

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 955 282**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/19 (2015.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2018 PCT/EP2018/066020**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2018 WO18229278**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2018 E 18732057 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2023 EP 3638263**

(54) Título: **Proceso para preparar un lisado de plaquetas humanas combinadas y su uso para el tratamiento de trastornos neurológicos**

(30) Prioridad:

16.06.2017 EP 17305739

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.11.2023

(73) Titular/es:

**CENTRE HOSPITALIER RÉGIONAL ET UNIVERSITAIRE DE LILLE (CHRU) (20.0%)
2, avenue Oscar Lambret
59000 Lille, FR;
UNIVERSITÉ DE LILLE (20.0%);
UNIVERSITE DU LITTORAL COTE D'OPALE (20.0%);
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (20.0%) y
TAIPEI MEDICAL UNIVERSITY (20.0%)**

(72) Inventor/es:

**DEVOS, DAVID;
BURNOUF, THIERRY;
DEVEDJIAN, JEAN-CHRISTOPHE;
CHOU, MING-LI y
GOUEL, FLORE**

(74) Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 955 282 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

Proceso para preparar un lisado de plaquetas humanas combinadas y su uso para el tratamiento de trastornos neurológicos

- 5 La invención es como se define por las reivindicaciones. Las referencias a los métodos de tratamiento mediante terapia o cirugía o métodos de diagnóstico *in vivo* en esta descripción deben interpretarse como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en esos métodos.

10 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un proceso para obtener un nuevo lisado de plaquetas humanas combinadas, el propio lisado de plaquetas humanas combinadas y su uso para el tratamiento de trastornos neurológicos tales como trastornos neurodegenerativos, neuroinflamatorios, del desarrollo neurológico y/o neurovasculares (es decir, accidentes cerebrovasculares), así como también a las consecuencias de lesiones cerebrales (traumatismo craneoencefálico, hipoxia...).

Estado de la técnica

20 Teniendo en cuenta los enormes impactos sociales y económicos que estos trastornos suponen para los pacientes y sus cuidadores, se necesita con urgencia desarrollar una "estrategia modificadora de enfermedades" eficaz que proporcione neuroprotección, neurorrestauración y neurogénesis para tratar trastornos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Parkinson (EP), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la enfermedad de Alzheimer (EA).

25 Dada la falta de tratamientos validados, también se espera en gran medida el desarrollo de tratamientos eficaces que proporcionen neurorrestauración y neurogénesis para compensar la pérdida de neuronas y posteriores lesiones del sistema nervioso central, tales como hipoxia grave después del parto o paro cardíaco o traumatismo craneoencefálico grave.

30 Existe una evidencia sustancial de que las neurotrofinas, como activadores y moduladores de vías de señalización neuronal, representan una estrategia terapéutica lógica para los trastornos neurológicos¹. La aplicación de factores de crecimiento neurótrofos recombinantes únicos ha proporcionado resultados alentadores para la protección y reparación neuronal tanto en modelos celulares como animales.

35 El factor de crecimiento derivado de plaquetas-CC (PDGF-CC, del inglés *platelet-derived growth factor-CC*) demostró ser un potente factor neuroprotector en varios modelos animales de lesión neuronal, mientras que el PDGF-BB y el factor neurótrofo derivado del cerebro (BDNF, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*), administrados a través de la vía intracerebroventricular (i.c.v.), estimularon la neurogénesis². Además, la administración sistémica del BDNF en un modelo fototrombótico de accidente cerebrovascular focal podría inducir la neurogénesis y mejorar la función

40 sensitivomotora. El factor de crecimiento transformante β (TGF-β, del inglés *transforming growth factor-β*) podría promover el desarrollo y la supervivencia de neuronas dopaminérgicas y la neuroprotección en modelos animales con la enfermedad de Parkinson, y mejoró el efecto trófico del factor neurótrofo derivado de los neurogliocitos (GDNF, del inglés *glial-derived neurotrophic factor*) en ratas hemiparkinsonianas³.

45 Los estudios preclínicos mostraron neuroprotección mediante el factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF, del inglés *basic-fibroblast growth factor*) y el factor de crecimiento endotelial vascular β (VEGF-β, del inglés *vascular endothelial growth factor-β*), y promoción de la neuroprotección y la neurorrestauración mediante GDNF⁴.

50 Desafortunadamente, todos los estudios clínicos aleatorizados que implican la administración i.c.v. de factores de crecimiento individuales en dosis elevadas no han logrado producir efectos clínicos positivos sustanciales.

Actualmente, la administración de neurotrofinas individuales en patologías neurodegenerativas tan complejas y polifacéticas es insuficiente para obtener resultados terapéuticos significativos.

55 Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar un enfoque novedoso que combine varias neurotrofinas recombinantes, lo que probablemente sería más poderoso, pero esto supone un desafío conceptual, en particular a la hora de buscar la aprobación de las autoridades reguladoras, lo que justifica estrategias más pragmáticas inspiradas en otros campos de la medicina regenerativa.

60 Los concentrados de plaquetas son un producto terapéutico bien establecido, incluido en la lista modelo de medicamentos esenciales de la OMS, que se utilizan normalmente en la profilaxis y el tratamiento de trastornos hemorrágicos resultantes de la trombocitopenia. Además de su papel en la hemostasia, las plaquetas ejercen funciones fisiológicas fundamentales en la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos⁵.

65 La gama de aplicaciones de medicina regenerativa⁶ y terapia celular⁷ donde se evalúan plaquetas y lisados de plaquetas es cada vez más amplia. El beneficio terapéutico de las plaquetas en la cicatrización de tejidos es

- multifactorial y resulta de la gran cantidad de mediadores bioactivos almacenados principalmente en los gránulos α y γ que actúan en sinergia. Estos incluyen factores de crecimiento neurótrofos, tales como PDGF (isoformas -AA, -AB y -BB), BDNF, VEGF, TGF-β, bFGF o el factor de crecimiento epitelio (EGF, del inglés *epithelium growth factor*). Recientemente se demostró que la administración intracranal de lisados de plaquetas en modelos animales de accidente cerebrovascular estimula la proliferación de células madre neurales endógenas (eNSC, del inglés *endogenous neural stem cells*) y la angiogénesis en la zona subventricular y en la corteza perilesional, lo que lleva a mejores resultados funcionales y reduce las lesiones, y sugiere efectos neuroprotectores⁸.
- El documento US 2014/0176602 propone una mezcla biológica vírica inactivada y su preparación. En particular, este documento describe un método para preparar un extracto de plaquetas inocuo para los virus, comprendiendo el método las siguientes etapas de proporcionar una fracción enriquecida en plaquetas de más de un donante, realizar un tratamiento de inactivación vírica con disolvente detergente (D/D), poner en contacto el material tratado con D/D con un polímero anfílico no tóxico, eliminar el D/D y someter el material a al menos un tratamiento de inactivación vírica independiente más. La inactivación vírica independiente puede ser una pasteurización que se lleva a cabo a 60 °C durante 10 horas en presencia de estabilizadores como sacarosa y glicina.
- El documento US 2012/0156306 describe un extracto de plaquetas inocuo para los virus, siendo dicho extracto no coagulable. En particular, este documento describe un método para preparar un extracto de plaquetas inocuo para los virus, comprendiendo dicho método al menos dos tratamientos de inactivación vírica independientes, por ejemplo, tratamiento de inactivación vírica con disolvente detergente (D/D) e inactivación por calor. La inactivación por calor es una pasteurización que se lleva a cabo a 60 °C durante 10 horas para destruir los virus tanto con envoltura lipídica como sin envoltura lipídica. Se añadieron sacarosa y glicina a la solución para que sirvieran como estabilizadores durante la pasteurización.
- En los dos documentos citados anteriormente, los extractos de plaquetas inocuos para los virus resultantes presentan un contenido elevado de fibrinógeno gracias a la presencia de estabilizadores durante la etapa de pasteurización. De hecho, se sabe por el documento US 5.116.950 que los estabilizadores, tales como la sacarosa o la glicina, ejercen un efecto de alta estabilización del fibrinógeno al calentarse en líquido. En particular, la tabla 1 muestra que la adición de sacarosa proporciona un efecto estabilizante particularmente excelente.
- El documento US 2016/0074481 se refiere al campo de los derivados plaquetarios y más concretamente al campo de los concentrados de factores de crecimiento que se obtienen a partir de plaquetas. En particular, se divulga un método para preparar un concentrado coagulable de factores de crecimiento plaquetario. Por el término "coagulable" se entiende que el concentrado de factores de crecimiento plaquetario comprende tanto fibrinógeno como factor de coagulación XIII. En concreto, la concentración de fibrinógeno en el concentrado coagulable de factores de crecimiento plaquetario es preferentemente superior a 1, más preferentemente superior a 1,5 e incluso más preferentemente superior a 2,5 g/l del concentrado.
- El documento US 2013/0143810 se refiere a extractos de plaquetas humanas ricos en factores de crecimiento para la cicatrización de heridas y la expansión de células madre. Este documento se refiere a un lisado de plaquetas que contiene factores de crecimiento víricamente inactivados y empobrecido en PDGF y VEGF, que está preferentemente enriquecido en TGF, IGF y EGF. En la tabla 1 se describe que las composiciones de concentrado de plaquetas tratadas con D/D después de la extracción de aceite (D/D-PC-O) y después del tratamiento con carbón (D/D-PC-OC) presentan una concentración de fibrinógeno de $4,5 \pm 0,3$ mg/ml y $2,65 \pm 0,7$ mg/ml respectivamente.
- B. Copland *et al.* ("The effect of platelet lysate fibrinogen on the functionality of MSCs in immunotherapy" Biomaterials 34 (2013) 7840-7850) investigaron el lisado de plaquetas empobrecido en fibrinógeno como un producto para expandir las MSC humanas para su uso en terapia de inmunomodulación. La figura 2c es una comparación del contenido de fibrinógeno de preparaciones de lisado de plaquetas empobrecido en fibrinógeno. Cada lote descrito por B. Copland presenta un contenido de fibrinógeno de al menos 4 mg/ml.
- El documento WO 2013/003356 describe composiciones que comprenden lisados de plaquetas empobrecidos en fibrinógeno, usándose dichas composiciones como medio de cultivo celular. El empobrecimiento de fibrinógeno del lisado de plaquetas se realiza mediante heparina y sales metálicas. Por otra parte, dichas composiciones empobrecidas en fibrinógeno tienen una concentración de fibrinógeno de aproximadamente 2 o 4 µg/ml.
- Sin embargo, los lisados de plaquetas contienen fibrinógeno transmitido por plasma, una proteína que desempeña un papel causal en los trastornos neurológicos como un potente inductor de la inflamación y un inhibidor del crecimiento de axones⁹. Esta puede ser una razón por la que aún no se ha informado de la aplicación de lisados de plaquetas en el campo de los trastornos neurodegenerativos en seres humanos, tales como la enfermedad de Parkinson.
- Objeto de la invención**
- La invención se basa en los hallazgos inesperados de que, cuando el lisado de plaquetas humanas combinadas (pHPL, del inglés *pooled human platelet lysate*) se trata en condiciones específicas, es capaz de potenciar el tratamiento de trastornos neurológicos mediante la inducción de un mejor efecto neuroprotector y de neurorrestauración.

