



No. 14-013982- -00000-0000

Fecha: 2014-01-24 13:13:27

Dep. 2020 DIR.NUEVASOR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 42



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____
PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UNA COMPOSICION
QUE CONTIENE FACTORES DE CRECIMIENTO A PARTIR DE UN
COMPUESTO SANGUINEO Y COMPOSICION OBTENIBLE POR
DICHO PROCEDIMIENTO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____ A61K 38/18

71. SOLICITANTE _____ EDUARDO ANITUA ALDECOA

DOMICILIO _____ 01005 Vitoria (Alava), España

74. APODERADO _____ LUIS FELIPE CASTILLO

22. BOGOTÁ, D.C., _____ 24 ENE. 2014 2014



No. 14-013982- -00000-0000

Fecha: 2014-01-24 13:13:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 42



DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1	TIPO SE SOLICITUD	☒ Patente de invención	☐ Patente de Modelo de Utilidad
		☒ Capítulo I	☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
	Solicitud Internacional No.	PCT/ PCT/ES2012/000196	Fecha 13/07/2012
	Publicación Internacional No.	WO WO2013/017707 A1	Fecha 07/02/2013
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
	PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UNA COMPOSICION QUE CONTIENE FACTORES DE CRECIMIENTO A PARTIR DE UN COMPUESTO SANGUINEO Y COMPOSICION OBTENIBLE POR DICHO PROCEDIMIENTO		
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
	A61K 38/18		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
	EDUARDO ANITUA ALDECOA		IDENTIFICACIÓN TIPO
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
	DIRECCIÓN	San Antonio 15, 5o.	No. TELÉFONO
	CIUDAD	01005 Vitoria (Alava), España	CORREO ELECTRÓNICO
	PAIS		NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
1	Eduardo ANITUA ALDECOA		ES
2			
3			
4			
5			
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
	PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD DIRECCIÓN
1	España	Alava	Vitoria San Antonio 15, 5o
2			
3			
4			
5			
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
	LUIS FELIPE CASTILLO GIBSONE		IDENTIFICACION C.C. 79.397.879 de TP 68.995 del Bogotá C.S.J.
	DIRECCIÓN	Carrera 13 No. 37-43 Piso 12	No. TELÉFONO 285 7460
	CIUDAD	Bogotá, D.C.	CORREO info@castillograu.c
	PAÍS	Colombia	ELECTRÓNICO om No. RADICACIÓN O PORTOCOLO DE PODER

10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAIS DE ORIGEN		CÓDIGO PAIS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1	ESPAÑA		P201100867	299.07.2011
2				
3				
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen,				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente,				
12	DECLARACION SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicional de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de la patente.				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐				
Universidades públicas o privadas ☐				
Entidades sin ánimo de lucro ☐				
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				
14	AUTORIZACION DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☒ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.				
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	No.	Fecha.	
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL			
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)				
Quintero				
17	ANEXOS			
Documentación Técnica		Documentación Jurídica		
Solicitud Internacional en Castellano				
1	☒ Descripción	No. De folios:	9	☐ Poderes, si fuera el caso.
2	☒ Reivindicaciones	No. Reivindicaciones:	10	☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante
3	☐ Dibujos y/o figuras	No. Folios:	11	☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado número de registro, si fuera al caso
4	☒ Resumen		12	☐ Copia de la licencia o autorización de conocimientos Tradicionales, o certificado o número de registro, si fuera el caso
5	☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso		13	☐ Reducción de tasas
6	☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7	☒ Arte final 12 x 12		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea	
8	☐ Anexo formato digital		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004	
			Universidades públicas o privadas	
			☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
			Entidades sin ánimo de lucro	
			☐ Copia de regido vigente en Cámara de comercio	
			☐ Hoja de información complementaria	
			☐ Otros, especificar	
			16	☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
			17	☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
			18	☐ Comprobante de pago de la tasa de concepto de excedente de palabras en la publicación
			19	☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10

PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE UNA COMPOSICIÓN QUE CONTIENE
FACTORES DE CRECIMIENTO A PARTIR DE UN COMPUESTO SANGUÍNEO, Y
COMPOSICIÓN OBTENIBLE POR DICHO PROCEDIMIENTO

5

DESCRIPCIÓN

Sector de la técnica

10 La invención se refiere a un procedimiento de obtención de una composición que contiene factores de crecimiento, con la presencia o no de componentes celulares hemáticos (plaquetas, eritrocitos y glóbulos blancos), a partir de un compuesto sanguíneo, y a la composición que contiene factores de crecimiento obtenible por medio de dicho procedimiento.

15

Estado de la técnica

20 En el estado de la técnica es conocida de forma muy extensa la preparación de compuestos sanguíneos que contienen factores de crecimiento, obtenidos a partir de la sangre de un paciente. Dichos compuestos sanguíneos con o factores de crecimiento han demostrado ofrecer propiedades biológicas muy importantes, especialmente relacionadas con el desencadenamiento y favorecimiento de la regeneración de tejidos, la disminución del dolor en cierto tipo de dolencias y enfermedades, y otras múltiples utilidades.

25 A modo de ejemplo, la solicitud de patente WO0044314A1, a favor del propio solicitante, se refiere a un método de preparación de un gel de plasma sanguíneo autólogo, rico en factores de crecimiento, a partir de la propia sangre del paciente, procedimiento que ha sido actualizado en la más reciente solicitud de patente WO2010130851A2, también a favor del propio solicitante. Ambos procedimientos comparten pasos comunes como son el centrifugado de la sangre del paciente, la separación de plasma rico en plaquetas y la adición de cloruro de calcio al plasma rico en plaquetas para producir la activación del plasma (la liberación de factores de crecimiento por parte de las plaquetas contenidas en el plasma) y para producir la coagulación del mismo hasta que el plasma adquiere una consistencia similar a un gel.

35 También se conoce, por medio de la patente ES2221770B2 un procedimiento de preparación de otro compuesto sanguíneo rico en factores de crecimiento y con propiedades biológicas muy beneficiosas, en este caso en forma líquida. Concretamente, se trata de un sobrenadante de un plasma sanguíneo rico en factores de crecimiento, obtenido a partir de la fase líquida sobrenadante que aparece tras provocar la coagulación y una posterior retracción de dicho plasma rico en factores de crecimiento. En esta patente se describen además diversos usos del sobrenadante, entre los cuales destaca su uso (favorecido por su consistencia líquida) como colirio para el tratamiento de enfermedades o dolencias oculares.

Un gel de plasma que contenga en factores de crecimiento, un sobrenadante o, en general, cualquier compuesto sanguíneo autólogo preparado según métodos conocidos en el estado del arte, independientemente de la aplicación para la cual vaya a utilizarse, presenta el inconveniente de que necesita ser aplicado de forma inmediata para no perder sus propiedades biológicas. Esta necesidad es especialmente crítica si el compuesto sanguíneo contiene factores de crecimiento liberados. Así, los compuestos sanguíneos no están preparados para aguantar a temperatura ambiente largos periodos de tiempo y se recomienda su aplicación inmediata (en el caso de un sobrenadante, en no más de ocho horas desde su preparación) para evitar la degradación y desnaturalización de las proteínas y factores de crecimiento o la posible contaminación bacteriana del producto.

La inmediatez de uso de los compuestos sanguíneos autólogos no ha sido limitante hasta la fecha ya que las aplicaciones para las cuales han sido utilizados (regeneración de tejidos, cultivo de células, aplicaciones agudas o incluso semanales o quincenales, etc.) han sido compatibles con dicha inmediatez. Sin embargo, en la actualidad están surgiendo posibles nuevas aplicaciones de los compuestos sanguíneos autólogos que contienen factores de crecimiento, que exigen infiltraciones o aplicaciones continuas del compuesto, con un intervalo entre dosificaciones relativamente breve. Los compuestos sanguíneos autólogos (gel, sobrenadante, etc.) tal como son conocidos en la actualidad, exigirían que para estas nuevas aplicaciones se estuviera extrayendo sangre continuamente al paciente, repercutiendo muy negativamente en la calidad de vida del mismo y en la factibilidad de tratamientos a largo plazo para patologías crónicas o degenerativas.

