

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 836 131**

51 Int. Cl.:

C12N 5/078 (2010.01)

A61L 2/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2016 PCT/FR2016/051265**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016 WO16193591**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2016 E 16731231 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2020 EP 3303567**

54 Título: **Procedimiento de esterilización de un lisado de plaquetas**

30 Prioridad:

29.05.2015 FR 1554883

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

24.06.2021

73 Titular/es:

MACO PHARMA (100.0%)

Rue Lorthiois

59420 Mouvaux, FR

72 Inventor/es:

DELORME, BRUNO;

VIAU, SABRINA y

GOUDALIEZ, FRANCIS

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 836 131 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

Procedimiento de esterilización de un lisado de plaquetas

5 La invención se refiere a un procedimiento de esterilización de un lisado de plaquetas, así como a un lisado de plaquetas esterilizado obtenido mediante dicho procedimiento y a un procedimiento de cultivo de células utilizando dicho lisado de plaquetas esterilizado.

La invención se aplica al campo de los productos derivados de las plaquetas sanguíneas, y en particular al campo del cultivo celular para el cultivo de células para uso terapéutico, más particularmente células madre mesenquimales.

10 Para cultivar células animales in vitro, se utilizan convencionalmente medios básicos del tipo RPMI (Roswell Park Memorial Institute), MEM (Modified Eagle Medium) o DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium), que comprenden esencialmente sales minerales, glucosa, aminoácidos, vitaminas y bases nitrogenadas. En general, estos medios se complementan extemporáneamente con antibióticos para prevenir la contaminación bacteriana, L-glutamina, un aminoácido inestable, y entre un 1,5 y un 10% de suero de ternero fetal como complemento nutricional.

Sin embargo, el suero de ternero fetal es un portador potencial de patógenos xenógenos. En particular, cuando el suero es de origen bovino, el riesgo de contaminación por priones o virus no es cero.

15 Para remediar estos inconvenientes, se ha propuesto sustituir el suero por lisado plaquetario humano que presenta la ventaja de contener una gran cantidad de factores de crecimiento de origen humano como, por ejemplo, el factor de crecimiento transformante beta1 (TGF-beta1, Transforming Growth Factor-beta1), factor de crecimiento epidérmico (EGF, Epidermal Growth Factor), factor de crecimiento derivado de plaquetas AB (PDGF-AB, Platelet-Derived Growth Factor-AB), factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1, Insulin-like Growth Factor-1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor) y factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2, Fibroblast Growth Factor 2), también llamado factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, Basic Fibroblast Growth Factor).

20

25 Por lo tanto, se ha demostrado una mejor tasa de proliferación de células madre mesenquimales cultivadas en un medio básico suplementado con lisado de plaquetas humanas en comparación con un medio de referencia que comprende el mismo medio básico suplementado con suero de ternero fetal (SVF) y suplementado con 1 ng/ml de FGF-2 (Azouna, N. Ben, et al. "Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum". Stem Cell Res Ther 3.1 (2012): 6).

30 Sin embargo, al ser el lisado de plaquetas de origen humano, también presenta un riesgo de contaminación patógena que debe tenerse en cuenta y limitarse al máximo. De hecho, los lisados de plaquetas pueden ser vectores potenciales de virus, bacterias o protozoos.

Por lo tanto, existe una necesidad real de desarrollar lisados de plaquetas más seguros para el cultivo celular.

35 El documento WO 2013/042095 y el artículo de S. Castiglia (Castiglia, Sara, et al. "Inactivated human platelet lysate with psoralen: a new perspective for mesenchymal stromal cell production in Good Manufacturing Practice conditions". Cytotherapy 16.6 (2014): 750-763) describen un lisado de plaquetas obtenido a partir de concentrados de plaquetas derivados de la capa leucocitaria que han sufrido inactivación viral por radiación ultravioleta en presencia de psoraleno. Sin embargo, esta técnica de inactivación viral presenta el inconveniente de tener que utilizar una molécula suplementaria que luego debe eliminarse del producto tratado.

40 El documento WO 2010/033605 propone pasar el lisado de plaquetas a través de un filtro de 0,45 µm o 0,22 µm. Sin embargo, estos filtros no permiten eliminar los pequeños virus eventualmente presentes.

El documento WO 2011/148326 propone preparar un lisado de plaquetas inactivado viralmente tratando un concentrado de plaquetas con disolvente/detergente. Sin embargo, el procedimiento cromatográfico utilizado para eliminar el disolvente/detergente del lisado así obtenido conduce a la eliminación en particular de los factores de crecimiento VEGF y PDGF.

45 Como variante descrita en el documento US 2012/0156306, el lisado de plaquetas tratado con disolvente/detergente luego se somete a un segundo procedimiento de inactivación viral elegido entre pasteurización, nanofiltración, tratamiento a pH bajo, irradiación con rayos ultravioleta o incluso tratamiento con tiocianato de sodio.

50 En el caso de las proteínas, el documento WO 01/70279 enseña que la irradiación por radiación gamma debe realizarse sobre proteínas sin disolvente residual, es decir en forma liofilizada y/o en presencia un estabilizador para no desnaturalizarlos.

Sin embargo, la liofilización es un procedimiento discontinuo que da como resultado múltiples manipulaciones y tiempos de tratamiento relativamente largos, lo que aumenta los costos asociados con el uso de dichos procedimientos. La adición de estabilizador también constituye una etapa y un compuesto adicionales en el procesamiento del producto del que sería ventajoso prescindir.

Además, incluso en forma liofilizada, algunos factores de crecimiento no son resistentes a la irradiación gamma. Por ejemplo, el documento WO 00/33893 muestra una pérdida de actividad de más del 90% del factor de crecimiento PDGF liofilizado esterilizado por irradiación gamma en comparación con el PDGF liofilizado no esterilizado.