Un lisado de plaquetas humanas combinadas de acuerdo con la invención es un lisado de plaquetas humanas obtenido a partir de al menos dos lisados de plaquetas de diferentes donantes. Preferentemente, el lisado de plaquetas humanas combinadas se obtiene de al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 100, al menos 140, al menos 180, al menos 200 y, de manera más particular, de al menos 240 lisados de plaquetas diferentes de diferentes donantes.

En particular, los inventores han descubierto que el tratamiento térmico del pHPL reduce el contenido proteico total del lisado y promueve un potencial neuroprotector y neorrestaurador mejorado.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para preparar un lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor, comprendiendo dicho proceso las etapas de:

- a) Proporcionar un lisado de plaquetas humanas combinadas (pHPL),
- b) Tratar con calor el lisado de plaquetas humanas combinadas a una temperatura de 55 °C a 65 °C durante 20 a 40 minutos,
- c) Purificar el lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor de la etapa b).

El proceso de la invención conduce a un lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor (HT_pHPL, del inglés *heat-treated pooled human platelet lysate*) que tiene un contenido de fibrinógeno inferior al 3 %, inferior al 2, inferior al 1 % y más preferentemente inferior al 0,1 % en peso del contenido de fibrinógeno del pHPL no tratado con calor. La concentración de fibrinógeno del pHPL tratado con calor es inferior a 50 ng/ml, inferior a 40 ng/ml, inferior a 30 ng/ml, inferior a 20 ng/ml y más preferentemente inferior a 15 ng/ml.

En particular, el pHPL tratado con calor no contiene fibrinógeno. Por la expresión "no contiene fibrinógeno" se entiende que la concentración de fibrinógeno en el HT_pHPL no supera los 15 ng/ml, en particular no excede 10 ng/ml y de manera más particular, no supera los 5 ng/ml.

De acuerdo con la invención, la primera etapa del proceso consiste en proporcionar un lisado de plaquetas humanas combinadas (pHPL). Este pHPL se puede preparar de acuerdo con métodos bien conocidos a partir de concentrado de plaquetas (CP), que induce la liberación de factores de crecimiento y otras moléculas activas.

Por ejemplo, el pHPL se puede preparar mediante el método que comprende las siguientes etapas de:

- i) proporcionar concentrados de plaquetas,
- ii) lisar por separado cada concentrado de plaquetas de la etapa i) y
- iii) mezclar los lisados resultantes de la etapa ii) para obtener un lisado de plaquetas humanas combinadas.

Los concentrados de plaquetas proporcionados en la etapa i) pueden provenir de diferentes donantes y pueden obtenerse mediante métodos de recogida convencionales adecuados de fuentes de plaquetas alogénicas. En particular, el concentrado de plaquetas puede obtenerse de sangre completa mediante la técnica de capa leucocitaria o plasma rico en plaquetas (PRP), o puede recogerse mediante una técnica de aféresis. Preferentemente, el concentrado de plaquetas se produce a partir de sangre completa mediante la técnica de capa leucocitaria o (PRP)¹⁰.

En el "método PRP", la sangre completa anticoagulada se centrifuga con un centrifugado suave en condiciones validadas para separar los glóbulos rojos (RBC, del inglés *red blood cells*) de la mitad superior que contiene una mezcla de plaquetas y plasma, el llamado PRP. A continuación, las plaquetas se concentran mediante centrifugación fuerte con curvas de aceleración y desaceleración validadas. La bolsa de concentrado de plaquetas se deja estacionaria a temperatura ambiente y después el concentrado se resuspende en plasma. En el método de la "capa leucocitaria", la sangre entera anticoagulada se centrifuga con un centrifugado intenso con curvas de aceleración y desaceleración validadas para separar el plasma "sin células" en la capa superior, una capa intermedia llamada capa leucocitaria (BC, del inglés *buffy coat*) y una capa inferior de glóbulos rojos (RBC). La capa BC se transfiere a una bolsa satélite. Una pequeña cantidad de plasma se devuelve a la capa BC y se mezcla suavemente antes de volver a someterla a una centrifugación ligera con curvas de aceleración y desaceleración validadas. A continuación, el sobrenadante de PRP se coloca en el depósito de plaquetas y puede almacenarse a 22+- 2 °C.

En el método de aféresis, los concentrados de plaquetas pueden obtenerse a través de un dispositivo médico extracorpóreo utilizado en la donación de sangre que separa las plaquetas y devuelve otras partes de la sangre al donante.

El plasma utilizado para suspender el concentrado en el "método PRP", el plasma devuelto a la capa BC en el método "capa leucocitaria" o el plasma recogido con plaquetas mediante aféresis puede sustituirse por una solución de aditivo de plaquetas (PAS, del inglés *platelet additive solution*) o por una mezcla entre plasma y PAS, y preferentemente por una mezcla entre plasma y PAS. Dicha mezcla entre plasma y PAS puede contener de aproximadamente un 30 % a

un 40 % en peso de plasma y de aproximadamente un 70 % a un 60 % en peso de PAS.

El concentrado de plaquetas proporcionado en la etapa i) puede someterse a un tratamiento de leucocitopenia. Este tratamiento conduce al agotamiento de los leucocitos y puede lograrse mediante filtración en un filtro de leucorreducción o durante la recogida de plaquetas mediante aféresis.

5 El concentrado de plaquetas proporcionado en la etapa i) puede someterse a una etapa de tratamiento de inactivación vírica/de patógenos antes de la lisis. El tratamiento de inactivación vírica/de patógenos aplicado al concentrado de plaquetas puede seleccionarse del sistema Intercept® Blood (de Cerus Corporation), del sistema Mirasol® PRT (de Terumo BCT) o de THERAFLEX-UV (de Macopharma). Estos procedimientos son bien conocidos por un experto en la materia y tienen como objetivo, con o sin la adición de un agente fotoinactivante, la alteración de los ácidos nucleicos.

10 En una realización, el concentrado de plaquetas se somete a un tratamiento de leucocitopenia y a un tratamiento de inactivación vírica/de patógenos. Preferentemente, el tratamiento de leucocitopenia se realiza antes del tratamiento de inactivación vírica/de patógenos.

15 La etapa ii) de lisar por separado cada concentrado de plaquetas se puede lograr mediante cualquier método conocido en la materia. Por ejemplo, la lisis plaquetaria se puede lograr mediante uno o más ciclos de congelación/descongelación, mediante activación plaquetaria inducida por la adición de trombina o CaCl₂, mediante la aplicación de ultrasonidos o mediante tratamiento con disolvente/detergente (D/D). Preferentemente, la etapa ii) de lisar los concentrados de plaquetas se logra mediante uno o más ciclos de congelación/descongelación, y más preferentemente mediante al menos tres ciclos. Cuando la lisis se logra mediante uno de los métodos anteriores, también se puede realizar una etapa de centrifugación y filtración para eliminar los restos celulares.