Ejemplos de patologías crónicas o degenerativas que podrían ser tratadas con un compuesto sanguíneo que contiene factores de crecimiento, pero que actualmente no lo son debido a la inmediatez de uso de los compuestos sanguíneos y a la imposibilidad de su conservación, son múltiples: patologías oculares, patologías del sistema nervioso central, patologías articulares degenerativas y en conjunto todas aquellas enfermedades o patologías que requieran la administración crónica o repetida del compuesto sanguíneo que contiene factores de crecimiento.

Entre las patologías enumeradas se encuentran, particularmente pero no solamente, las siguientes: el lupus eritematoso sistémico, que es una enfermedad autoinmune crónica que afecta al tejido conjuntivo y que se caracteriza por que produce una inflamación y un daño de tejidos mediados por el sistema inmunitario, específicamente debidos a la unión de anticuerpos a las células del organismo y al depósito de complejos antígeno-anticuerpo; el síndrome Sjögren, que es una enfermedad autoinmune sistémica que se caracteriza por afectar principalmente a las glándulas exocrinas y que conduce a la aparición de sequedad; la dermatomiositis, que es una enfermedad del tejido conectivo caracterizada por la inflamación de los músculos y de la piel; la artritis reumatoide, la cual se trata de una enfermedad sistémica autoinmune caracterizada por provocar inflamación crónica, principalmente de las articulaciones, y que produce destrucción progresiva con distintos grados de deformidad e incapacidad funcional. Actualmente existen estudios que apuntan a

que una composición sanguínea autóloga que contenga factores de crecimiento podría intervenir de forma muy satisfactoria en frenar todas estas patologías si pudiera ser aplicado de forma regular en el paciente.

5 La presente invención tiene como objetivo diseñar un procedimiento de obtención de una composición que contenga factores de crecimiento a partir de un plasma rico en plaquetas o de un sobrenadante de un plasma rico en plaquetas, que permita obtener una composición capaz de ser conservada durante largos periodos de tiempo y transportada de manera sencilla, de forma que la composición resulte apta para ser aplicada no de forma
10 inmediata sino en el momento que se desee o estime necesario. De esta manera, el procedimiento según la invención permitirá obtener una composición que podrá ser utilizada en planteamientos terapéuticos crónicos, de forma periódica, todo ello sin requerir constantes extracciones de sangre del paciente y por lo tanto mejorando la calidad de vida del mismo.

15 Es también objetivo de la presente invención que la composición obtenida mediante el procedimiento de la invención conserve intactas sus propiedades biológicas.

Es también objetivo de la presente invención que la composición obtenida mediante el procedimiento de la invención conserve unas propiedades biológicas mejoradas,
20 especialmente indicadas para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

Descripción breve de la invención

Es objeto de la invención un procedimiento de obtención de una composición que
25 contiene factores de crecimiento, que comprende varias fases.

En primer lugar, el procedimiento comprende la fase de disponer de un plasma rico en plaquetas o de un sobrenadante de plasma rico en plaquetas que contiene factores de crecimiento liberados. El plasma rico en plaquetas o de un sobrenadante de plasma rico en
30 plaquetas puede ser de muy diversos tipos: un gel de plasma rico en factores de crecimiento obtenido según la técnica de WO0044314A1, WO2010130851A2 u otra técnica aplicable; un sobrenadante obtenido como el componente líquido que aparece tras producir la coagulación y posterior retracción de un plasma sanguíneo rico en plaquetas, pudiendo dicho sobrenadante haber sido obtenido por ejemplo según la técnica detallada en la patente
35 ES2221770B2; o, en general, cualquier plasma rico en plaquetas.

Posteriormente, el procedimiento según la invención comprende el paso de aplicar un tratamiento térmico al plasma rico en plaquetas o al sobrenadante de plasma rico en plaquetas, durante el cual se aumenta la temperatura del mismo. El tratamiento térmico
40 permite eliminar el complemento y reducir la presencia de algunas de las inmunoglobulinas más frecuentes en el plasma o el sobrenadante que juegan un papel crítico en reacciones cruzadas desde un punto de vista inmunológico. Dicha eliminación o reducción considerable del complemento presente en el plasma o el sobrenadante constituye una importantísima

ventaja para la aplicabilidad del mismo a enfermedades del sistema inmune.

Adicionalmente, el procedimiento según la invención comprende una fase en la que se liofiliza el plasma o el sobrenadante para conseguir una composición final prácticamente carente de humedad.

De acuerdo con la invención, los pasos de aplicar un tratamiento térmico y de liofilizar se realizan en orden indistinto, es decir, pueden realizarse en cualquier orden.

Adicionalmente, el procedimiento según la invención puede comprender el paso de filtrar el plasma rico en plaquetas o al sobrenadante de plasma rico en plaquetas. Dicho paso se realiza antes de la liofilización (no necesariamente inmediatamente antes, ya que en caso de aplicarse el tratamiento térmico antes de efectuar la liofilización, el filtrado se realiza antes del tratamiento térmico).

El procedimiento de obtención de una composición a partir de un plasma rico en plaquetas o de un sobrenadante de plasma rico en plaquetas autólogo permite conseguir una composición final seca que presenta múltiples ventajas sobre el plasma o sobrenadante húmedo convencional. Una ventaja importante es que una composición seca es evidentemente más fácil de manejar y transportar que un compuesto húmedo (líquido, con consistencia de gel más o menos viscoso o con otra consistencia). Asimismo, al no contener agua, la composición seca puede mantenerse a temperatura ambiente e incluso conservarse de forma ilimitada, constituyendo un producto de larga estabilidad (gracias a lo cual puede aplazarse su uso y no ha de ser utilizado necesariamente de forma inmediata, una vez preparado). Adicionalmente, al no contener agua, la composición seca no tiene riesgo de sufrir contaminaciones. Otra ventaja de la composición seca es que puede recuperar rápidamente su estado original; para ello basta con re-suspender la misma en cualquier solvente isotónico que se emplee rutinariamente (por ejemplo agua), proceso que puede efectuarse in situ.

Una ventaja adicional de la composición seca según la invención es que, tal como se ha comprobado, una vez re-suspendida dicha composición para recuperar un estado húmedo y poder ser administrada, la composición re-suspendida conserva las propiedades biológicas que caracterizaban al plasma o sobrenadante húmedo antes de realizar el procedimiento según la invención. Es decir, la composición re-suspendida sigue conservando una concentración análoga de factores de crecimiento con actividad biológica; además, los efectos inducidos por la composición seca una vez re-suspendida en la proliferación celular, la migración y quimiotaxis celular y en la síntesis auto y paracrina de factores de crecimiento son idénticos a los del plasma o el sobrenadante húmedo. Esta conservación de propiedades biológicas se consigue gracias, entre otros motivos, a la adecuada temperatura a que es sometido el producto durante la ejecución del procedimiento según la invención. Por otra parte, debido a la baja temperatura utilizada en las diferentes fases del procedimiento, la pérdida de constituyentes volátiles comprendidos en el plasma o

sobrenadante que pudiera producirse durante la ejecución del procedimiento es mínima. Las bajas temperaturas también permiten mantener un riesgo muy bajo de contaminación microbiana y que la preparación no sufra alteraciones desde un punto de vista enzimático (es ventajoso que las preparaciones que contienen enzimas, como es el caso del plasma o sobrenadante de la presente invención, se mantengan tratadas a bajas temperaturas para que no se vean dañadas).

Otro efecto extremadamente beneficioso de la invención es que la composición seca y, por lo tanto, la composición final re-suspendida son composiciones libres o con una presencia reducida de complemento, lo cual convierte la composición final re-suspendida en una composición particularmente óptima para tratar algunas enfermedades de naturaleza autoinmune.

Todo lo anterior permite que la composición seca pueda ser utilizada para tratamientos no inmediatos, por ejemplo para tratar de forma regular patologías crónicas y, particularmente, patologías crónicas de naturaleza autoinmune. Así, si la composición seca obtenida según la invención se almacena por ejemplo en dosis, el tratamiento crónico con la misma se convierte en un proceso muy sencillo: el paciente crónico puede llevar su dosis (por ejemplo en un envase) a cualquier lugar sin complicaciones ni temores; cuando desea administrarse la dosis, basta con que humedezca (re-suspenda) la misma y, una vez recuperada la consistencia húmeda original (líquida u otra), efectúe la aplicación de la forma aplicable.