5 Finalmente, el documento WO 2014/076200 describe suplementos de cultivo basados en fracciones de plasma ricas o pobres en plaquetas. Se afirma que dichos suplementos de cultivo se pueden congelar, liofilizar, esterilizar mediante irradiación gamma a una dosis de 1 kGy y almacenar a -20 °C. Esta dosis de irradiación relativamente baja no es suficiente para inactivar virus y bacterias.

10 Inesperada y contrariamente a la enseñanza de los documentos anteriores, se ha observado que un lisado plaquetario que ha sido sometido, en estado de congelación, a una alta dosis de irradiación por radiación gamma conserva una buena actividad biológica sin necesidad de liofilización o estabilizador.

15 Además, mientras que la adición de bFGF exógeno al lisado de plaquetas no irradiado no tiene ningún efecto sobre la tasa de proliferación celular (Pérez-Illarbe, Maitane, et al. "Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy". Transfusion 49.9 (2009): 1901-1910), el lisado de plaquetas irradiado en estado congelado por radiación gamma presenta la nueva propiedad de aumentar la tasa de proliferación celular en presencia de bFGF exógeno.

Por tanto, la invención propone un procedimiento para esterilizar un lisado de plaquetas en estado líquido que comprende al menos los factores de crecimiento endógenos TGF-beta1, EGF, PDGF-AB, IGF-1, VEGF y bFGF, en donde dicho procedimiento comprende:

- la congelación de dicho lisado de plaquetas líquido para obtener un lisado de plaquetas congelado,
- 20 - la irradiación con radiación ionizante de dicho lisado de plaquetas congelado para obtener un lisado de plaquetas esterilizado, estando dispuesta dicha irradiación de modo que retenga al menos el 80% de la concentración de al menos uno de los factores de crecimiento endógenos elegidos en el grupo formado por TGF-beta1, EGF, PDGF-AB, IGF-1 y VEGF.

Otros objetivos y ventajas resultarán evidentes a partir de la descripción que sigue.

25 La Figura 1 representa las medias de las concentraciones de factores de crecimiento IGF-1, PDGF-AB, TGF-beta1, EGF, VEGF y bFGF en lisados de plaquetas no irradiados (C) y en lisados de plaquetas esterilizados mediante la realización del procedimiento de la invención (I).

30 La Figura 2 muestra la media de las tasas de amplificación de células madre mesenquimales cultivadas en presencia de lisados de plaquetas no irradiados (C), de lisados de plaquetas esterilizados en estado congelado por irradiación gamma a 35 kGy, de lisados de plaquetas esterilizados con estado congelado por irradiación gamma a 45 kGy y suero de ternero fetal suplementado con bFGF.

35 La Figura 3 representa las medias de las tasas de amplificación de células madre mesenquimales cultivadas en presencia de lisados de plaquetas no irradiados (C), de lisados de plaquetas esterilizados en estado congelado por irradiación gamma a 35 kGy, de lisados de plaquetas esterilizados en estado congelado por irradiación gamma a 45 kGy y suero de ternero fetal (SVF (RG) y SVF (CG)), con concentraciones variables de bFGF exógeno añadido.

La invención se refiere a un procedimiento de esterilización de un lisado de plaquetas para obtener un lisado de plaquetas esterilizado.

Por "procedimiento de esterilización" se designa un procedimiento para reducir y/o inactivar patógenos que comprenden virus, bacterias, hongos y esporas bacterianas.

40 Por lisado de plaquetas, se entiende el producto de la lisis de plaquetas, es decir, el producto obtenido tras la desintegración de la membrana celular que conduce a la liberación de moléculas (factores de crecimiento, citoquinas) normalmente contenidas en el interior de las plaquetas.

45 Por tanto, el lisado de plaquetas comprende en particular un concentrado de factores de crecimiento que incluyen IGF-1, PDGF-AB, TGF-beta1, EGF, VEGF y bFGF. Otros factores de crecimiento que se encuentran en el lisado de plaquetas incluyen el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF, Connective Tissue Growth Factor) y el factor derivado de células estromales de tipo 1-alfa (SDF-1 alpha, Stromal Cell-Derived Factor-1 alpha). Se dice que estos factores de crecimiento son endógenos.

50 Por sustancia endógena se entiende cualquier sustancia producida por plaquetas o incluida en la suspensión plaquetaria inicial utilizada para preparar el lisado plaquetario, a diferencia de una sustancia exógena introducida en el lisado plaquetario o en la suspensión plaquetaria inicial.

La lisis de las plaquetas se lleva a cabo, por ejemplo, mediante uno o más ciclos de congelación/descongelación, mediante el uso de ultrasonido o mediante un tratamiento con disolvente/detergente.

En el procedimiento de esterilización descrito, el lisado de plaquetas proviene de plaquetas animales, en particular humanas, obtenidas de un procedimiento de aféresis o preparadas a partir de una donación de sangre.

5 Según un primer aspecto de la invención, el procedimiento de esterilización de un lisado de plaquetas se realiza a partir de un lisado de plaquetas en estado líquido, comprendiendo dicho lisado de plaquetas al menos los factores de crecimiento endógenos IGF-1, PDGF-AB, TGF-beta1, EGF, VEGF y bFGF, comprendiendo dicho procedimiento:

- la congelación de dicho lisado de plaquetas líquido para obtener un lisado de plaquetas congelado,

10 - la irradiación con radiación ionizante de dicho lisado de plaquetas congelado para obtener un lisado de plaquetas esterilizado, estando dispuesta dicha irradiación de modo que retenga al menos el 80% de la concentración de al menos uno de los factores de crecimiento endógenos seleccionado del grupo formado por TGF-beta1, EGF, PDGF-AB, IGF-1 y VEGF.