20 25 A continuación, la etapa iii) consiste en mezclar los lisados para obtener un conjunto de HPL, también llamado pHPL. Por lo tanto, el conjunto de HPL se obtiene mediante la mezcla de los concentrados de plaquetas lisadas de al menos 2 lisados de plaquetas de diferentes donantes. Preferentemente, el conjunto de HPL se obtiene mediante la mezcla de menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 100, al menos 140, al menos 180, al menos 200 y, de manera más particular, al menos 240 lisados de plaquetas diferentes recogidas de diferentes

30 donantes.

35 Un lisado de plaquetas humanas combinadas (pHPL) adecuado para el proceso de la invención puede ser cualquier lisado de plaquetas humanas combinadas de centros de transfusiones o de proveedores comerciales. Por ejemplo, el lisado de plaquetas humanas combinadas puede obtenerse de Macopharma (Tourcoing, Francia; lisado de plaquetas humanas MultiPL'30®), de Cook-Regentec (Indianápolis, EE. UU.; lisado de plaquetas humanas Stemulate®), de Stemcell Technologies (Grenoble, Francia; lisado de plaquetas humanas) o también de Sigma-Aldrich (lisado de plaquetas humanas PLTMax®).

40 45 La segunda etapa del proceso de la invención consiste en tratar con calor el pHPL. Esta etapa se realiza preferentemente sin añadir los estabilizadores que se utilizan normalmente para mantener la actividad biológica de las proteínas. Dichos estabilizadores son, por ejemplo, sacarosa, sorbitol, manitol o aminoácidos, tales como arginina o lisina. El tratamiento térmico se puede realizar preferentemente a una temperatura de aproximadamente 50 °C a 70 °C, preferentemente de aproximadamente 52 °C a 60 °C y más preferentemente a una temperatura de aproximadamente 56 °C. De hecho, los resultados más prometedores en términos de reproducibilidad de la neuroprotección y la neurorrestauración se obtuvieron para el pHPL tratado a aproximadamente 56 °C.

50 En una realización preferente, la duración del tratamiento térmico es de aproximadamente 20 a 40 minutos, preferentemente de aproximadamente 30 minutos.

55 60 Por otra parte, después del tratamiento térmico, el pHPL se puede enfriar durante al menos 5 minutos, preferentemente a una temperatura de aproximadamente 2 a 5 °C, antes de la etapa de purificación c).

De manera ventajosa, el pHPL tratado con calor proporcionado en la etapa a) puede someterse antes de la etapa b) a un tratamiento que induzca una activación de la cascada de coagulación. Por ejemplo, el pHPL tratado con calor puede mezclarse con perlas de vidrio (GB, del inglés *glass beads*) y CaCl₂ con agitación, o solo con CaCl₂. Este tratamiento conduce a la formación de un coágulo que se elimina después de la centrifugación y, por tanto, el pHPL resultante no contiene fibrinógeno. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, los inventores creen que este tratamiento contribuye a una menor toxicidad y a un efecto neuroprotector mejorado del pHPL de acuerdo con la invención.

65 La tercera etapa del proceso de la invención consiste en purificar el lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor. Esta etapa de purificación se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido en la materia, tal como, por ejemplo, centrifugación o filtración.

La centrifugación se puede llevar a cabo de manera ventajosa a una temperatura de aproximadamente 2 a 6 °C, por ejemplo, durante al menos 10 min a 9000 × g a 11000 × g.

Cuando se utiliza la filtración, el pHPL tratado con calor se hace pasar de manera ventajosa a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de 5 µm a 0,2 µm, preferentemente se utiliza una secuencia de dos o más filtros sucesivos que tienen tamaños de poro decrecientes con un tamaño de poro respectivo de 5 µm a 0,2 µm.

- 5 De manera ventajosa, la purificación del lisado de pHPL tratado con calor en la etapa c) se lleva a cabo mediante centrifugación. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, los inventores creen que la centrifugación a bajas temperaturas como se describe anteriormente puede contribuir a eliminar aún más los componentes insolubles en frío, tales como el fibrinógeno, que precipitan.
- 10 El proceso de la presente invención puede comprender además una etapa de congelar y almacenar el pHPL tratado con calor obtenido en la etapa c) a un intervalo de temperatura de -20 °C a -85 °C, preferentemente de -25 °C a -50 °C y más preferentemente alrededor de -30 °C. De manera alternativa, el pHPL tratado con calor se puede liofilizar antes de almacenarlo.
- 15 En una realización, el proceso de la presente invención comprende además después de la etapa b), y antes de la congelación o liofilización opcional, una etapa de inactivación vírica o eliminación de virus y/o eliminación de priones. Los métodos adecuados de inactivación vírica o eliminación de virus incluyen, pero sin limitación, tratamiento con disolvente/detergente (tratamiento D/D), tratamiento con detergente únicamente, pasteurización, tratamiento con vapor, tratamiento con UV, irradiación gamma, tratamiento de pH bajo, tratamiento con ácido caprílico y nanofiltración.
- 20 Por ejemplo, el tratamiento D/D se puede realizar con el 1 % de tributil-fosfato y el 1 % de Triton X-100 a 31 °C durante 1 hora. El tratamiento de pasteurización puede realizarse mediante un tratamiento térmico a 60 °C durante 10 horas en presencia de estabilizadores. La nanofiltración puede realizarse con filtros específicos para virus de 15, 20 o 35 nm, o filtros equivalentes de eliminación de patógenos conocidos en la materia.
- 25 Por lo tanto, en esta realización, el pHPL tratado con calor obtenido es inocuo con respecto a los virus. La expresión "inactivación vírica" se refiere a una situación en donde los virus se mantienen en el lisado de plaquetas humanas pero se hacen no viables, por ejemplo, mediante la disolución de su capa lipídica o mediante la destrucción de su estructura vírica. La expresión "eliminación de virus" se refiere a una situación en donde los virus, que tienen estructuras rígidas de gran tamaño, se eliminan del lisado de plaquetas humanas mediante la retención en un nanofiltro, mientras que los componentes del lisado de plaquetas humanas pasan por dicho filtro de eliminación de virus y se recuperan para su posterior procesamiento.

De manera ventajosa, el proceso de acuerdo con la invención es adecuado para la producción a escala industrial de una gran cantidad de un pHPL tratado con calor (HT_pHPL) normalizado. De hecho, mediante el uso de un lisado de plaquetas humanas combinadas como material de partida, en particular un pHPL de proveedores industriales, el proceso permite producir un HT_pHPL que proporciona un nivel elevado de normalización y consistencia, y también cumple con los principios de PCF. De este modo, el HT_pHPL obtenido puede normalizarse, lo que resulta particularmente ventajoso cuando se pretende utilizar el HT_pHPL en bioterapia, en particular a través de la administración al cerebro.

- 40 Sorprendente e inesperadamente, el proceso de acuerdo con la invención conduce a un pHPL tratado con calor que proporciona una neuroprotección mejorada en comparación con el pHPL no tratado con calor. Los ensayos *in vitro* han demostrado que el pHPL preparado de acuerdo con la invención protege las células dopamínergicas de la muerte inducida por neurotoxinas y sin inducir alteración morfológica. Sin querer quedar ligados a ninguna teoría, los inventores creen que la actividad neuroprotectora mejorada del HT_pHPL de la invención es el resultado de su contenido reducido de proteína total, tal como el contenido de fibrinógeno. De hecho, se cree que el tratamiento térmico a una temperatura de 50 °C a 70 °C induce la precipitación de proteínas que conducen, después de la etapa c) en la que se cree que se eliminan las proteínas precipitadas, a un contenido total de proteínas en el HT_pHPL de acuerdo con la invención significativamente inferior al del pHPL de partida.

50 En particular, también se cree que el tratamiento térmico da como resultado una reducción significativa o agotamiento del fibrinógeno y de las enzimas proteolíticas, tales como trombina, o similares a la trombina, o factores de coagulación generadores de trombina en el pHPL, y que la etapa de tratamiento térmico precipita y/o inactiva proteínas potencialmente tóxicas inestables al calor y modifica favorablemente el equilibrio de proteínas y factores de crecimiento en el pHPL. Por lo tanto, el pHPL tratado con calor, al contrario del pHPL, puede evitar el riesgo biológico de formación de fibrina, que es tóxica para el cerebro. Por tanto, el pHPL tratado con calor obtenido de acuerdo con la invención ofrece un margen de seguridad sustancialmente mayor que los lisados de plaquetas humanas convencionales suspendidos en plasma. Por lo tanto, el pHPL tratado con calor de la invención es más adecuado y más eficaz para su uso en bioterapia, en especial a través de la administración al cerebro.