Todas estas particularidades y ventajas asociadas a la composición obtenida mediante el procedimiento según la invención pueden resumirse en: una estabilidad óptima, una especial indicación para algunas patologías de naturaleza autoinmune; una solubilidad fácil, rápida y completa; una conservación ilimitada; una buena protección contra las influencias externas nocivas y una rápida disponibilidad de uso.

Es asimismo objeto de la invención una composición que contiene factores de crecimiento, obtenible por medio del procedimiento según la invención. Dicha composición presenta todas las ventajas descritas con anterioridad.

Descripción breve de las figuras

Los detalles de la invención se aprecian en las figuras que se acompañan, no pretendiendo éstas ser limitativas del alcance de la invención:

- La Figura 1 muestra una gráfica del número de keratocitos (HCK) por centímetro cuadrado en tres córneas tratadas con sobrenadante de plasma líquido convencional, no sometido a tratamiento térmico, y con sobrenadante tratado térmicamente según la invención.
- La Figura 2 muestra una gráfica de los niveles de PDGF-AB en los sobrenadantes

de tres donantes, antes y después de ser tratados térmicamente según la invención.

- La Figura 3 muestra los niveles del factor D del complemento en los sobrenadantes de tres donantes, antes y después de realizar sobre dichos sobrenadantes un tratamiento térmico de acuerdo con la invención.
- La Figura 4 muestra una gráfica del número de fibroblastos (HConF) por centímetro cuadrado en tres córneas tratadas con sobrenadante de plasma líquido convencional, no sometido a tratamiento térmico, y con sobrenadante tratado térmicamente según la invención.
- La Figura 5 muestra una gráfica de la concentración media de factores de crecimiento PDGF-AB y TGF- β 1 en los sobrenadantes de tres donantes sin liofilizar y liofilizados según la invención.
- La Figura 6 muestra una gráfica de la concentración media de factores de crecimiento VEGF y EGF en los sobrenadantes de tres donantes sin liofilizar y liofilizados según la invención.
- La Figura 7 muestra una gráfica de la cantidad de fibroblastos conjuntivales (HConF) contenida por centímetro cuadrado en tres sobrenadantes líquidos, antes y después de realizar un filtrado de los sobrenadantes.
- La Figura 8 muestra una gráfica de la concentración media del factor de crecimiento TGF- β 1 en sobrenadantes filtrados y sin filtrar.
- La Figura 9 muestra una gráfica de la concentración media del factor de crecimiento IGF-I en sobrenadantes filtrados y sin filtrar.
- La Figura 10 muestra una gráfica del número de células primarias procedentes de keratocitos corneales humanos (HCK) tras 72 horas de tratamiento con un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) convencional y con un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) filtrado, tratado térmicamente y liofilizado según la invención.
- La Figura 11 muestra una gráfica del número de células primarias procedentes de fibroblastos conjuntivales humanos (HConF) tras 72 horas de tratamiento con un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) convencional y con un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) filtrado, tratado térmicamente y liofilizado según la invención, el cual posteriormente ha sido re-suspendido.
- La Figura 12 muestra una gráfica del número de células migradas en un cultivo de células primarias de keratocitos corneales humanos (HCK) tras el tratamiento con un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) convencional y con un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) filtrado, tratado térmicamente y liofilizado según la invención, el cual posteriormente ha sido re-suspendido.
- La Figura 13 muestra una gráfica del número de células migradas en un cultivo de células primarias de fibroblastos conjuntivales humanos (HConF) tras el tratamiento con un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) convencional y con un sobrenadante de plasma rico en factores de

crecimiento (PRGF) filtrado, tratado térmicamente y liofilizado según la invención, el cual posteriormente ha sido re-suspendido.

- La Figura 14 muestra una gráfica de la concentración de células en un cultivo de fibroblastos conjuntivales (HConF), utilizándose tres medios de cultivo diferentes: un plasma rico en plaquetas activado y no tratado térmicamente, un plasma rico en plaquetas tratado térmicamente de acuerdo con la invención pero sin encontrarse activado inicialmente y un plasma rico en plaquetas activado previamente y después tratado térmicamente, de acuerdo con la invención.
- La Figura 15 muestra una gráfica de la concentración de células en un cultivo de keratocitos corneales (HCK), utilizándose los mismos medios de cultivo que en el caso de la figura anterior.
- La Figura 16 muestra gráficas de concentración de diferentes factores de crecimiento en las tres composiciones que servían como medio de cultivo en los casos de las dos figuras anteriores.

Descripción detallada de la invención

Es objeto de la invención un procedimiento de obtención de una composición que contiene factores de crecimiento, con la presencia o no de componentes celulares hemáticos (plaquetas, eritrocitos y glóbulos blancos), que comprende las siguientes fases:

- a) Disponer de un plasma rico en plaquetas o de un sobrenadante de plasma rico en plaquetas y que contiene factores de crecimiento liberados, preparado según cualquier procedimiento de preparación aplicable. Un plasma o sobrenadante rico en plaquetas con factores de crecimiento liberados es aquel en el que, utilizando el agente que fuere (cloruro cálcico, trombina, sales de calcio, otros agentes que contengan iones divalente o combinaciones de los mismos, o cualquier otro sistema que active la coagulación), se ha liberado el contenido de factores de crecimiento de las plaquetas y se ha activado la cascada de coagulación, logrando un producto rico en proteínas y factores de crecimiento tanto plasmáticos como plaquetarios. El plasma o sobrenadante puede ser de muy diversos tipos: un gel de plasma rico en factores de crecimiento obtenido según la técnica de WO0044314A1, WO2010130851A2 u otra técnica aplicable; un sobrenadante obtenido como el componente líquido que aparece tras producir la coagulación y posterior retracción de un plasma sanguíneo, pudiendo dicho sobrenadante haber sido obtenido por ejemplo según la técnica detallada en la patente ES2221770B2; o, en general, cualquier plasma o sobrenadante rico en plaquetas y que haya sido obtenido por cualquier procedimiento.
- b) Aplicar un tratamiento térmico al plasma o sobrenadante, de manera que se consigue eliminar el complemento y reducir la presencia de algunas de las inmunoglobulinas más frecuentes del plasma o sobrenadante que juegan un papel crítico en reacciones cruzadas desde un punto de vista inmunológico. Dicha

eliminación o reducción considerable del complemento presente en el plasma o sobrenadante constituye una importantísima ventaja para la aplicabilidad del mismo a enfermedades del sistema inmune. Así, se sabe que la presencia del sistema de complemento de un compuesto sanguíneo pudiera ser perjudicial ya que está implicado en la sobre-estimulación del sistema inmune y en muchos casos en la propia sintomatología de la enfermedad que se pretende tratar con el compuesto sanguíneo. El complemento del plasma está relacionado con diversas alteraciones tales como posibles reacciones adversas de enfermedades autoinmunes (Lupus eritematoso, artritis, etc.) mediadas por complemento (vía clásica del complemento) o reacciones adversas derivadas de enfermedades inflamatorias crónicas mediadas por complemento. Además, parte de los factores del complemento potencian la inflamación y la fagocitosis y actúan produciendo la lisis de células y microorganismos. Por su parte, las inmunoglobulinas (Ig) y más concretamente la IgG es la más presente en el compuesto sanguíneo y entre sus principales funciones biológicas destacan la fijación del complemento, la unión a receptores para Fc en células fagocíticas al opsonizar partículas durante la fagocitosis y la unión a receptores en células NK durante la citotoxicidad mediada por anticuerpos. Por lo tanto, la eliminación o reducción considerable del complemento presente en el plasma o sobrenadante constituye una importantísima ventaja para la aplicabilidad del mismo a enfermedades del sistema inmune. Gracias al tratamiento térmico se puede lograr, entonces, una composición final adaptada a las necesidades de pacientes con problemas del sistema inmune. Por su parte, la reducción total o parcial de las inmunoglobulinas resulta importante en pacientes con enfermedades auto-inmunes ya que diferentes IgG participan en algunos de los procesos agudos de rechazo y por lo tanto reducir su presencia en la formulación ayuda a tratar distintos tejidos en estos pacientes sin riesgos de rechazo o reacción inmune aguda alguna.