El lisado de plaquetas en estado líquido se obtiene a partir de una suspensión de plaquetas. La suspensión de plaquetas es en particular un concentrado de plaquetas o una mezcla de concentrados de plaquetas, una capa leucoplaquetaria, también llamada capa leucocitaria, o una mezcla de capas leucoplaquetarias, un plasma rico en plaquetas o una mezcla de plasma rico en plaquetas.

15 Más particularmente, la suspensión de plaquetas es un concentrado de plaquetas derivado de aféresis o preparado a partir de sangre donada o una mezcla de concentrados de plaquetas derivados de aféresis o preparados a partir de sangre donada. Por ejemplo, la mezcla comprende entre 2 y 7 concentrados de plaquetas, en particular entre 3 y 5 concentrados de plaquetas.

20 El concentrado de plaquetas es fresco, es decir, calificado para ser transfundido a un paciente, o vencido, es decir, almacenado durante 5 días o más después de su preparación y ya no se puede transfundir a un paciente.

La suspensión de plaquetas comprende plaquetas suspendidas en un medio líquido que comprende plasma.

25 Por ejemplo, el medio líquido incluye solo plasma. Según otro ejemplo, el medio líquido comprende además una solución para la conservación de plaquetas, como la solución SSP+ (Maco Pharma) o Intersol® (Fenwal). En un ejemplo particular, el medio líquido comprende del 20% al 100%, en particular el 30% de plasma y del 0% al 80%, en particular el 70% de la solución de conservación de plaquetas.

Para proporcionar, es decir, poner a disposición el lisado de plaquetas en estado líquido, el procedimiento de esterilización comprende la preparación preliminar del lisado de plaquetas en estado líquido a partir de una suspensión de plaquetas.

30 Según una realización particular, la preparación preliminar de dicho lisado plaquetario en estado líquido a partir de una suspensión de plaquetas comprende las siguientes etapas sucesivas:

- someter dicha suspensión de plaquetas a al menos un ciclo de congelación/descongelación para obtener una composición de plaquetas lisadas,

- separar dicha composición de plaquetas lisadas en una fracción clara de lisado de plaquetas y una fracción de restos celulares,

35 - aislar dicho lisado de plaquetas en estado líquido.

La suspensión de plaquetas se somete a al menos un ciclo de congelación/descongelación. En particular, se llevan a cabo de 2 a 3 ciclos de congelación/descongelación.

40 La suspensión de plaquetas se congela primero a una temperatura comprendida entre -10 °C y -80 °C, especialmente -80 °C. La congelación dura al menos 24 horas. Luego, la suspensión de plaquetas se descongela a una temperatura que varía de 4 °C a 37 °C, en particular a temperatura ambiente o a 4 °C.

La etapa de congelación/descongelación provoca la destrucción de las plaquetas con la liberación de su contenido y, en particular, de sus factores de crecimiento endógenos.

Después del ciclo de congelación/descongelación, se obtiene una composición de plaquetas lisadas que comprende el contenido de plaquetas, el medio líquido en el que se suspendieron las plaquetas y los restos celulares.

45 Dicha composición de plaquetas lisadas se separa luego en una fracción clara de lisado plaquetario y una fracción de restos celulares.

Según una realización particular, esta separación se realiza mediante centrifugación de dicha composición de plaquetas lisadas con el fin de obtener un sobrenadante de lisado plaquetario y un sedimento de restos celulares.

50 Como variante, la separación se realiza mediante filtración para obtener un filtrado de lisado de plaquetas y un retentado de restos celulares.

El lisado de plaquetas en estado líquido, finalmente, se aísla por extracción. Este lisado de plaquetas comprende al menos los factores de crecimiento endógenos IGF-1, PDGF-AB, TGF-beta1, EGF, VEGF y bFGF.

5 La suspensión plaquetaria inicial que comprende plasma, el lisado plaquetario esterilizado según la invención también comprende plasma, y en particular constituyentes plasmáticos tales como fibrinógeno, globulinas, albúmina, triglicéridos, interleuquinas e interferones.

Una vez preparado el lisado de plaquetas en estado líquido, el procedimiento de la invención comprende congelar dicho lisado de plaquetas líquido para obtener un lisado de plaquetas congelado.

La congelación del lisado de plaquetas líquido se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre -10 °C y -80 °C, en particular alrededor de -80 °C.

10 El lisado de plaquetas se envasa en un recipiente resistente a la congelación y, en particular, en una bolsa. El material resistente a la congelación es en particular etileno acetato de vinilo, polietileno o un fluoropolímero tal como etileno-propileno fluorado.

Para lograr la esterilización, el lisado de plaquetas en su estado congelado se irradia luego con radiación ionizante. El lisado de plaquetas se irradia en un estado no liofilizado, es decir, comprende agua.

15 Según una realización, la radiación ionizante es radiación gamma.

La radiación gamma es una radiación electromagnética compuesta por fotones de alta energía, del orden de 1,6 MeV. Por ejemplo, lo emite una fuente de cobalto 60.

Esta radiación ionizante provoca la destrucción de microorganismos al romper la cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) o la hebra de ácido ribonucleico (ARN) permitiendo así la inactivación de bacterias y virus, por ejemplo.

20 Sin embargo, la radiación ionizante es capaz de dañar los polímeros al crear iones que se transforman en radicales libres activos y que, tras la recombinación, crean nuevos enlaces químicos permanentes.

Según la invención, la irradiación por radiación ionizante se dispone de modo que retenga al menos el 80% de la concentración de al menos uno de los factores de crecimiento endógenos elegidos del grupo formado por TGF-beta1, EGF, PDGF-AB, IGF-1 y VEGF.

25 En particular, la irradiación por radiación gamma se organiza de manera que se mantenga al menos el 80%, particularmente al menos el 90% de la concentración de cada uno de los factores de crecimiento TGF-beta1, EGF, PDGF-AB, IGF-1 y VEGF.