- 60 Como se ha expuesto anteriormente, el lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor (HT_pHPL) de la invención proporciona una actividad neuroprotectora y de neurorrestauración mejorada.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor (HT_pHPL) que tiene un contenido de fibrinógeno inferior al 3 %, inferior al 2, inferior al 1 % y más preferentemente inferior al 0,1 % en peso del contenido de fibrinógeno del pHPL no tratado con calor. La concentración de fibrinógeno

del pHPL tratado con calor es inferior a 50 ng/ml, inferior a 40 ng/ml, inferior a 30 ng/ml, inferior a 20 ng/ml y más preferentemente inferior a 15 ng/ml. Como se muestra en la sección de ejemplos, el lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor de acuerdo con la invención es neuroprotector.

5 En particular, el pHPL tratado con calor no contiene fibrinógeno. Por la expresión "no contiene fibrinógeno" se entiende que la concentración de fibrinógeno en el HT_pHPL no supera los 15 ng/ml, en particular no excede 10 ng/ml y de manera más particular, no supera los 5 ng/ml. El pHPL tratado con calor de acuerdo con la invención se puede obtener mediante el proceso descrito anteriormente en presente documento.

10 En un tercer aspecto, la invención se refiere al lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor de acuerdo con la invención para su uso en terapia o "bioterapia".

De hecho, gracias a su actividad neuroprotectora mejorada y su mayor seguridad, el lisado de plaquetas humanas combinadas puede utilizarse en el tratamiento y/o la prevención de un trastorno neurológico y, preferentemente, de un trastorno neurodegenerativo. Por lo tanto, los lisados de plaquetas humanas combinadas tratados con calor muestran una fuerte actividad neuroprotectora y son particularmente ventajosos para tratar trastornos en donde se observa una pérdida de neuronas.

20 En otros términos, la divulgación también se refiere a un método para tratar y/o prevenir trastornos neurológicos, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del pHPL tratado con calor de la divulgación, a un paciente que lo necesita. Preferentemente el paciente es un animal de sangre caliente, más preferentemente un ser humano.

25 Los trastornos neurológicos en el significado de la presente invención incluyen, pero sin limitación, trastornos neurodegenerativos, trastornos neurovasculares, trastornos neuroinflamatorios, trastornos del neurodesarrollo, tales como el autismo, lesión cerebral, tal como hipoxia grave después del parto o paro cardíaco o traumatismo craneal grave/traumatismo craneoencefálico, es decir, lesiones graves que producen una pérdida significativa de neuronas que conduce a una discapacidad.

30 Los trastornos neurodegenerativos incluidos en el significado de la presente invención incluyen, pero sin limitación, esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Huntington (EH), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), ictus, degeneración macular relacionada con la edad (DME), enfermedades degenerativas de la retina y demencia, incluyendo esta última, aunque no de forma limitativa, enfermedad de Alzheimer (EA), demencia vascular, demencia frontotemporal, demencia semántica y demencia con cuerpos de Lewy. Las enfermedades neurodegenerativas preferidas son esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica.

40 En una realización preferente, el trastorno neurodegenerativo se selecciona de la enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad de Alzheimer. En una realización particularmente preferida, el trastorno neurodegenerativo es la enfermedad de Parkinson. En otra realización preferida, el trastorno neurodegenerativo es la esclerosis lateral amiotrófica.

45 Otros trastornos neurológicos preferidos incluyen lesiones del sistema nervioso central tales como hipoxia grave después del parto o paro cardíaco o traumatismo craneal grave, es decir, lesiones graves que producen una pérdida significativa de neuronas que conduce a una discapacidad. El tratamiento temprano, con el pHPL tratado con calor, después de la lesión podría mejorar las capacidades de neorrestauración fisiológica y neurogénesis.

50 El pHPL tratado con calor puede administrarse como tal, estar encapsulado en nanopartículas naturales o sintéticas¹¹ o micropartículas o estar comprendido en una solución farmacéutica que comprende además al menos un vehículo, diluyente, excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La solución farmacéutica puede comprender además complejos, moléculas, péptidos, sales, vectores o cualquier otro compuesto, que puede mejorar o puede ser beneficioso en el tratamiento de trastornos neurológicos.

55 La vía de administración y la pauta posológica dependen naturalmente de la intensidad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del paciente, etc.

El pHPL tratado con calor de la invención se puede utilizar para el tratamiento de cualquier paciente, en especial de un animal de sangre caliente tal como un mamífero y preferentemente un ser humano.

60 De manera ventajosa, el pHPL tratado con calor de acuerdo con la divulgación es adecuado para la administración al cerebro. En concreto, dicho pHPL tratado con calor está adaptado para administración intratecal (por ejemplo, para la esclerosis lateral amiotrófica que es una patología de la médula espinal) o intracerebroventricular (i.c.v.), por ejemplo en el ventrículo lateral derecho, preferentemente cerca del agujero intraventricular de modo que el pHPL tratado con calor se pueda administrar en el tercer ventrículo. La administración al cerebro se puede lograr mediante los métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, la administración al cerebro puede llevarse a cabo con un sistema de administración de fármacos, tal como una bomba de medicación programable.

La administración del pHPL tratado con calor de la divulgación también se puede realizar mediante cualquier otro método conocido por el experto en la materia, tal como, por ejemplo, administración intranasal, intramuscular o intraocular, o perfusión o infusión de un órgano (es decir, infusión directa de una parte del tejido cerebral).

5 Las dosis de exposición utilizadas para la administración pueden adaptarse en función de diversos parámetros y, en particular, en función del modo de administración utilizado, de la patología pertinente o de la duración deseada del tratamiento.

10 Definiciones

Las siguientes definiciones y explicaciones son para los términos utilizados a lo largo de toda la solicitud, incluidas tanto la memoria descriptiva como las reivindicaciones.

15 Por "actividad neuroprotectora" o "neuroprotección" se entiende la conservación de la estructura neuronal y/o la función de las células neuronales afectadas por la neurotoxina en comparación con las células neuronales que no se ven afectados por la neurotoxina. La neuroprotección tiene como objetivo prevenir o ralentizar la progresión de la enfermedad y las lesiones secundarias mediante la detención o al menos ralentización de la pérdida de neuronas. Por ejemplo, se refiere a la conservación del número de neuronas en el cuerpo estriado y/o en la sustancia negra pars compacta de pacientes que padecen la enfermedad de Parkinson en comparación con pacientes que no padecen la enfermedad de Parkinson.

20 Por "neurorrestauración" se entiende la compensación de alteraciones existentes y la estimulación de la restauración estructural y funcional de la actividad nerviosa lesionada.

25 El término "paciente" se refiere a un animal de sangre caliente, más preferentemente un ser humano, quien/el cual está esperando o recibiendo cuidados médicos, o es o será objeto de un procedimiento médico.

30 La expresión "ser humano" se refiere a sujetos de ambos géneros y en cualquier estado de desarrollo (es decir neonato, lactante, juvenil, adolescente y adulto). En una realización, el ser humano es un adolescente o un adulto, preferentemente un adulto.

35 Los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento", como se utilizan en el presente documento, pretenden incluir aliviar o suprimir una afección o enfermedad y/o sus síntomas asociados.

40 Los términos "prevenir", "que previene" y "prevención", como se utilizan en el presente documento, se refieren a un método para retrasar o impedir la aparición de una afección o enfermedad y/o sus síntomas asociados, evitando que un paciente adquiera una afección o enfermedad, o reduciendo el riesgo de que un paciente adquiera una afección o enfermedad.

45 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" (o más simple "cantidad eficaz"), como se utiliza en el presente documento, significa la cantidad del pHPL tratado con calor de la invención que es suficiente para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado en el individuo al que se le administra.

50 El término "administración", o una variante del mismo (por ejemplo, "administrar"), significa proporcionar el pHPL tratado con calor de la invención, solo o como parte de una solución farmacéuticamente aceptable, a un paciente en el que la afección, el síntoma o el trastorno se ha de tratar o prevenir.

55 La presente invención se comprenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos y figuras. Estos ejemplos pretenden ser representativos de realizaciones específicas de la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Descripción de las figuras

55 **Figura 1: Observación morfológica de células Luhmes tratadas.** Imágenes representativas de células Luhmes ($\times 10$) después del tratamiento con pHPL, HT_pHPL y HT_pHPL-GB sin exposición a erastina (columna izquierda) o con exposición a erastina (columna derecha).

60 pHPL: lisado de plaquetas humanas combinadas.
 HT_pHPL: lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor.
 HT_pHPL-GB: lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor después del tratamiento con perlas de vidrio y CaCl_2 .

65 **Figura 2: Ensayo de citometría de flujo.** Viabilidad medida mediante ensayo con yoduro de propidio y normalizada con respecto al control (células no tratadas) +/- error estándar de la media (EEM) ($n = 4$).

Figura 3: Ensayo con resazurina. Viabilidad medida mediante ensayo con resazurina y normalizada con respecto al control (células no tratadas) +/- EEM (n = 3).