- c) Liofilizar el plasma o el sobrenadante, para eliminar casi en su totalidad el contenido en agua del mismo y permitir que el plasma o el sobrenadante pase a un estado de no humedad que permite su conservación durante largos periodos de tiempo.

El hecho de que el plasma o sobrenadante inicial esté activado de forma previa al tratamiento térmico, es decir, contenga factores de crecimiento liberados de forma previa al tratamiento térmico, presenta efectos sorprendentes. Por una parte, el plasma o sobrenadante disponible tras la activación y el posterior tratamiento térmico mantiene prácticamente intacta su capacidad de agregarse y de formar el coágulo de fibrina, y su capacidad para liberar factores de su contenido granular. Este mantenimiento de la funcionalidad se puede comprobar en los datos que se presentan en las Figuras 14, 15 y 16. La Figura 14 muestra una gráfica de la proliferación de fibroblastos conjuntivales (HConF) en un cultivo celular de dichas células HConF, utilizándose tres medios de cultivo diferentes: un plasma rico en plaquetas activado y no tratado térmicamente (indicado como "PRGF"), un

plasma rico en plaquetas tratado térmicamente de acuerdo con la invención pero sin encontrarse activado inicialmente sino siendo activado de forma posterior al tratamiento térmico ("PostAct") y un plasma rico en plaquetas activado previamente y después tratado térmicamente de acuerdo con la invención ("PriorAct"). Como puede observarse en la figura, la proliferación de células en el cultivo es prácticamente igual en el caso de la presente invención ("PriorAct") que en el caso de realizarse el cultivo con el plasma activado y no tratado térmicamente ("PRGF"). En cambio, la proliferación celular del cultivo es prácticamente nula en caso de utilizarse como medio de cultivo un plasma rico en plaquetas tratado térmicamente y posteriormente activado ("PostAct"). La Figura 15 muestra una gráfica similar, habiéndose realizado en este caso cultivos de keratocitos corneales (HCK). La Figura 16 muestra, a su vez, la concentración de diferentes factores de crecimiento presentes en los diferentes compuestos citados anteriormente, obtenida tras un análisis mediante ELISAs. Como puede observarse, la concentración de los factores de crecimiento es prácticamente igual en el plasma rico en plaquetas activado previamente y después tratado térmicamente de acuerdo con la invención ("PriorAct") que en el plasma rico en factores de crecimiento convencional, activado y no tratado térmicamente ("PRGF"). En cambio, en el plasma rico en plaquetas tratado térmicamente de acuerdo con la invención y activado con posterioridad ("PostAct"), las concentraciones de factores de crecimiento son, globalmente, peores.

La liofilización preferentemente se realiza sin la adición de coadyuvantes (azúcares tales como la trehalosa, componentes químicos, etc.). Los coadyuvantes son necesarios para liofilizar muchas sustancias, pero se ha comprobado que el plasma y el sobrenadante consiguen liofilizarse correctamente sin ellos y que realizando la liofilización sin añadir ningún coadyuvante se consigue una composición seca final (y por lo tanto una composición re-suspendida para aplicar al paciente) más biocompatible. Por ejemplo, algunos estudios realizados han demostrado que algunos coadyuvantes como la trehalosa actúan negativamente sobre la proliferación celular.

El procedimiento presenta la particularidad, además, de que en principio los pasos de aplicar un tratamiento térmico y de liofilizar se pueden realizar en orden indistinto. Sin embargo, se considera preferente el orden según el cual el paso de aplicar un tratamiento térmico se realiza antes del paso de liofilizar el plasma o sobrenadante. Este orden preferente obedece a que el producto, al ser tratado térmicamente con anterioridad, contendrá todas las propiedades y potencialidad que se pretenden con este proceso (reducción del complemento e IgG) antes de ser liofilizado. Hay que tener en cuenta que la liofilización se realiza con el ánimo de mejorar la conservación y mantenimiento del preparado por lo tanto es preferente que constituya la etapa final y no la inicial. Por lo tanto, en resumen, primero se pretende optimizar el producto y posteriormente desarrollar su proceso de conservación y mantenimiento.

El tratamiento térmico puede ser cualquier tratamiento que permita elevar convenientemente la temperatura del plasma o sobrenadante, siendo preferente que se

someta al plasma o sobrenadante a una temperatura superior a 37°C durante un tiempo igual o superior a 1 minuto (por ejemplo introduciendo el plasma o sobrenadante en un baño de agua a esta temperatura y durante este tiempo). Dado que la temperatura de 37°C es la temperatura corporal y la temperatura a la cual el complemento y las inmunoglobulinas ejercen su máxima actividad biológica, es preferente de acuerdo con la invención calentar el plasma o sobrenadante a una temperatura superior a dichos 37°C para conseguir eliminar alguno de los citados componentes.

De forma especialmente ventajosa, el plasma o sobrenadante se somete a una temperatura de entre 50 y 60°C (preferentemente a 56°C), ya que a esa temperatura se consigue optimizar la degradación de componentes del complemento y maximizar la protección de las proteínas y factores de crecimiento que componen el producto. Así, se ha comprobado que temperaturas inferiores a este rango no garantizan que durante la incubación se elimine del plasma o sobrenadante el complemento. Por otro lado, incubar con temperaturas superiores a 60-65°C produciría la desnaturalización de los factores de crecimiento y de las proteínas contenidas en el plasma o sobrenadante. Además, preferentemente se somete el plasma o sobrenadante a dicha temperatura durante entre 20 y 70 minutos (preferentemente entre 30 y 60 minutos) ya que a esos tiempos nuevamente se consigue optimizar la degradación de componentes del complemento y maximizar la protección de las proteínas y factores de crecimiento que componen el producto.

La fase de liofilización comprende preferentemente los pasos de:

- congelar el plasma o sobrenadante a una temperatura menor de 0°C;
- realizar un secado primario del plasma o sobrenadante a una temperatura menor o igual a 0°C y a alto vacío, durante un tiempo igual o superior a 1 minuto, de manera que la mayor parte del agua libre contenida en el plasma o sobrenadante pasa a vapor;
- opcionalmente, realizar un secado secundario del plasma o sobrenadante a una temperatura mayor o igual a 0°C y a alto vacío, bajo vacío o sin vacío, durante un tiempo igual o superior a 1 minuto, de manera que permite finalmente eliminar las últimas trazas de vapor de agua, evaporando el agua no congelada contenida en el plasma o sobrenadante hasta conseguir una humedad final de menos del 1 %;
- opcionalmente, realizar un secado terciario del plasma o sobrenadante a una temperatura mayor o igual a 0°C y a alto vacío, bajo vacío o sin vacío, durante un tiempo igual o superior a 1 minuto, de manera que se elimine la humedad residual que haya quedado en el producto mediante evaporación y reducir su contenido de humedad, lo que mejorará la estabilidad del producto final.

De forma especialmente ventajosa, el plasma o sobrenadante se congela a una

13

temperatura de entre -60 y -40°C (preferentemente a -50°C) durante un tiempo superior a 1 hora (preferentemente un tiempo superior a 2 horas) ya que fuera de este rango, especialmente si las temperaturas de congelación son inferiores, aumenta el riesgo de que el plasma o sobrenadante pierda sus propiedades biológicas como consecuencia de la congelación. Además, es conveniente congelar durante el tiempo mínimo de 1 hora para asegurar que el compuesto sanguíneo se congela de forma homogénea (la homogeneidad garantiza la estabilidad de la liofilización y que no se alteren las propiedades biológicas del producto)

A su vez, el secado primario se realiza de forma especialmente ventajosa a entre -60 y -40°C y entre 0,05 y 0,15 mBar (preferentemente a -50°C y 0,1 mBar). La utilización de rangos bajos de temperatura se realiza para asegurar que el producto está totalmente congelado durante el proceso de sublimación, así como para preservar las propiedades físicas, químicas, y biológicas del producto inicial, evitando la posible desnaturalización de proteínas del producto liofilizado. La duración concreta del proceso depende de la cantidad de producto a liofilizar y ha sido establecida para asegurar la total sublimación del hielo necesaria para un adecuado secado.