Incluso más particularmente, el lisado de plaquetas irradiado según la invención retiene al menos el 95% de la concentración de cada uno de los factores de crecimiento TGF-beta1, EGF, PDGF-AB e IGF-1.

30 Los factores de crecimiento IGF, PDGF, TGF-beta1 y EGF y VEGF son los principales factores de crecimiento presentes en el lisado de plaquetas. Además, los factores de crecimiento PDGF, bFGF, TGF-beta1 son importantes para la proliferación celular, en particular para las células madre mesenquimales. Por tanto, mantener su concentración en el lisado de plaquetas esterilizado es un indicador del mantenimiento de la actividad biológica del lisado de plaquetas, en particular en términos de proliferación celular.

35 Por lo tanto, la tasa de amplificación de las células madre mesenquimales en una composición nutritiva que comprende un medio de base y un lisado de plaquetas esterilizado según el procedimiento de la invención se conserva al menos en un 80%, en particular en al menos un 85% por en relación con la velocidad de amplificación de las células madre mesenquimales en una composición nutritiva que comprende un medio de base y un lisado de plaquetas no esterilizado mediante el procedimiento de la invención.

40 Por "medio de base", se indica un medio destinado al cultivo celular como medio RPMI, MEM, DMEM o una mezcla de estos medios. Estos medios básicos comprenden esencialmente sales minerales, glucosa, aminoácidos, vitaminas y bases nitrogenadas.

El lisado de plaquetas esterilizado mediante el procedimiento de la invención conserva así una eficacia en términos de proliferación de células madre mesenquimales.

45 Según una forma de realización, la irradiación se realiza a una dosis absorbida comprendida en el intervalo de 20 kGy a 60 kGy, en particular de 35 kGy a 45 kGy.

La dosis absorbida es la cantidad de energía impartida a la materia por unidad de masa.

50 Por ejemplo, la irradiación se lleva a cabo durante un período comprendido en el intervalo de 600 segundos a 1800 segundos, preferiblemente de 900 segundos a 1200 segundos, y más preferiblemente de 1075 segundos, con una fuente que presenta una actividad de 1 Mci ($3,7 \times 10^{19}$ Bq).

En la práctica, la irradiación por radiación ionizante del lisado de plaquetas congelado se realiza a baja temperatura, colocándose el lisado de plaquetas congelado en hielo seco.

5 Ventajosamente, la etapa de irradiación se lleva a cabo sobre el lisado de plaquetas en su envasado final, en particular en una bolsa. La bolsa está hecha, por ejemplo, de un material resistente a la irradiación por radiación ionizante, como etileno acetato de vinilo.

En estas condiciones de irradiación, en particular de una dosis relativamente alta que permite la destrucción de patógenos y de una temperatura muy baja, se encontró sorprendentemente que la concentración de la mayoría de los factores de crecimiento contenidos en el lisado de plaquetas se mantuvo sustancialmente equivalente. Este es el caso de los factores de crecimiento TGF-beta1, EGF, PDGF-AB, IGF-1 y, en menor medida, VEGF.

10 Solo la concentración de factor de crecimiento bFGF sufre una caída más pronunciada, del orden del 40%.

Además, debe tenerse en cuenta que la irradiación por radiación ionizante se lleva a cabo en particular sin compuesto estabilizador exógeno, conocido por reducir el daño al material por irradiar por radiación ionizante. Ejemplos de tales compuestos estabilizantes son antioxidantes (ácido ascórbico, tocoferol), captadores de radicales libres, determinados polisacáridos como celulosa o quitosano y determinadas proteínas como gelatina.

15 Según una realización particular, el procedimiento de la invención comprende, además, una etapa de filtración del lisado de plaquetas en estado líquido a través de un filtro con una porosidad de 0,65 µm o menos, particularmente 0,45 µm o menos, y en particular 0,22 µm o menos.

La etapa de filtración se lleva a cabo, por ejemplo, al final de la preparación preliminar del lisado de plaquetas en estado líquido, antes de su congelación para la irradiación.

20 Cuando el lisado de plaquetas se filtra a través de un filtro que tiene una porosidad de 0,22 µm o menos, se dice que el filtro es esterilizante porque retiene notablemente bacterias de un tamaño superior a 0,22 µm.

En este caso, el lisado plaquetario se somete a dos procedimientos de esterilización: filtración esterilizante y esterilización por radiación ionizante, lo que permite ampliar el espectro de patógenos eliminados y/o inactivados potencialmente presentes en el lisado plaquetario.

25 En particular, el lisado de plaquetas esterilizado según la invención se envasa en una bolsa, en particular de etileno-acetato de vinilo.

Según otro aspecto, la invención se refiere a un lisado de plaquetas esterilizado obtenido mediante el procedimiento según el primer aspecto de la invención.

30 El lisado de plaquetas preparado según el procedimiento de esterilización de la invención presenta un perfil de factores de crecimiento particular.

35 Por ejemplo, el lisado de plaquetas esterilizado de acuerdo con la invención comprende una concentración del factor de crecimiento bFGF endógeno de menos de 120 pg/ml, en particular menos de 100 pg/ml. La concentración de IGF-1 endógeno está comprendida entre 30 y 40 ng/ml. La concentración de PDGF-AB endógeno está comprendida entre 20 y 45 ng/ml. La concentración de TGF-beta1 endógeno está comprendida entre 100 y 130 ng/ml. La concentración de EGF endógeno está comprendida entre 2500 y 3700 ng/ml. La concentración de VEGF endógeno está comprendida entre 600 y 800 pg/ml, en particular entre 600 y 700 pg/ml.

40 El lisado de plaquetas esterilizado de acuerdo con la invención también comprende componentes del plasma como fibrinógeno, globulinas, albúmina, triglicéridos, interleuquinas e interferones, cuya cantidad varía según el producto de partida del lisado de plaquetas, en particular, dependiendo de si la suspensión de plaquetas comprende o no una solución de conservación de plaquetas.