Figura 4: Evolución del peso corporal de ratones hembras y machos tratados con riluzol. Machos TS: Machos de tipo silvestre, Machos Tg: machos FVB-Tg(Sod1*G86R), Hembras TS: Hembras de tipo silvestre, Hembras Tg: hembras FVB-Tg(Sod1*G86R).

Figura 5: Evolución del peso corporal de ratones macho tratados con vehículo y HT_pHPL. Veh: Vehículo, Machos TS: Machos de tipo silvestre, Machos Tg: machos FVB-Tg(Sod1*G86R), HT_pHPL: lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor.

Figura 6: Curva de supervivencia de ratones macho tratados con vehículo, riluzol y HT_pHPL. Veh: Vehículo, Machos Tg: machos FVB-Tg(Sod1*G86R), HT_pHPL: lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor.

15 Descripción detallada de la invención

Materiales y métodos

1. Preparación del lisado de plaquetas

pHPL: El lisado de plaquetas humanas combinadas se obtuvo de Macopharma (Tourcoing, Francia) con el nombre de lisado de plaquetas humanas MultiPL'30®, referencia BC0190020.

HT_pHPL: pHPL sometido a tratamiento térmico a 56 °C durante 30 min y purificado mediante centrifugación (15 minutos, 10000g; 4 °C).

HT_pHPL-GB: Se mezcló pHPL con 0,5 g/l de perlas de vidrio (BEAD-002-1 kg de 2 mm de diámetro, de Labbox) y CaCl₂ (30 µg/ml y concentración final de 23 mM; Cloruro de calcio anhidro en polvo C4901, de Sigma-Aldrich) con agitación durante 1 h.

En 30 minutos se produjo la formación de un coágulo que se eliminó después de la centrifugación (6000g, 30 minutos, 22 °C). El sobrenadante se calentó a 56 °C durante 30 minutos y se centrifugó antes de formar alícuotas y almacenarlas a -80 °C para su uso posterior.

35 2. Mantenimiento y diferenciación de las células LUHMES

Las células LUHMES se obtuvieron del laboratorio del Dr. Scholz (Universidad de Konstanz, Alemania) y se cultivaron como se describe¹².

En resumen, se propagaron células LUHMES indiferenciadas utilizando matraces de cultivo celular de plástico Nunclon™ (Nunc, Roskilde, Dinamarca) y placas de múltiples pocillos que fueron recubiertas previamente con 50 µg/ml de poli-L-ornitina y 1 µg/ml de fibronectina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) en agua destilada durante 3 h a 37 °C. Después de retirar la solución de recubrimiento, los matraces de cultivo se lavaron con agua destilada estéril y se secaron al aire.

Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con el 95 % de aire y el 5 % de CO₂. El medio de proliferación fue el medio Eagle de Dulbecco Advanced (Advanced DMEM)/F12 que contenía 1 × complemento de N-2 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), L-glutamina 2 mM (Gibco, Rockville, MD, EE. UU.) y bFGF recombinante 40 ng/ml (R&D Systems). Cuando se alcanzó aproximadamente un 80 % de confluencia, las células se disociaron con una solución de tripsina al 0,025 % (Gibco, Rockville, MD, EE. UU.) y se pasaron a 3 × 10⁶ células/matrás.

Para inducir la diferenciación en células neuronales, se sembraron 2 × 10⁶ LUHMES y se cultivaron en un matraz T75 en medio de proliferación durante 48 h, después en Advanced DMEM/F12 que contenía 1× complemento de N-2, L-glutamina 2 mM (Gibco), AMPc de dibutirilo 1 mM (Sigma-Aldrich), tetraciclina 1 µg/ml (Sigma-Aldrich) y GDNF humano recombinante 2 ng/ml (R&D Systems). Después de dos días de cultivo en condiciones de diferenciación, se cultivaron LUHMES en placas de 24 pocillos para experimentos adicionales el día seis.

60 3. Evaluación de la toxicidad y capacidad protectora en neuronas dopaminérgicas de los diferentes lisados plaquetarios (PL, del inglés platelet lysates).

La toxicidad y la capacidad protectora de los tres lisados plaquetarios (pHPL, HT_pHPL, HT_pHPL-GB) se evaluaron en la estirpe celular dopaminérgica denominada Luhmes (después de 6 días de diferenciación).

En los estudios de neuroprotección, los diferentes PL se analizaron respecto a la muerte celular inducida por erastina (es decir, un inductor muy potente de la muerte celular en las neuronas dopaminérgicas).

Las LUHMES se diferenciaron durante 6 días y los diferentes PL se añadieron (al 5 % v/v) al medio 1 h antes del tratamiento con erastina.

5 En cada estudio, se evaluó la viabilidad mediante citometría de flujo (yoduro de propidio) en 24 pocillos o mediante ensayo con resazurina en placa de 96 pocillos a los 7 días de diferenciación (24 h después del tratamiento con PL).

- Ensayo de citometría de flujo

10 Se realizan experimentos para cuantificar la toxicidad y la capacidad neuroprotectora de los diferentes PL mediante la incorporación de yoduro de propidio. Se cultivaron LUHMES en placas de 24 pocillos.

El citómetro de flujo utilizado para los experimentos es el modelo CyAn™ con láser de 488 nm (Beckman Coulter).

- Ensayo con resazurina

15 Para confirmar los resultados obtenidos mediante el ensayo de citometría de flujo, también se midió la viabilidad de LUHMES mediante una prueba colorimétrica, el ensayo con resazurina (realizado en placa de 96 pocillos). Esto se realiza directamente en el cultivo celular, sin trisnización (y recogida de las células), lo cual parecía interesante a la luz de los experimentos realizados con el citómetro de flujo.

20 **4. Medición del pH**

Para medir el pH en los diferentes lisados de plaquetas, se utilizaron tiras reactivas de pH de Macherey-Nagel (pH Fix 6.0-10.0, referencia 921 22).

25 **5. Dosis de fibrinógeno**

La concentración de fibrinógeno se midió en diferentes concentrados de plaquetas (pHPL, HT_pHPL y HT_pHPL-GB) mediante un ELISA (R&D Systems). Por cada concentrado de plaquetas, las mediciones se realizaron por duplicado.

30 Las concentraciones se expresan en ng/ml.

6. Análisis estadístico

35 Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de la media (EEM). Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA unidireccional después de verificar la distribución normal de los datos. Se realizaron pruebas no paramétricas de Wilcoxon y Kruskal-Wallis en caso de distribución no normal. Se consideró estadísticamente significativo un valor *p* de <0,05.

Resultados

40 **Observación morfológica de células LUHMES tratadas**

Como se muestra en la figura 1, sin exposición a erastina, se observó en el control la forma típica de las células Luhmes a los 7 días de diferenciación. Se observaron cambios importantes en la morfología celular en presencia de pHPL, HT_pHPL, con propensión a "agrupar" las células. Este aspecto no se observó cuando se utilizó HT_pHPL-GB.

45 Con exposición a erastina, sólo se observa la forma típica de las células moribundas sin ningún tratamiento con los lisados de plaquetas. Esto parecía indicar que HT_pHPL y HT_pHPL-GB eran capaces de proporcionar neuroprotección. Las células agrupadas todavía aparecían en presencia de pHPL, pero no se observaron cuando las células se trataron con lisados de plaquetas sometidos a GB y tratamientos térmicos. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, los inventores creen que esto confirma un posible papel negativo de la presencia de fibrinógeno en el pHPL en la formación de estas agrupaciones.

55 Ensayo de citometría de flujo

55 La adición de pHPL indujo una aparente gelación del medio. Esto no se observó con otras preparaciones de lisados. Por otra parte, el análisis mediante ensayo de citometría de flujo requiere la obtención de células separadas (mediante trisnización). Esta etapa fue muy difícil de lograr cuando las células se trataron con pHPL. Sin embargo, los estudios de viabilidad fueron posibles con todos los tratamientos (Figura 2).

60 Ninguna preparación de lisado tuvo un efecto tóxico. Sólo el pHPL solo disminuyó ligeramente la viabilidad (\approx 85 %) en comparación con el control y las demás preparaciones. Pero esto puede deberse a la dificultad para separar las células.

65 La erastina destruyó de manera eficaz las células de control, pero no se observó muerte celular cuando las células LUHMES se trataron con HT_pHPL y HT_pHPL-GB. Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que el lisado de plaquetas

humanas combinadas de acuerdo con la invención muestra una fuerte capacidad protectora en las células LUHMES.

Ensayo con resazurina

- 5 En primer lugar, los valores de viabilidad celular presentados sin exposición a erastina confirmaron que el lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor de acuerdo con la invención parecía inofensivo para las células LUHMES.
- 10 Los resultados con el pHPL posiblemente se debieron a un artefacto en el experimento. De hecho, la gelación del medio (probablemente debido al fibrinógeno presente en el pHPL) pareció inhibir la mezcla de resazurina con el medio, lo que impidió que la resazurina penetrara en las células y provocara así una falta de detección (la pérdida de viabilidad de aproximadamente un 15 % no correspondía con la observación microscópica que mostraba que casi todas las células en estos pocillos presentaban las morfologías esperadas de células vivas).
- 15 La erastina destruyó de manera eficaz las células LUHMES con las dos dosis probadas y el lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor pudo prevenir su efecto tóxico (una vez más se observa el problema de la absorción de resazurina por las células debido al tratamiento con pHPL).