En cuanto al secado secundario, éste se realiza de manera especialmente ventajosa a entre +15 y +25°C y entre 0,05 y 0,15 mBar (preferentemente a +20°C y 0,1 mBar) ya que estas condiciones permiten eliminar la humedad residual que haya quedado en el producto mediante evaporación y reducir su contenido de humedad por debajo del 1% con objeto de mejorar la estabilidad del producto final.

Finalmente, el secado terciario se realiza de manera especialmente ventajosa a entre +15 y +25°C y vacío total (preferentemente a +20°C y vacío total), logrando eliminar finalmente toda humedad, lo que proporcionará las óptimas características de estabilidad y uniformidad del producto final.

El procedimiento según la invención puede comprender, además, el paso adicional de filtrar el plasma o sobrenadante para eliminar o evitar la aparición de componentes de alto peso molecular, agregados plaquetarios o restos de fibrina que pudieran alterar la uniformidad del congelado y la estabilidad del liofilizado, lo que repercutiría también negativamente en la re-suspensión de la composición seca (téngase en cuenta que la velocidad de disolución de un liofilizado es inversamente proporcional al tamaño de las partículas que lo constituyen y que partículas gruesas comprendidas en la composición seca podrían producir que la disolución de la composición seca fuera más lenta o simplemente nula). En caso de realizarse, dicho paso adicional de filtrar el plasma o sobrenadante se ejecuta antes de la liofilización, aunque no necesariamente inmediatamente antes. El paso de filtrar el plasma o sobrenadante podrá no ser necesario, por ejemplo, cuando se disponga al comienzo del procedimiento de un plasma o sobrenadante ya filtrado.

EJEMPLO DE PROCEDIMIENTO

A continuación se describe un ejemplo de procedimiento de preparación de una composición final re-suspendida a partir de una composición seca obtenida a su vez según el procedimiento de la invención y a partir de un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento.

En primer lugar, se prepara un plasma rico en factores de crecimiento a partir de sangre extraída de un paciente, centrifugando en primer lugar la misma para separar la sangre en diferentes fracciones, como es conocido en el estado de la técnica. Entonces, se extrae la fracción de plasma mediante un dispositivo PTD (por sus siglas en inglés "Plasma Transfer Device") a un tubo de fraccionamiento de 9 ml y se procede a activar el plasma; la activación se realiza estimando el volumen de plasma contenido en el tubo de fraccionamiento y añadiendo posteriormente 50 µl de PRGF® Activator (un activador basado en cloruro de calcio) por cada mililitro de plasma. La activación del plasma equivale a la liberación de factores de crecimiento por parte de las plaquetas contenidas en el plasma.

En segundo lugar, se obtiene el sobrenadante a partir del plasma rico en factores de crecimiento. Para ello, el plasma rico en factores de crecimiento, ya activado, se incuba en bloque de calor a 37 °C entre 1 hora y hora y media hasta la completa retracción del coágulo de fibrina. Posteriormente, el tubo de fraccionamiento se centrifuga a 1000 g durante 10 minutos con dos finalidades principales: precipitar el coágulo de fibrina formado, y extraer lo máximo posible el volumen de sobrenadante que podría quedar retenido en el interior del coágulo. Entonces, los tubos centrifugados se introducen en una cabina de flujo laminar, donde pueden ser abiertos para mantener la completa esterilidad de la muestra. Con una jeringuilla de 10 ml a la que se ha acoplado una aguja intramuscular roma, se recoge todo el sobrenadante liberado. Posteriormente, se retira la aguja roma de la jeringuilla y se acopla un filtro de PVDF de 0,22 µm, y se procede a la filtración del sobrenadante. Durante el proceso de filtración, la jeringa con el filtro se conecta a los dispensadores multidosis, administrando 1 ml de sobrenadante filtrado por dispositivo. Finalmente, los dispositivos se cierran herméticamente.

A continuación se ejecuta el procedimiento según la invención, para obtener una composición final seca a partir del sobrenadante líquido filtrado. Así, los dispositivos multidosis, con el sobrenadante filtrado en su interior, son tratados térmicamente, introduciéndose en un baño de agua precalentado previamente a 56 °C y durante entre 30 a 60 minutos. Tras este periodo, se introducen inmediatamente en un liofilizador previamente enfriado a -50°C para proceder a su congelación donde se mantendrán en un rango de tiempo de entre 2 y 8 horas según el volumen de sobrenadante hasta que las muestras se encuentren congeladas de forma homogénea. Posteriormente, se realiza un secado primario a -50°C y 0,1 mBar durante como máximo 24h. Seguidamente, se realiza un secado secundario a +20°C y 0,1 mBar durante máximo 6h y finalmente se realiza un secado terciario a +20°C y vacío total durante como máximo 12h. El producto resultante es un polvo uniforme y homogéneo que aparece ligeramente compactado y que se puede re-suspender

(es decir, disolver volviendo a su consistencia de sobrenadante) tras contacto con una solución acuosa de manera rápida y sencilla.

La composición final seca debe ser re-suspendida para poder ser aplicada. Para ello, el médico o el paciente toma una dosis de composición final seca y la sumerge en un volumen determinado de agua destilada estéril dentro de un contenedor, agitando posteriormente el contenedor hasta conseguir la completa disolución la composición seca y la obtención de una composición final nuevamente húmeda o líquida que conserva las propiedades biológicas del sobrenadante húmedo inicial, previo al tratamiento térmico y la liofilización. Dicha composición final puede entonces ser directamente aplicada al paciente, por ejemplo como colirio en los ojos.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

A continuación se describen los resultados de tres estudios experimentales realizados sobre el procedimiento y la composición según la invención, efectuado y obtenida respectivamente a partir de un sobrenadante de plasma sanguíneo rico en factores de crecimiento. Se detallan asimismo las conclusiones técnicas alcanzadas a partir de dichos resultados.

1. Influencia de la temperatura del tratamiento térmico sobre el efecto biológico y los niveles de factores de crecimiento del sobrenadante seco final

Como se ha mencionado, el tratamiento térmico realizado por la presente invención a temperaturas adecuadas permite conservar las propiedades biológicas del sobrenadante, es decir, que la composición seca final presente sustancialmente las mismas propiedades que el sobrenadante líquido inicial.

Pues bien, tras realizarse una experimentación sobre cultivos celulares de la superficie ocular, se ha comprobado que el proceso de tratamiento térmico (baño de agua a 56°C durante 30 minutos) no afecta a su efecto biológico sobre la proliferación de keratocitos corneales (HCK) y fibroblastos conjuntivales (HConF), ni de células epiteliales corneales. La multiplicación de dichas células en cultivo in vitro es similar en el caso del sobrenadante no tratado térmicamente. Así, en la Figura 1, que muestra el número keratocitos (HCK) por centímetro cuadrado en tres córneas tratadas con sobrenadante de plasma líquido convencional, no sometido a tratamiento térmico, y con sobrenadante tratado térmicamente según la invención, se puede observar que la proliferación de keratocitos corneales es prácticamente la misma en respuesta al sobrenadante de plasma líquido convencional, no sometido a tratamiento térmico que al sobrenadante tratado térmicamente según la invención. Lo mismo ocurre en el caso de los fibroblastos conjuntivales y las células epiteliales corneales estudiadas.