Por ejemplo, la concentración de fibrinógeno endógeno en un lisado de plaquetas esterilizado según la invención y preparado a partir de una suspensión de plaquetas que comprende el 30% de plasma y el 70% de una solución para preservar plaquetas es menor que 0,4 g/l, es decir, una pérdida de aproximadamente el 20% en comparación con un lisado de plaquetas no irradiado por radiación gamma.

45 Según otro ejemplo, la concentración de fibrinógeno endógeno en un lisado de plaquetas esterilizado según la invención y preparado a partir de una suspensión de plaquetas que comprende 100% de plasma es inferior a 1 g/l, particularmente inferior a 0,70 g/l y más particularmente inferior a 0,60 g/l, es decir, una pérdida de fibrinógeno endógeno que varía de más del 25% a más del 45%.

50 Ventajosamente, el lisado de plaquetas de la invención carece de sustancia exógena. Tales sustancias son en particular (i) estabilizadores como antioxidantes (ácido ascórbico, tocoferol), captadores de radicales libres, determinados polisacáridos como celulosa o quitosano, determinadas proteínas como gelatina y péptidos o dipéptidos como glicina o alanilglutamina; (ii) moléculas exógenas capaces de unirse a factores derivados de plaquetas, tales como heparina o sulfato de dextrano; (iii) polímeros anfífilos tales como polivinilpirrolidona o derivados de celulosa.

Además, el lisado de plaquetas esterilizado según la invención presenta la ventaja de tener propiedades de coagulación reducidas en comparación con un lisado de plaquetas no esterilizado por el procedimiento de la invención.

5 De hecho, el procedimiento convencional para preparar el lisado de plaquetas mediante congelación/descongelación conduce a un lisado de plaquetas que comprende fibrinógeno, una proteína soluble presente en el plasma e involucrada en la coagulación.

Cuando el lisado de plaquetas preparado convencionalmente se pone en contacto con un medio de base que incluye calcio, el medio se coagula o se "gelifica". Para evitar esta coagulación, es necesario agregar un anticoagulante de tipo heparina al medio de base.

10 De manera sorprendente y particularmente ventajosa, el lisado de plaquetas obtenido por el procedimiento de esterilización no coagula cuando se agrega al medio de cultivo, en particular cuando la cantidad de lisado de plaquetas agregado al medio de cultivo está en el intervalo del 1% al 15%, particularmente del 2% al 10%, aún más particularmente del 2% al 5%. Entonces ya no es necesaria la adición de heparina.

De manera aún más inesperada, el lisado de plaquetas esterilizado según la invención presenta propiedades muy particulares en relación con la proliferación de células, en particular de células madre mesenquimales.

15 De hecho, la complementación de un medio de base con un lisado de plaquetas esterilizado según la invención y del factor de crecimiento exógeno bFGF induce un efecto beneficioso sobre la proliferación de células madre mesenquimales, mientras que la adición de bFGF exógeno a un medio de base suplementado con un lisado de plaquetas no irradiado por radiación ionizante no tiene ningún efecto sobre esta proliferación.

20 Por lo tanto, existe un efecto sinérgico entre la adición de bFGF exógeno y la irradiación por radiación ionizante de un lisado de plaquetas.

Así, según un tercer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para el cultivo de células, en particular de células madre mesenquimales, que comprende poner dichas células en contacto con una composición nutritiva que comprende un medio de base y un lisado plaquetario esterilizado según el segundo aspecto de la invención.

25 Las células madre mesenquimales son, por ejemplo, células madre mesenquimales humanas derivadas de la médula ósea o la sangre del cordón umbilical.

Según un modo de realización particular, la composición nutritiva comprende del 2% al 25%, en particular del 5% al 15%, e incluso más particularmente del 8 al 10% de lisado de plaquetas esterilizado según la invención.

En particular, el lisado de plaquetas esterilizado se añade extemporáneamente de manera preliminar a dicho medio de base para formar dicha composición nutritiva.

30 Como el lisado de plaquetas irradiado exhibe un poder de coagulación reducido, no es necesario agregar un anticoagulante de tipo heparina a la composición nutritiva para evitar su coagulación y mantenerla en estado líquido. Por tanto, según una realización del procedimiento para cultivar células, la composición nutritiva está en forma líquida y libre de anticoagulante.

35 Ventajosamente, el procedimiento para cultivar células comprende, además, la adición extemporánea a dicha composición nutritiva de bFGF exógeno.

En particular, la concentración de bFGF exógeno añadido está comprendida en el intervalo de 0,1 ng/ml a 15 ng/ml, especialmente de 0,1 a 1,5 ng/ml, por ejemplo, 1 ng/ml.

Ejemplo:

1. Preparación de un lisado de plaquetas

40 Se prepara un lote de lisado de plaquetas como se describe a continuación.

Se prepararon concentrados de plaquetas que comprendían 70% de solución de conservación Intersol® y 30% de plasma a partir de un conjunto de cinco capas leucocitarias y se almacenaron en una bolsa de almacenamiento.

Las bolsas de almacenamiento se congelaron a -80 °C durante aproximadamente 24 horas antes de descongelarse a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas.

45 Las bolsas de almacenamiento descongeladas se centrifugan luego a una velocidad de 5000 g durante 10 minutos para separar el sobrenadante que comprende el lisado de plaquetas del sedimento que comprende los restos celulares. El sobrenadante de cada una de las bolsas de almacenamiento se transfiere a una bolsa de mezcla para obtener una mezcla de lisados de plaquetas. La mezcla de lisados de plaquetas se redistribuye luego en pequeñas bolsas de 50 ml de etileno-acetato de vinilo.