Contenido de fibrinógeno

- 20 Los resultados de la concentración de fibrinógeno para cada concentrado de plaquetas se presentan en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1

	Concentración (ng/ml)
pHPL	503810
HT_pHPL	14
HT_pHPL-GB	11

- 25 Los resultados muestran que la etapa de tratamiento térmico de acuerdo con la invención conduce a una reducción drástica de la concentración de fibrinógeno en el pHPL. De hecho, se eliminó más del 99,9 % del fibrinógeno. Al menos, la combinación de los dos tratamientos es capaz de reducir la concentración de fibrinógeno en el pHPL más que la etapa de tratamiento térmico por sí sola.

- 30 Por lo tanto, mediante la etapa de tratamiento térmico, el lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor obtenido, al contrario del pHPL, puede considerarse sin fibrinógeno. Dado que el lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor está destinado a utilizarse para la administración al cerebro, esta característica es particularmente ventajosa porque el líquido cefalorraquídeo contiene menos de 1 mg/ml de proteínas. Por lo tanto, cuanto menor sea la concentración de fibrinógeno en el pHPL, mejor será la prevención de la sobrecarga de proteínas.
- 35

pH del medio

- 40 Las tiras dieron los siguientes resultados:

- pH entre 7 y 7,3 para pHPL,
- pH 7 para HT_pHPL y
- pH 6 para HT_pHPL-GB.

- 45 La disminución del pH en HT_pHPL-GB podría deberse al CaCl₂ utilizado en el protocolo.

- 50 Sin embargo, no se observó ninguna modificación del pH del medio después del tratamiento con los lisados de plaquetas (mostrado por el indicador rojo de fenol).

Toxicidad y capacidad protectora en neuronas dopamínergicas

- 55 En primer lugar, estos resultados muestran que los lisados de plaquetas humanas combinadas tratados con calor (HT_pHPL y HT_pHPL-GB) no inducen toxicidad en las células LUHMES.

- Por otra parte, cuando las células se tratan con erastina, HT_pHPL y HT_pHPL-GB de acuerdo con la invención protegen las células de la muerte por ferroptosis. Este resultado se validó con dos ensayos diferentes.

- 60 En conjunto, estos resultados muestran que HT_pHPL y HT_pHPL-GB son muy buenas preparaciones que protegen a las células dopamínergicas de la muerte inducida por una potente neurotoxina y sin inducir modificaciones morfológicas. Por otra parte, el pHPL tratado con calor está destinado a utilizarse en bioterapia, en especial a través de la administración al cerebro. Por lo tanto, el hecho de que el pHPL tratado con calor no contenga fibrinógeno ni

enzimas proteolíticas, demuestra el potencial del pHPL tratado con calor para este propósito.

EJEMPLO 2: experimento *in vivo*

5 Se realiza este experimento *in vivo* para demostrar el efecto neuroprotector del lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor de acuerdo con la invención. El efecto se compara con el efecto obtenido con el fármaco riluzol, es decir, el único tratamiento eficaz conocido para la ELA.

10 Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con los "Principios del cuidado de animales de laboratorio" (publicación NIH 86-23, revisado en 1985) y el actual marco legislativo y reglamentario francés y de la Unión Europea sobre experimentación con animales (Directiva 86/609 del Consejo de las Comunidades Europeas).

15 Los ratones utilizados fueron ratones FVB-Tg(Sod1^{tg}G86R)M1Jwg/J de los laboratorios JAX. Los animales se alojaron en grupos (10 por jaula) en una habitación con la temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas. La comida y el agua se suministraron a discreción. Después de la recepción, los animales tuvieron un período de habituación de 7 días sin manipulación. La reproducción se realizó (desde mayo de 2013) en las instalaciones de SOPF y el genotipado se realiza mediante qPCR (a partir de una biopsia de la cola). Los animales se identifican con pendientes.

20 **Materiales y métodos**

Inyección i.c.v. intermitente y administración de riluzol

25 Los ratones se manipularon y pesaron a la edad de 60 días. La implantación de cánulas intracerebroventriculares (i.c.v.) mediante estereotaxia comienza en esta fecha y los ratones se aclimatan durante 1 semana.

30 El fármaco riluzol se mezcló en una dieta definida y se formuló en gránulos. El riluzol se administró por vía oral. (Gurney *et al.*, Neurology, 1998). Luego se evaluaron, dos veces por semana (es decir, peso corporal y puntuación neurológica), desde los 67 días de edad hasta su muerte.

35 **Tratamiento en machos SOD1m-FVB y TS-FVB:**

Se realizan dos tratamientos diferentes desde los 75 días hasta la muerte:

- 40 - HT_pHPL preparado como se describe en el ejemplo 1 y a 1 g/l, pH 7,4 frente a vehículo. La dosis de HT_pHPL administrada i.c.v. de manera intermitente fue de 4 µl, tres veces por semana a una velocidad de 0,5 µl/min. Tiempo de inyección: 8 min.
- Se administró el fármaco riluzol por vía oral a 44 mg/kg/día.

45 **Grupos experimentales:**

Machos TS-FVB + vehículo	Hembras TS-FVB + Riluzol
Machos TS-FVB + HT_pHPL	Hembras SOD1m-FVB + Riluzol
Machos TS-FVB + Riluzol	
Machos SOD1m-FVB + vehículo	
Machos SOD1m-FVB +	
HT_pHPL	
Machos SOD1m-FVB + Riluzol	

50 **Resultados**

45 **1. Riluzol y peso corporal**

Como se muestra en la figura 4, la ingesta restringida de alimentos no tiene ningún efecto en la evolución del peso corporal en ratones TS. En ratones Tg, se puede observar una disminución del peso corporal el día 88 para machos y para hembras.

55 **2. HT_pHPL y peso corporal**

Como se muestra en la figura 5, el tratamiento con HT_pHPL no tuvo efecto en los machos TS. Se observa una disminución del peso corporal el día 88 en ratones Tg tratados con HT_pHPL, dicho tratamiento también induce un retraso importante en el peso corporal *pre-mortem* en los machos a partir del día 124.

50 **3. Curva de supervivencia**

Como se muestra en la figura 6, el fármaco riluzol tiene un efecto en el inicio de la muerte en machos Tg (desde el día 91 al día 102), pero no tiene ningún efecto en la duración de la supervivencia.

- 5 De acuerdo con el retraso en el peso corporal *pre-mortem*, el tratamiento con HT_pHPL retrasó el inicio de la muerte a 14 días (del día 91 al día 105) y extendió la duración de la supervivencia hasta 48 días para los machos Tg (del día 123 al día 171).
- 10 En conclusión, los experimentos *in vivo* demuestran que el lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor de acuerdo con la invención presenta un efecto neuroprotector. Estos resultados obtenidos en la esclerosis lateral amiotrófica se pueden aplicar a otros trastornos en donde también se observa una pérdida de neuronas.