También se han analizado los niveles de factores de crecimiento presentes en los

16

sobrenadantes líquidos convencionales y en sobrenadantes tratados térmicamente según la invención. Se ha comprobado que, en el caso de factores plaquetarios como el PDGF-AB o el TGF- β 1, el tratamiento térmico no afecta a sus niveles medidos en el sobrenadante final. Por otra parte, se ha comprobado que factores de crecimiento plasmáticos analizados como el IGF-I no varían su concentración por efecto de la temperatura mientras que otros agentes como las inmunoglobulinas G y M (IgG e IgM) presentan un 9% y un 13% de disminución respectivamente en sus valores. También se ha comprobado que el factor D del complemento desaparece totalmente cuando el sobrenadante es sometido a tratamiento térmico. Se pueden observar ejemplos de estos resultados en las siguientes figuras. Así, la Figura 2 muestra los niveles de PDGF-AB en los sobrenadantes de tres donantes, antes y después de realizar sobre dichos sobrenadantes un tratamiento térmico de acuerdo con la invención. Como puede observarse, dichos niveles se mantienen prácticamente constantes (en el primer sobrenadante descienden ligeramente, en el segundo se mantienen constantes y en el tercero aumentan ligeramente). Por otro lado, la Figura 3 muestra los niveles del factor D del complemento en los sobrenadantes de tres donantes, antes y después de realizar sobre dichos sobrenadantes un tratamiento térmico de acuerdo con la invención. Como puede observarse, en los sobrenadantes líquidos iniciales existe una presencia de factor D mientras que en los sobrenadantes tratados térmicamente no se detecta presencia alguna del mismo.

2. Influencia del proceso de liofilización sobre el efecto biológico y los niveles de factores de crecimiento del sobrenadante

Como se ha mencionado en esta descripción, el proceso de liofilización realizado por la presente invención permite conservar las propiedades biológicas del sobrenadante, es decir, que la composición seca final presente sustancialmente las mismas propiedades que el sobrenadante líquido inicial.

Durante la experimentación, se ha analizado el efecto del proceso de liofilización del sobrenadante de plasma sobre la proliferación de fibroblastos conjuntivales y keratocitos. Los resultados del análisis muestran que dicho tratamiento no afecta al crecimiento de dichos tipos celulares en ninguno de los tres sobrenadantes (de respectivos tres donantes) estudiados. Por ejemplo, en la Figura 4, que muestra el número de fibroblastos (HConF) por centímetro cuadrado en tres córneas tratadas con sobrenadante de plasma líquido convencional, no sometido a tratamiento térmico, y con sobrenadante tratado térmicamente según la invención, se observa que la presencia de fibroblastos se mantiene relativamente constante (en el primer sobrenadante descienden ligeramente, en el segundo aumentan ligeramente y en el tercero descienden ligeramente).

También se han analizado los niveles de factores de crecimiento presentes en los sobrenadantes líquidos convencionales y en sobrenadantes liofilizados según la invención. Se ha comprobado que los niveles de factores de crecimiento analizados no varían tras el proceso de liofilización, tanto el caso de los factores plaquetarios como TGF- β 1, PDGF-AB,

VEGF y EGF como en caso de factores plasmáticos como IGF-I o factor D del complemento. A modo de ejemplo, la Figura 5 muestra la concentración media de factores de crecimiento PDGF-AB y TGF- β 1 en los sobrenadantes de tres donantes sin liofilizar y sin tratar térmicamente y liofilizados y tratados térmicamente según la invención; en ella se observa cómo la concentración de los primeros aumenta ligeramente, mientras que la concentración de los segundos disminuye ligeramente, siendo la concentración de ambos en el producto final (sobrenadante liofilizado) en cualquier caso elevada. En la Figura 6 se muestran, análogamente, la concentración de factores de crecimiento VEGF y EGF en los sobrenadantes de tres donantes sin liofilizar y sin tratar térmicamente y liofilizados y tratados térmicamente según la invención; en ella se observa cómo la concentración de ambos disminuye ligeramente, aunque se mantiene en valores elevados.

3. Influencia del proceso de filtración sobre el efecto biológico y los niveles de factores de crecimiento del sobrenadante

Se ha estudiado también si la filtración del sobrenadante pudiera conllevar algún efecto biológico indeseado en el mismo, o si por el contrario no afecta a sus propiedades biológicas.

Pues bien, los resultados obtenidos de los estudios in vitro muestran que el proceso de filtración del sobrenadante no modifica el efecto biológico que ejerce sobre la proliferación de fibroblastos conjuntivales, keratocitos y epiteliales corneales.

Por ejemplo, la Figura 7 muestra la cantidad de fibroblastos conjuntivales (HConF) contenida por centímetro cuadrado en tres sobrenadantes líquidos, antes y después de realizar un filtrado de los sobrenadantes. Como puede observarse, la proliferación de fibroblastos conjuntivales en el sobrenadante filtrado es similar a la proliferación en el sobrenadante no filtrado.

Por su parte, los niveles de factores de crecimiento medidos en los sobrenadantes filtrados y no filtrados son muy similares para los tres sobrenadantes analizados (provenientes, como en todos los casos, de tres donantes diferentes). La Figura 8 muestra las concentraciones medias del factor de crecimiento TGF- β 1 en los sobrenadantes filtrados y sin filtrar, pudiendo comprobarse que dichas concentraciones no varían de forma importante por el hecho de filtrarse los sobrenadantes. Este hecho no se produce solamente en el caso de los factores de crecimiento contenidos en los gránulos alfa de las plaquetas (por ejemplo TGF- β 1, PDGF-AB, VEGF, EGF o TSP-1), sino que también se produce en el caso de factores de crecimiento presentes en el plasma como IGF-I (factor de crecimiento derivado de insulina tipo I) o la endostatina. La Figura 9 muestra, en este sentido, la concentración media de factor de crecimiento IGF-I en el sobrenadante de tres donantes, antes y después de realizar un filtrado. Como puede observarse, el nivel de IGF-I se mantiene prácticamente constante en los tres casos.

4. Influencia del procedimiento de la invención, comprendiendo los pasos de filtrar, tratar térmicamente y liofilizar el sobrenadante, sobre diversas propiedades del mismo

La Figura 10 muestra una gráfica de la proliferación de células primarias procedentes de keratocitos corneales humanos (HCK) tras 72 horas de tratamiento con un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) convencional y con un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) filtrado, tratado térmicamente y liofilizado según la invención, el cual posteriormente ha sido re-suspendido. Como puede observarse, el número de células primarias es ligeramente mayor en el caso del sobrenadante obtenido según el procedimiento de la presente invención.

La Figura 11 muestra una gráfica de la proliferación de células primarias procedentes de fibroblastos conjuntivales humanos (HConF) tras 72 horas de tratamiento con un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) convencional y con un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) filtrado, tratado térmicamente y liofilizado según la invención, el cual posteriormente ha sido re-suspendido. Al igual que en la gráfica anterior, el número de células primarias es ligeramente mayor en el caso del sobrenadante obtenido según el procedimiento de la presente invención.

La Figura 12 muestra el efecto de la aplicación de un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) convencional y de un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) filtrado, tratado térmicamente y liofilizado según la invención, el cual posteriormente ha sido re-suspendido, sobre la migración del cultivo de células primarias de keratocitos corneales humanos (HCK). Como puede observarse, el número de células primarias es sólo ligeramente mayor en el caso de utilizarse como medio de cultivo un sobrenadante convencional.

La Figura 13 muestra el efecto de la aplicación de un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) convencional y de un sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) filtrado, tratado térmicamente y liofilizado según la invención, el cual posteriormente ha sido re-suspendido, sobre la migración del cultivo de células primarias de fibroblastos conjuntivales humanos (HConF) tras realizar una incubación de células durante 24 horas. El comportamiento en ambos casos es, como puede comprobarse, muy similar, aunque es ligeramente mejor en el caso del sobrenadante obtenido según la invención.

En resumen, tras analizarse todas las gráficas con resultados experimentales, puede concluirse que el comportamiento y las propiedades la composición final re-suspendida son muy similares (con ligeras variaciones irrelevantes) a los del sobrenadante de aplicación inmediata convencional. Por lo tanto, se puede concluir que el hecho de filtrar, tratar térmicamente y liofilizar un sobrenadante húmedo para obtener un producto seco re-suspendible no afecta a las propiedades del producto y, por otra parte, proporciona las numerosas ventajas enumeradas en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de una composición que contiene factores de crecimiento, que comprende las fases de:

5

10

- a) disponer de un plasma rico en plaquetas o de un sobrenadante de plasma rico en plaquetas que contiene factores de crecimiento liberados,
- b) aplicar un tratamiento térmico al plasma rico en plaquetas o al sobrenadante de plasma rico en plaquetas, durante el cual se aumenta la temperatura del mismo,
- c) liofilizar dicho plasma rico en plaquetas o sobrenadante de plasma rico en plaquetas,

donde los pasos de aplicar un tratamiento térmico y de liofilizar se realizan en orden indistinto.