50 Otro lote de lisado de plaquetas se prepara de manera similar, excepto que la mezcla de lisados de plaquetas se filtra

a través de un filtro esterilizador con una porosidad de 0,22 µm antes de redistribuirse en bolsas pequeñas en etilenoacetato de vinilo.

Las bolsas pequeñas se congelan luego a -80 °C para su almacenamiento.

2. Irradiación de lisados de plaquetas

- 5 Las pequeñas bolsas congeladas que contienen el lisado de plaquetas se irradian con radiación gamma a una dosis absorbida de 35 kGy o 45 kGy.

3. Ensayo de factores de crecimiento

- 10 Los factores de crecimiento IGF1, PDGF-AB, TGF-beta1, EGF, VEGF y bFGF se analizan en muestras de los dos lotes de lisado de plaquetas (filtrado y sin filtrar), habiendo sido irradiadas las muestras con radiación gamma a 35 kGy o 45 kGy o sin irradiar. Se realizan tres ensayos para cada muestra.

Los ensayos de factor de crecimiento se llevan a cabo utilizando kits comerciales ELISA Quantikine suministrados por Bio-Techne (referencias DG100 para IGF-1 humano, DHD00C para PDGF-AB humano, DB100B para TGF-beta1 humano, DEG00 para EGF humano, DVE00 para VEGF humano y DFB50 para FRG humano) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 15 La Figura 1 representa las medias de las concentraciones de factores de crecimiento IGF-1, PDGF-AB, TGF-beta1, EGF, VEGF y bFGF en las muestras no irradiadas (C), filtradas o no, y en las muestras irradiadas por radiación gamma (I) a 35 kGy o 45 kGy, filtradas o no.

- 20 Los resultados muestran que la irradiación por radiación gamma no tiene un efecto significativo sobre las concentraciones de los factores de crecimiento IGF-1, PDGF-AB, TGF-beta1 y EGF. La irradiación por radiación gamma tiene un impacto moderado en la concentración de VEGF (-8%) y más marcado en bFGF (-39%).

4. Ensayo de componentes plasmáticos

Se llevaron a cabo pruebas bioquímicas en un lisado de plaquetas preparado según el Ejemplo 1 para determinar la concentración de ciertos componentes.

El fibrinógeno se analizó mediante el método de Clauss (análisis basado en el tiempo con exceso de trombina).

- 25 Los dímeros D se determinaron mediante inmunturbidimetría de látex (lectura fotométrica).

La vitamina B12 y la vitamina D se determinaron mediante un método inmunoenzimológico de micropartículas por quimioluminiscencia (CMIA).

El colesterol total se determinó mediante colorimetría enzimática con colesterol esterasa/oxidasa.

El sodio y el cloro se midieron mediante un potenciómetro indirecto selectivo (electrodo específico).

- 30 La colorimetría se utilizó para la determinación de proteínas totales (biuret), albúmina (verde de bromocresol), calcio (Arsenazo III) e hierro sérico (fereno sin desproteínización).

Los micoplasmas se detectaron mediante cultivo en medio selectivo (agar).

La siguiente tabla muestra que, con la excepción del fibrinógeno, los otros componentes probados no se ven afectados por la irradiación gamma en dosis que varían de 5 a 55 KGy.

Lisado de plaquetas	Control	5 KGy	15 KGy	35 KGy	55 KGy
Fibrinógeno (g/l)	0,50	0,42	0,40	0,40	<0,4
D-Dímeros (mg/ml)	0,27	0,27	0,27	0,27	0,31
Vitamina B12 (pg/ml)	144	119	135	134	138
Vitamina D (ng/ml)	5,5	5,1	4,9	5,4	5,4
Colesterol total (g/l)	0,49	0,49	0,48	0,47	0,49
Sodio (mEq/l)	182	182	180	181	181
Cloro (mEq/l)	78	79	79	79	79
Proteínas totales (g/l)	18	18	18	18	18

Albúmina (g/l)	12	12	12	12	12
Calcio (mg/l)	31	31	31	31	31
Calcio corregido (mg/l)	53	53	53	53	53
Hierro sérico (µg/dl)	30	30	31	30	31
Micoplasma 10 ³ UFC/ml)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo

Se llevaron a cabo los mismos ensayos en un lisado de plaquetas obtenido de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1, con la diferencia de que los concentrados de plaquetas de partida no comprenden una solución de conservación de plaquetas (plasma al 100%).

Lisado de plaquetas	Control	5 KGy	15 KGy	35 KGy	55 KGy
Fibrinógeno (g/l)	1,34	0,92	0,69	0,51	0,4

5

4. Proliferación de células madre mesenquimales

Se cultivaron células madre mesenquimales humanas derivadas de la médula ósea (4000 células/cm²) durante 7 días en una composición nutritiva que comprende el medio de base alfa-DMEM suplementado con 8% de lisado de plaquetas, filtrado o no, irradiado por radiación gamma a 35 kGy, 45 kGy o no.

10 Primero se observó que la etapa de irradiación del lisado plaquetario por radiación gamma induce una pérdida de la propiedad de coagulación cuando se coloca en presencia del medio de base, lo que hace que la adición de heparina en el medio no sea necesaria.

En comparación, se cultivaron células madre mesenquimales humanas derivadas de la médula ósea en una composición nutritiva que comprendía medio de base alfa-DMEM complementado con suero de ternera fetal al 10%.

15 La Figura 2 muestra las medias de los factores de amplificación de las células madre mesenquimales cultivadas con lisado plaquetario no irradiado (C), filtrado o no, e irradiado por radiación gamma a 35 kGy o a 45 kGy, filtrado o no; y en comparación con células cultivadas con suero de ternero fetal y bFGF.

La disminución media del factor de amplificación es del orden del 15%.

5. Efecto del factor de crecimiento bFGF

20 Se sabe que el factor de crecimiento bFGF estimula la proliferación de muchos tipos de células. Sin embargo, cuando el cultivo de las células madre mesenquimales se lleva a cabo con lisado de plaquetas como sustituto del suero de ternero fetal, el efecto del bFGF exógeno sobre la tasa de amplificación celular es insignificante.

