones individuales, en las que el volumen de la porción individual se ajusta de forma que cada porción contiene aproximadamente el mismo número de plaquetas,
 - g. someter a liofilización las porciones individuales de líquido filtrado así obtenidas.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el agente activador es una solución que contiene uno o más compuestos seleccionados del grupo de una sal de calcio, trombina, colágeno, tromboxano A2 y adenosín difosfato (ADP), preferiblemente una solución que contiene trombina.
3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primer paso de reducción de la concentración de patógenos comprende incubar el concentrado de plaquetas con un agente activo fotoquímico y exponer el concentrado de plaquetas a irradiación UV.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la irradiación UV es irradiación UVA, preferiblemente radiación UVA de una densidad de energía entre 1 y 10 J J/cm², más preferiblemente radiación UVA de una densidad de energía de 3 J/cm².
5. El método de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que el agente activo fotoquímico es un psoraleno, en particular amotosaleno o riboflavina.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el segundo paso de reducción de la concentración de patógenos comprende incubar el liberado de plaquetas con un solvente y/o detergente, seguido de eliminar el solvente y/o detergente y recuperar el liberado de plaquetas desprovisto de solvente y/o detergente.
7. El método de la reivindicación 6, en el que el solvente para incubar el concentrado de plaquetas se selecciona del grupo de di- o trialkilfosfatos, preferiblemente tri-n-butilfosfato.
8. El método de la reivindicación 6 o 7, en el que el detergente se selecciona del grupo que comprende uno o más derivados de polioxietileno de ácidos grasos, ésteres parciales de anhídridos de sorbitol, detergentes no iónicos, desoxicolato de sodio y sulfobetainas, y es preferiblemente Triton X-45, Triton X-100 o Tween 80.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que el solvente y/o detergente se eliminan del liberado de plaquetas mediante una extracción con aceite.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la extracción con aceite se lleva a cabo en presencia de una cantidad de aceite que oscila de 2 a 20 % en peso, preferiblemente de 5 a 15 % en peso, más preferiblemente de 5 a 10 % en peso, basándose en el peso total de la mezcla del concentrado de plaquetas y el solvente y/o el detergente
11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además al menos un paso de centrifugación del liberado de plaquetas, después de la eliminación del solvente y/o detergente en el segundo paso de reducción de la concentración de patógenos.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el filtrado líquido se divide en porciones individuales que contienen el liberado de alrededor de 2×10^5 - 2×10^7 plaquetas por cm³, preferiblemente el liberado de alrededor de 2×10^6 plaquetas por cm³.

13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que se suministra albúmina humana al líquido filtrado obtenido en el paso e, antes de someter el líquido filtrado a liofilización,
- 5 14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que antes de someter el concentrado de plaquetas al paso b de activación, el concentrado de plaquetas se somete a un paso de inactivación de leucocitos.
15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el concentrado de plaquetas de mamífero es rico en factores de crecimiento de plaquetas de humano o plaquetas de caballo.
- 10 16. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el concentrado de plaquetas de mamífero comprende un conjunto de concentrados de plaquetas que proceden de diferentes sujetos.
17. Un liberado de plaquetas que contiene factores de crecimiento obtenido con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 para uso en medicina regenerativa, en particular para una o más aplicaciones seleccionadas del grupo de mejora de la proliferación de células de linaje múltiple y la promoción de la curación de heridas y curación de úlceras.
- 15 18. Uso de un liberado de plaquetas que contiene factores de crecimiento obtenido con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 en uno o más medios de cultivo celular seleccionados de células madre, fibroblastos o células dendríticas.
- 20 19. Una formulación que contiene el liberado de plaquetas que contiene factores de crecimiento obtenido con el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, seleccionada de uno o más del grupo de un aerosol, un fluido de tratamiento, una pulverización, una bruma, una loción, una crema, un ungüento, un gel, una goma, un vendaje, un parche dérmico, un emplasto.