15

2. Procedimiento, según la reivindicación 1, que se caracteriza por que la liofilización se realiza sin la adición de coadyuvantes.

20

3. Procedimiento, según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el paso de aplicar un tratamiento térmico se realiza antes del paso de liofilizar.

25

4. Procedimiento, según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el paso de aplicar un tratamiento térmico comprende el paso de:

- someter al plasma rico en plaquetas o al sobrenadante de plasma rico en plaquetas a una temperatura superior a 37°C durante un tiempo igual o superior a 1 minuto.

30

5. Procedimiento, según la reivindicación 4, que se caracteriza por que:

- el plasma rico en plaquetas o el sobrenadante de plasma rico en plaquetas se somete a una temperatura entre 50 y 60°C durante un tiempo entre 20 y 70 minutos.

35

6. Procedimiento, según la reivindicación 5, que se caracteriza por que:

- el plasma rico en plaquetas o el sobrenadante de plasma rico en plaquetas se somete a una temperatura de 56°C durante un tiempo entre 30 y 60 minutos.

40

7. Procedimiento, según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el paso de liofilizar comprende los pasos de:

- congelar el plasma rico en plaquetas o el sobrenadante de plasma rico en

plaquetas a una temperatura menor que 0°C,

- realizar un secado primario del plasma rico en plaquetas o del sobrenadante de plasma rico en plaquetas a una temperatura menor o igual a 0°C y a alto vacío, durante un tiempo igual o superior a 1 minuto.

5

8. Procedimiento, según la reivindicación 7, que se caracteriza por que:

- la congelación se realiza a una temperatura entre -60 y -40°C durante un tiempo superior a 1 hora,
- el secado primario se realiza a una temperatura entre -60 y -40°C y a una presión entre 0,05 y 0,15 mBar.

10

9. Procedimiento, según la reivindicación 8, que se caracteriza por que:

- la congelación se realiza a una temperatura de -50°C durante un tiempo superior a 2 horas,
- el secado primario se realiza a una temperatura de -50°C y a una presión de 0,1 mBar.

15

10. Procedimiento, según la reivindicación 7, que se caracteriza por que el paso de liofilizar comprende el paso adicional de:

- realizar un secado secundario del plasma rico en plaquetas o del sobrenadante de plasma rico en plaquetas a una temperatura mayor o igual a 0°C y a alto vacío, durante un tiempo igual o superior a 1 minuto.

25

11. Procedimiento, según la reivindicación 10, que se caracteriza por que:

- el secado secundario se realiza a una temperatura entre +15 y +25°C y a una presión entre 0,05 y 0,15 mBar.

30

12. Procedimiento, según la reivindicación 11, que se caracteriza por que:

- el secado secundario se realiza a una temperatura de +20°C y a una presión de 0,1 mBar.

35

13. Procedimiento, según la reivindicación 7, que se caracteriza por que el paso de liofilizar comprende el paso adicional de:

- realizar un secado secundario del plasma rico en plaquetas o del sobrenadante de plasma rico en plaquetas a una temperatura mayor o igual a 0°C y a bajo vacío o sin vacío, durante un tiempo igual o superior a 1 minuto.

40

14. Procedimiento, según la reivindicación 10, que se caracteriza por que comprende el paso adicional de:

- 5
- realizar un secado terciario del plasma rico en plaquetas o del sobrenadante de plasma rico en plaquetas a una temperatura mayor o igual a 0°C y a alto vacío, durante un tiempo igual o superior a 1 minuto.

15. Procedimiento, según la reivindicación 14, que se caracteriza por que:

- 10
- el secado terciario se realiza a una temperatura entre +15 y +25°C y en vacío total.

16. Procedimiento, según la reivindicación 15, que se caracteriza por que:

- 15
- el secado terciario se realiza a una temperatura de +20°C y en vacío total.

17. Procedimiento, según la reivindicación 10, que se caracteriza por que comprende el paso adicional de:

- 20
- realizar un secado terciario del plasma rico en plaquetas o del sobrenadante de plasma rico en plaquetas a una temperatura mayor o igual a 0°C y a bajo vacío o sin vacío, durante un tiempo igual o superior a 1 minuto.

25

18. Procedimiento, según la reivindicación 1, que se caracteriza por que comprende el paso adicional de filtrar el plasma rico en plaquetas o el sobrenadante de plasma rico en plaquetas, el cual se realiza antes de la liofilización.

19. Composición que contiene factores de crecimiento, obtenible según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

23

RESUMEN

5 Procedimiento de obtención de una composición que contiene factores de
crecimiento, que comprende las fases de tratar térmicamente un plasma rico en plaquetas o
un sobrenadante de plasma rico en plaquetas que contiene factores de crecimiento liberados
para aumentar su temperatura de manera que se elimine el complemento y se reduzcan las
inmunoglobulinas presentes en el mismo, de liofilizar el plasma o el sobrenadante para
conseguir una composición final seca de fácil transporte, manipulación y conservación que
facilita los tratamientos periódicos o crónicos con compuestos sanguíneos. Se ha
10 comprobado que, una vez re-suspendida la composición final seca, se obtiene una
composición nuevamente húmeda que conserva intactas sus propiedades biológicas.