Se probó el efecto sobre la proliferación de células madre mesenquimales de la adición de bFGF exógeno (1 ng/ml) a un medio de base suplementado con lisado de plaquetas irradiado (8%) por radiación gamma (I) o no irradiado (C).

25 A modo de comparación, también se probó el efecto sobre la proliferación de células madre mesenquimales de la adición de bFGF exógeno (1 ng/ml) a un medio de base complementado con suero de ternero fetal de grado de investigación (10%) (SVF (RG)) o grado clínico (SVF (CG)).

30 La Figura 3 muestra la media de las tasas de amplificación obtenidas. Los resultados confirman el efecto de bFGF en los cultivos de suero de ternero fetal y la ausencia de efecto de bFGF exógeno en los cultivos de lisado de plaquetas no irradiados.

Por otra parte, añadiendo 60 pg/ml o 150 pg/ml a un lisado de plaquetas irradiado con radiación gamma, la velocidad de amplificación vuelve a ser equivalente a la obtenida con el lisado de plaquetas no irradiado. Y la adición de 1 ng/ml de bFGF exógeno muestra una mejor tasa de amplificación.

6. Fenotipo

35 Se ha comprobado que el uso de un lisado plaquetario, combinado o no con bFGF exógeno, para el cultivo de células madre mesenquimales no modifica el perfil de expresión de estas células, quedando estas últimas positivas para los marcadores CD13, CD44, CD73, CD90 y CD105 y negativos para los marcadores CD34, CD45 y HLA-DR. Las células también son negativas para los marcadores CD40, CD80 y CD86.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de esterilización de un lisado de plaquetas en estado líquido que comprende al menos los factores de crecimiento endógenos TGF-beta1, EGF, PDGF-AB, IGF-1, VEGF y bFGF, comprendiendo dicho procedimiento la congelación de dicho lisado de plaquetas líquido para obtener un lisado de plaquetas congelado, caracterizado porque comprende, además, la irradiación con radiación ionizante de dicho lisado de plaquetas congelado para obtener un lisado de plaquetas esterilizado, estando dispuesta dicha irradiación para conservar a menos el 80% de la concentración de al menos uno de los factores de crecimiento endógenos seleccionados del grupo que consiste en TGF-beta1, EGF, PDGF-AB, IGF-1 y VEGF.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la irradiación se dispone para conservar al menos el 80% de la concentración de cada uno de los factores de crecimiento TGF-beta1, EGF, PDGF-AB, IGF-1 y VEGF.
3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque comprende la preparación preliminar del lisado de plaquetas en estado líquido a partir de una suspensión de plaquetas.
- 15 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque la preparación preliminar de dicho lisado de plaquetas en estado líquido a partir de una suspensión de plaquetas comprende las siguientes etapas sucesivas:
- someter dicha suspensión de plaquetas a al menos un ciclo de congelación/descongelación para obtener una composición de plaquetas lisadas,
 - separar dicha composición de plaquetas lisadas en una fracción clara de lisado de plaquetas y una fracción de restos celulares,
 - 20 - aislar dicho lisado de plaquetas en estado líquido.
5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque comprende una etapa de filtración de dicho lisado de plaquetas en estado líquido a través de un filtro con una porosidad de 0,65 µm o menos.
- 25 6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizado porque dicha suspensión plaquetaria comprende plaquetas suspendidas en un medio líquido que comprende plasma.
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque dicho medio líquido que comprende plasma comprende, además, una solución para la conservación de plaquetas.
8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la congelación del lisado de plaquetas líquido se realiza a una temperatura de aproximadamente -80 °C.
- 30 9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la radiación ionizante es radiación gamma.
10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque la irradiación se realiza a una dosis absorbida comprendida en el intervalo de 20 kGy a 60 kGy.