BIBLIOGRAFÍA

- 15 1. Huang E. J., Reichardt L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 2001;24: 677-736.
- 20 2. Mohapel P., Frielingdorf H., Hagglad J., et al. Platelet-derived growth factor (PDGF-BB) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induce striatal neurogenesis in adult rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Neuroscience* 2005;132: 767-76.
- 25 3. Gonzalez-Aparicio R., Flores J. A., Fernandez-Espejo E. Antiparkinsonian trophic action of glial cell line-derived neurotrophic factor and transforming growth factor beta 1 is enhanced after co-infusion in rats. *Experimental Neurology* 2010;226: 136-47.
- 30 4. Kirik D., Georgievska B., Bjorklund A. Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease. *Nat Neurosci* 2004;7: 105-10.
- 35 5. Golebiewska E. M., Poole A. W. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev* 2014.
- 40 6. Burnouf T., Goubran H. A., Chen T. M., et al. Blood-derived biomaterials and, platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood Rev* 2013;27: 77-89.
- 45 7. Burnouf T., Strunk D., Koh M., et al. Human platelet lysate: replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials* 2016;76: 371-87.
- 50 8. Hayon Y., Dashevsky O., Shai E., et al. Platelet lysates stimulate angiogenesis, neurogenesis and neuroprotection after stroke. *Thromb Haemost* 2013;110: 323-30.
9. J. K. Ryu, D. Davalos y K. Akassoglou. Fibrinogen signal transduction in the nervous system. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2009; Vol. 7, suplemento temático s1, 151-154.
10. Tsu-Bi Shih D., Burnouf T. Preparation, quality criteria, and properties of human blood platelet lysate supplements for *ex vivo* stem cell expansion. *New Biotechnology* 2015; vol. 32, número 1.
11. Victor E. Santo, Manuela E. Gomes, Joao F. Mano y Rui L.; Reis. Chitosan-chondroitin sulphate nanoparticles for controlled delivery of platelet lysates in bone regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Diciembre de 2012, vol. 6, número S3, páginas s47-s59.
12. Scholz D., Poltl D., Genewsky A., et al. Rapid, complete and large-scale generation of post-mitotic neurons from the human LUHMES cell line. *J Neurochem* 2011;119: 957-71.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para preparar un lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor, comprendiendo dicho proceso las etapas de:
- 5 a) Proporcionar un lisado de plaquetas humanas combinadas (pHPL),
 b) Tratar con calor el lisado de plaquetas humanas combinadas a una temperatura de 50 °C a 70 °C durante 20 a 40 minutos,
 c) Purificar el lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor de la etapa b).
- 10 2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la purificación de la etapa c) se lleva a cabo mediante centrifugación o filtración.
- 15 3. El proceso de la reivindicación 1 o 2, que comprende además después de la etapa b), una etapa de inactivación vírica o eliminación de virus.
- 20 4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la etapa de inactivación vírica o eliminación de virus se realiza mediante tratamiento con disolvente y detergente (tratamiento D/D), tratamiento con detergente únicamente, pasteurización, tratamiento con vapor, tratamiento de pH bajo, tratamiento con ácido caprílico y nanofiltración
- 25 5. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, que además comprende antes de la etapa b) de tratamiento térmico, una etapa del tratamiento que induce una activación de la cascada de coagulación.
- 30 6. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en donde el lisado de plaquetas humanas combinadas se obtiene a partir de al menos dos lisados de plaquetas diferentes recogidas de donantes diferentes.
- 35 7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el lisado de plaquetas humanas combinadas se obtiene de al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 100, al menos 140, al menos 180, al menos 200 o de al menos 240 lisados de plaquetas diferentes recogidas de donantes diferentes.
- 40 8. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, en donde el lisado de plaquetas humanas combinadas (pHPL) proporcionado en la etapa a) se prepara mediante el método que comprende las siguientes etapas de:
- 35 i) proporcionar concentrados de plaquetas,
 ii) lisar por separado los concentrados de plaquetas de la etapa i) y
 iii) mezclar los lisados resultantes de la etapa ii) para obtener un lisado de plaquetas humanas combinadas.
- 45 9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el concentrado de plaquetas proporcionado en la etapa i) se somete a un tratamiento de leucocitopenia y/o a un tratamiento de inactivación vírica/de patógenos.
- 50 10. Un lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor que tiene un contenido de fibrinógeno inferior al 3 % y preferentemente inferior al 1 % en peso del contenido de fibrinógeno del pHPL no tratado con calor y que tiene un contenido de fibrinógeno inferior a 50 ng/ml, preferentemente inferior a 30 ng/ml y más preferentemente inferior a 15 ng/ml.
- 55 11. Un lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor de acuerdo con la reivindicación 10, o preparado de acuerdo con el proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en terapia.
- 50 12. El lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 en el tratamiento de trastornos neurológicos.
- 55 13. El lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde los trastornos neurológicos se seleccionan de trastornos neurodegenerativos, trastornos neuroinflamatorios, trastornos del neurodesarrollo, trastornos neurovasculares y lesiones cerebrales.
- 60 14. El lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde los trastornos neurológicos son trastornos neurodegenerativos seleccionados de esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Huntington (EH), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), ictus, degeneración macular relacionada con la edad (DME), enfermedad de Alzheimer (EA), demencia vascular, demencia frontotemporal, demencia semántica y demencia con cuerpos de Lewy.
- 65 15. El lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde los trastornos neurodegenerativos se seleccionan de la enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, degeneración macular relacionada con la edad y enfermedad de Alzheimer.
- 65 16. El lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en

donde el trastorno neurológico es una lesión cerebral seleccionada de hipoxia o traumatismo craneoencefálico.

5 17. El lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, en donde el pHPL se administra por vía intratecal, intraocular, intranasal o intracerebroventricular.

10 18. El lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el pHPL se administra por vía intracerebroventricular, de manera más específica en el ventrículo lateral derecho, preferentemente cerca del agujero intraventricular y más preferentemente en el tercer ventrículo.

10 19. El lisado de plaquetas humanas combinadas tratado con calor para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, en donde dicho pHPL está adaptado para administrarse con una bomba de medicación programable.