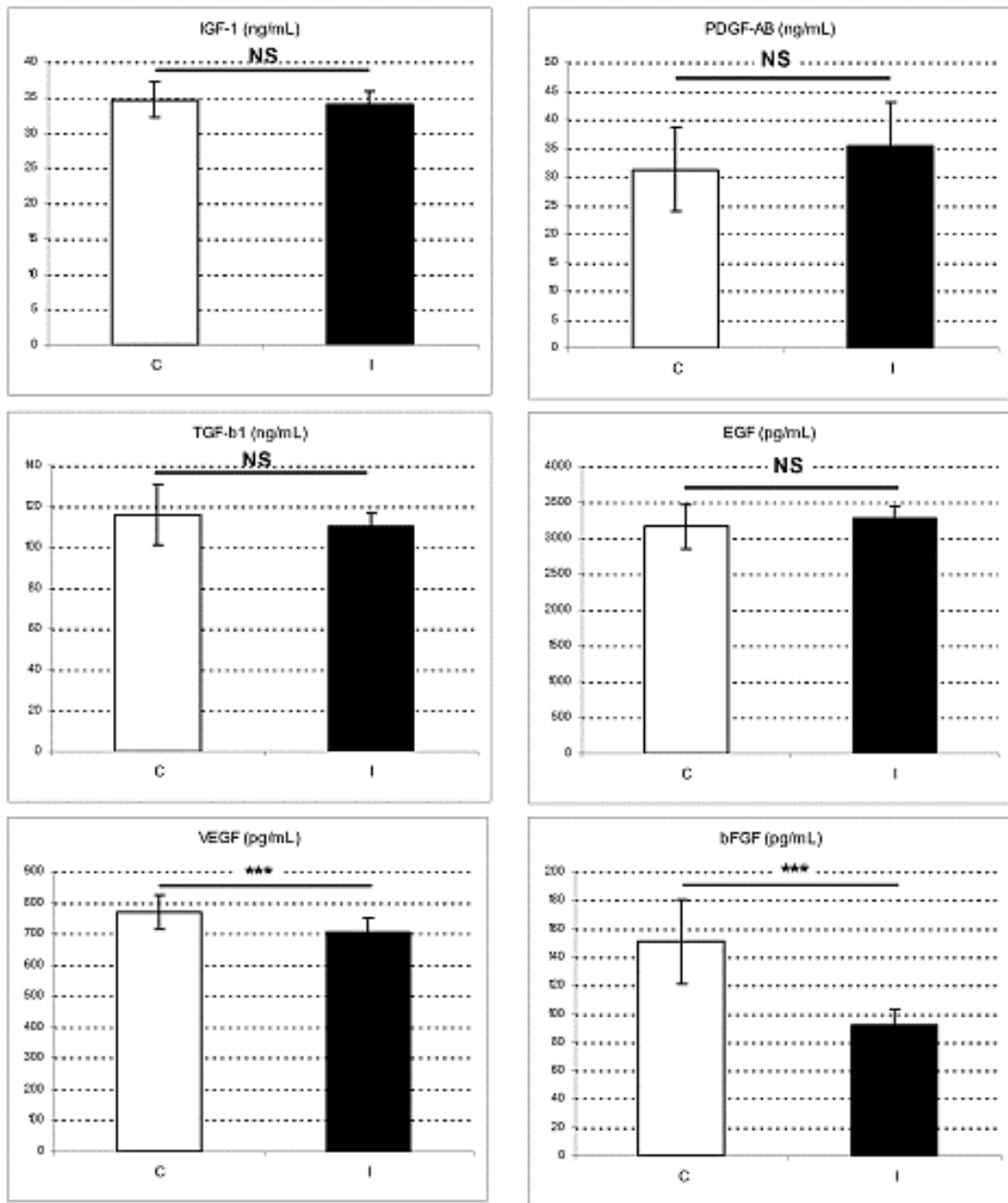


FIG. 1

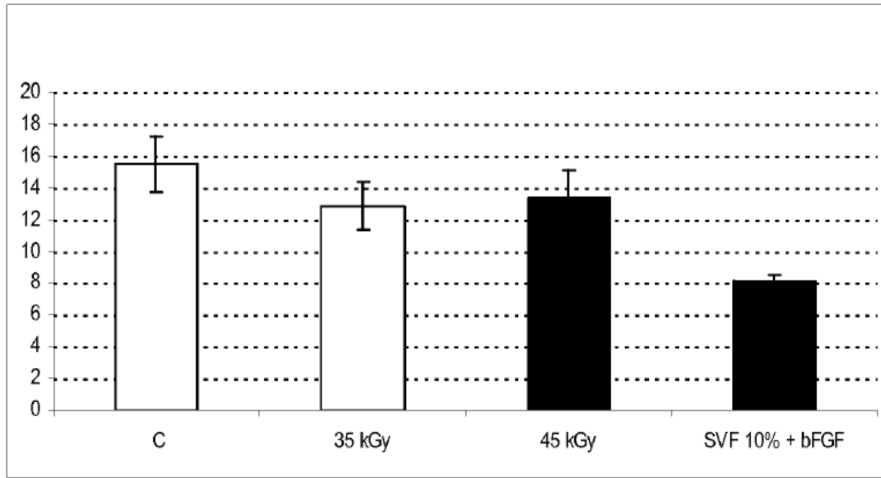


FIG. 2

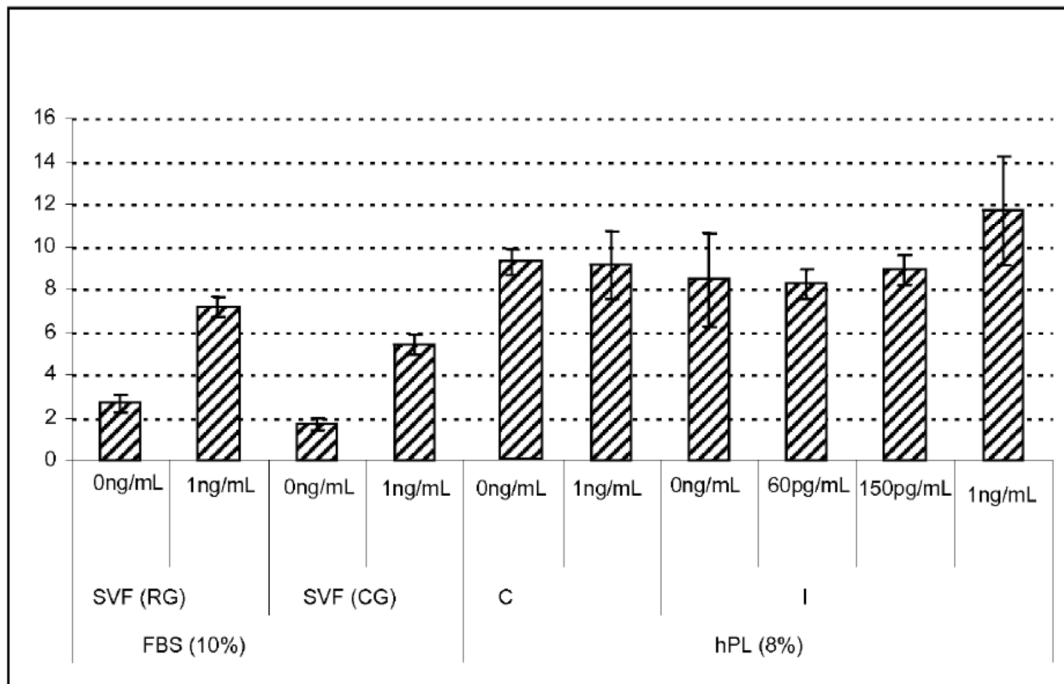


FIG. 3