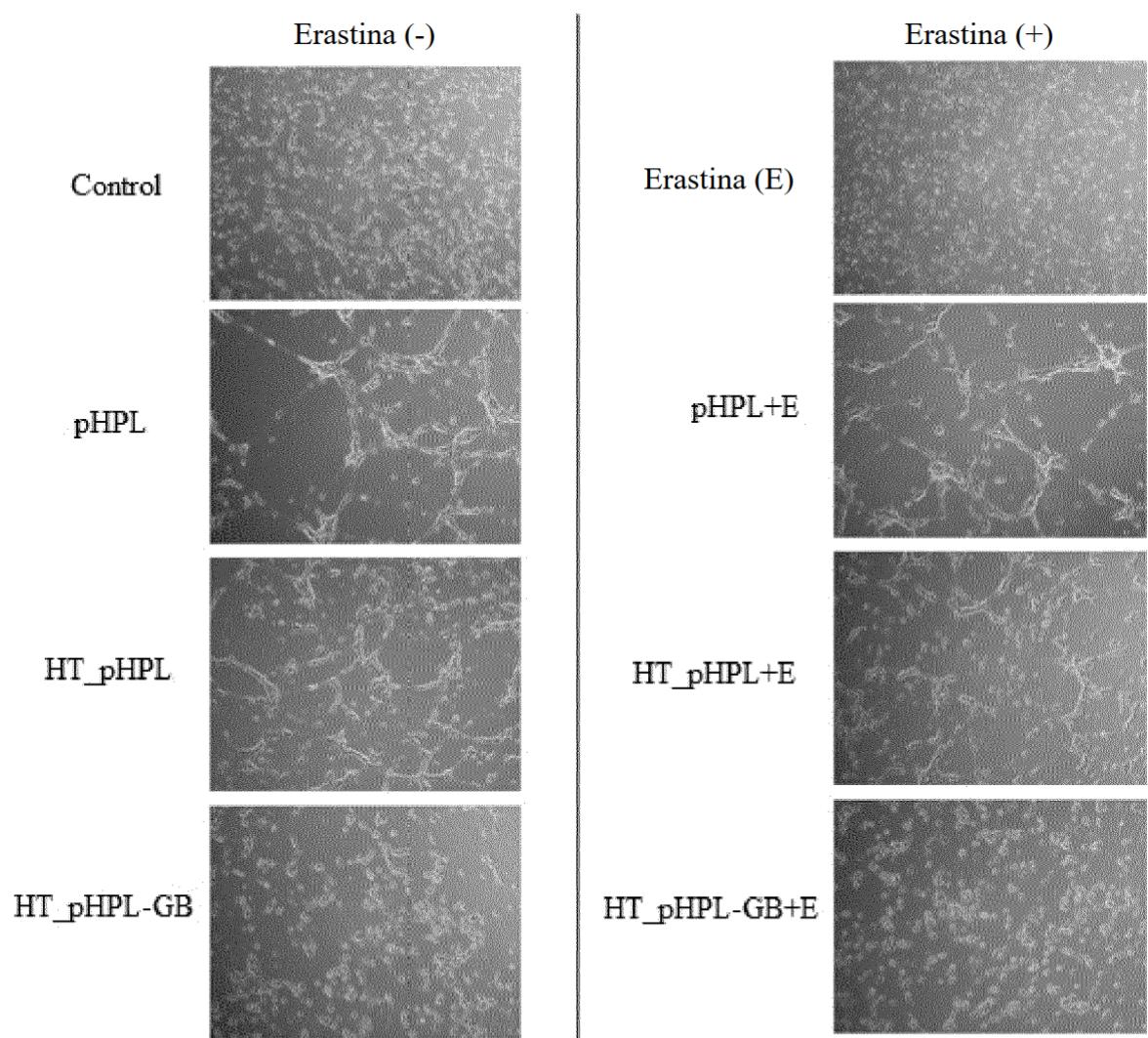


FIGURA 1

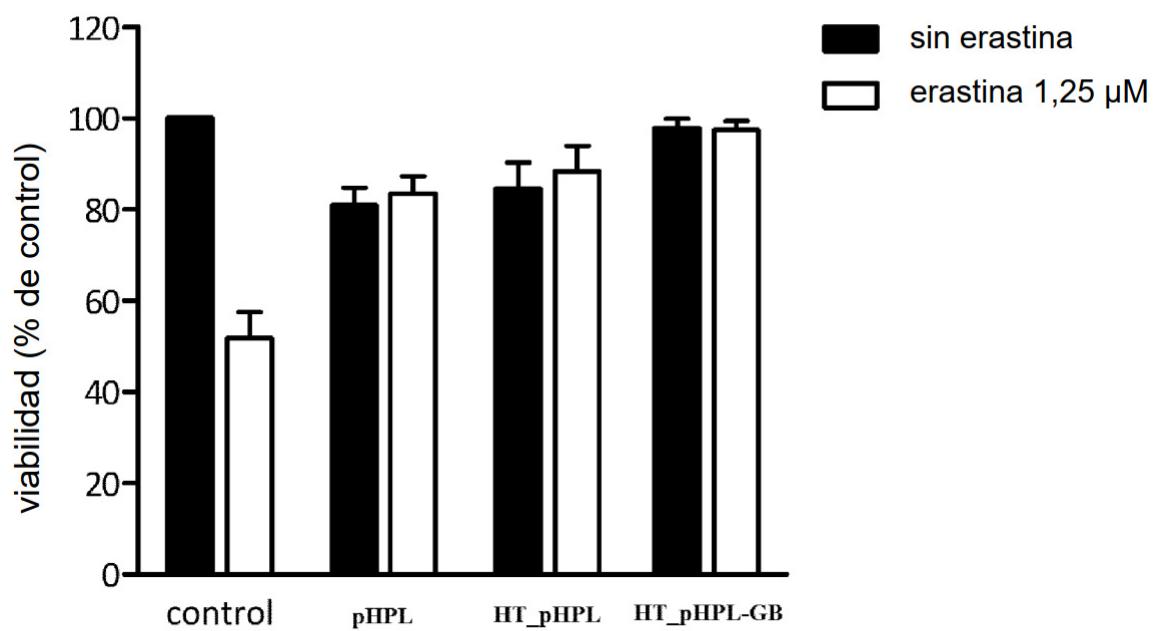


FIGURA 2

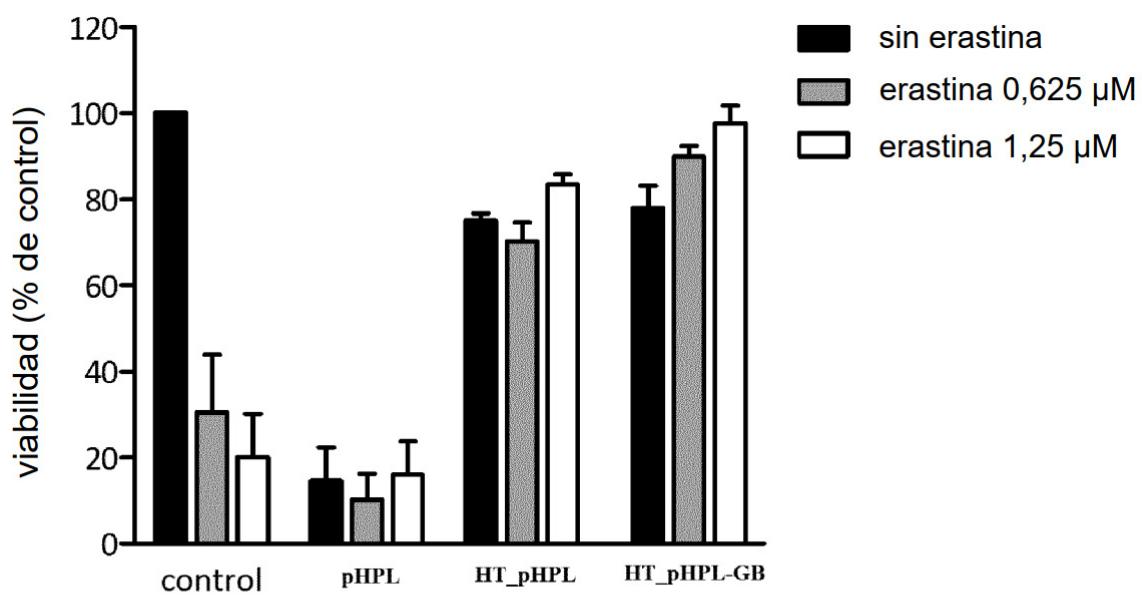


FIGURA 3

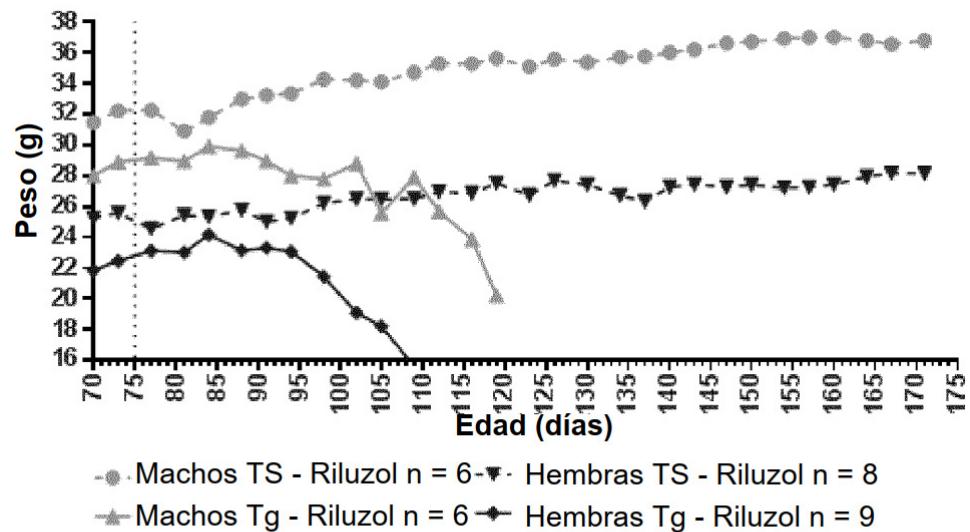


FIGURA 4

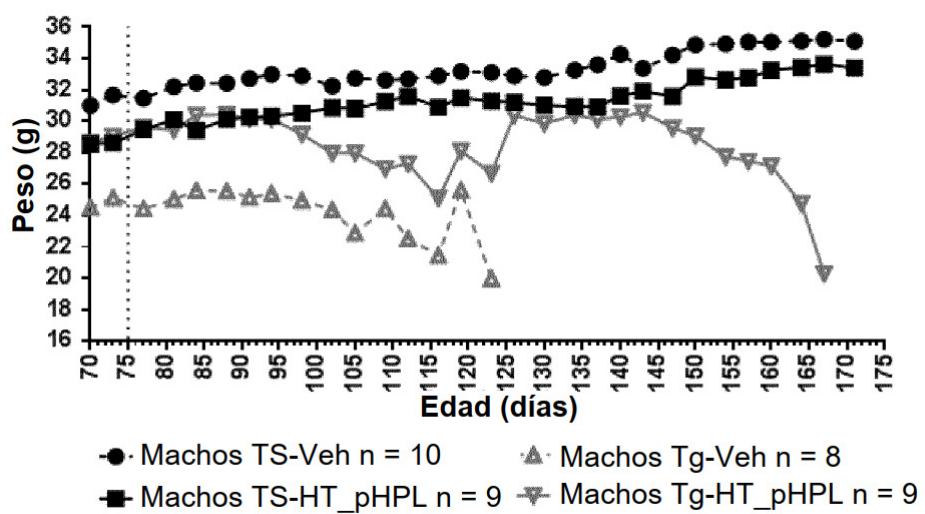


FIGURA 5

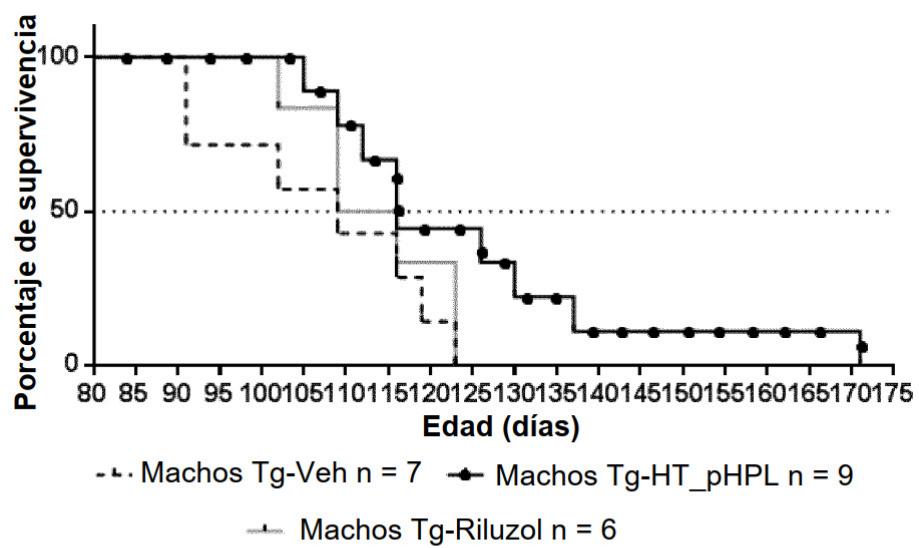


FIGURA 6