23

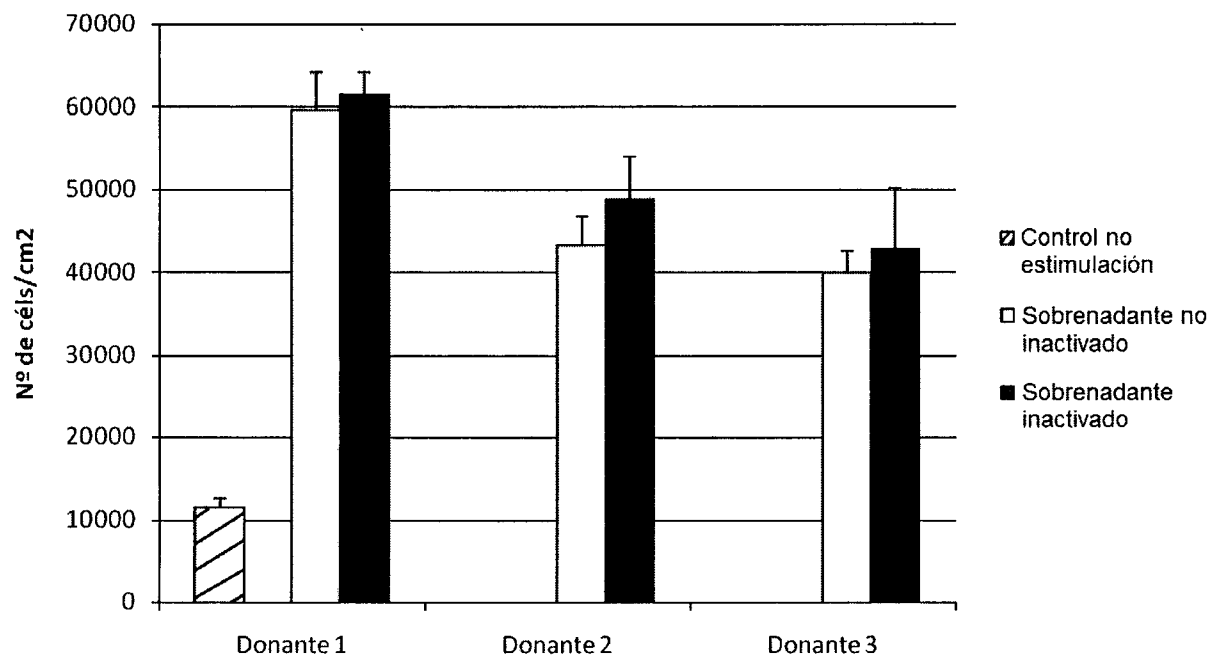


FIG.1

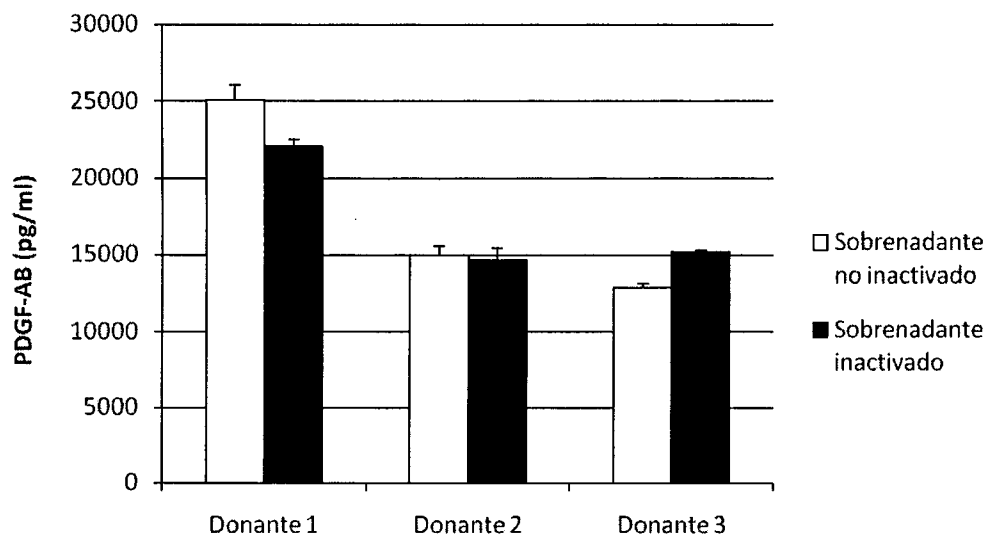


FIG.2

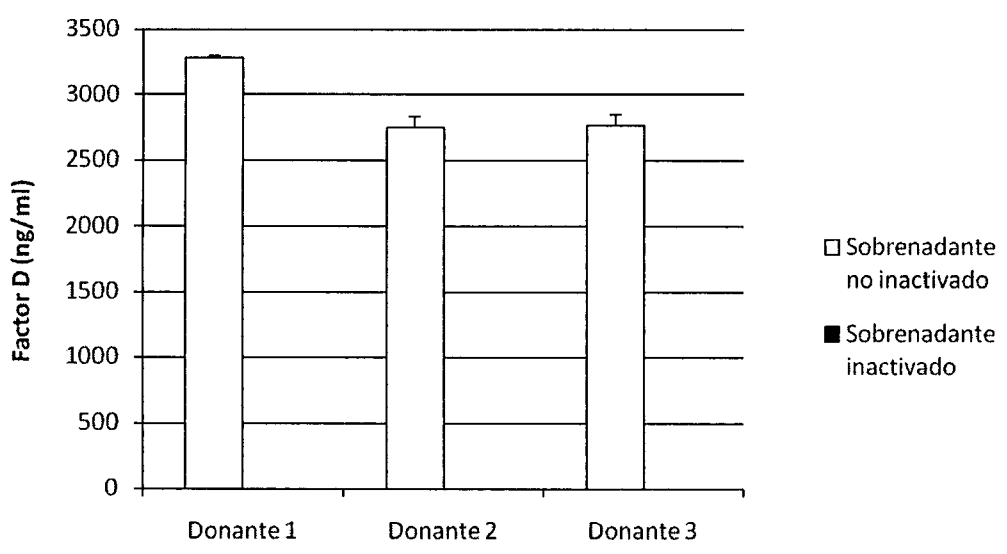


FIG.3

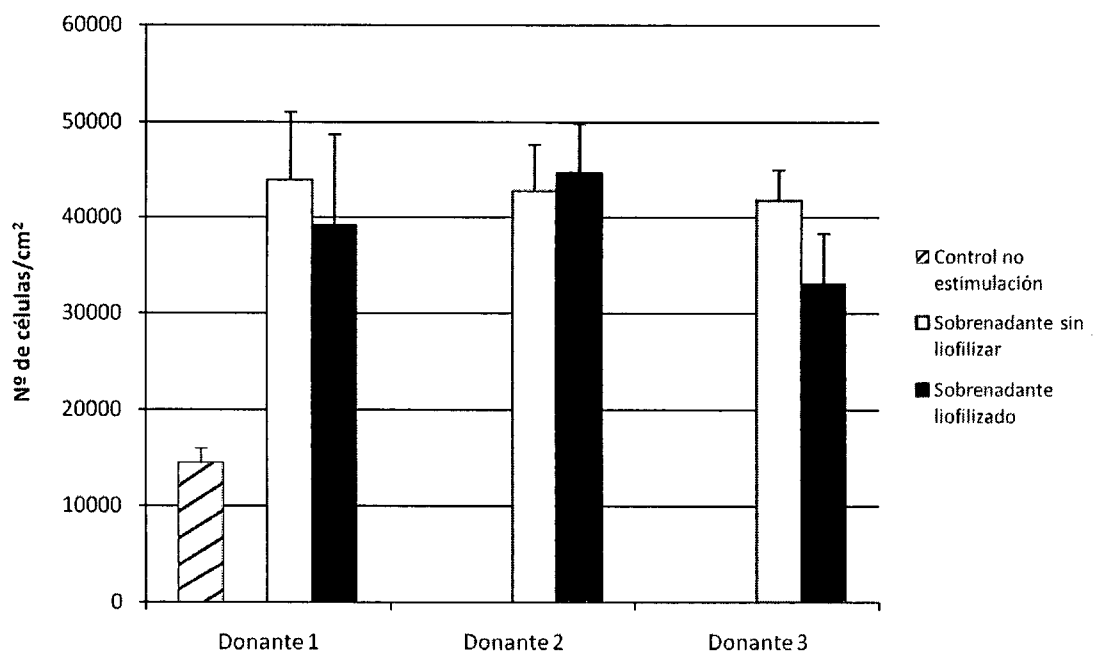


FIG.4

25

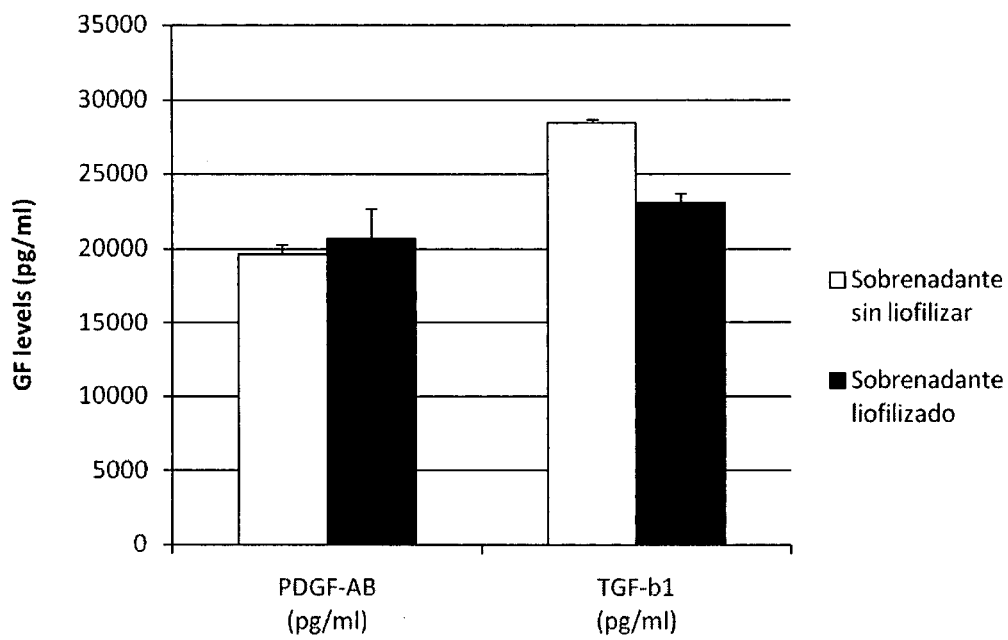


FIG.5

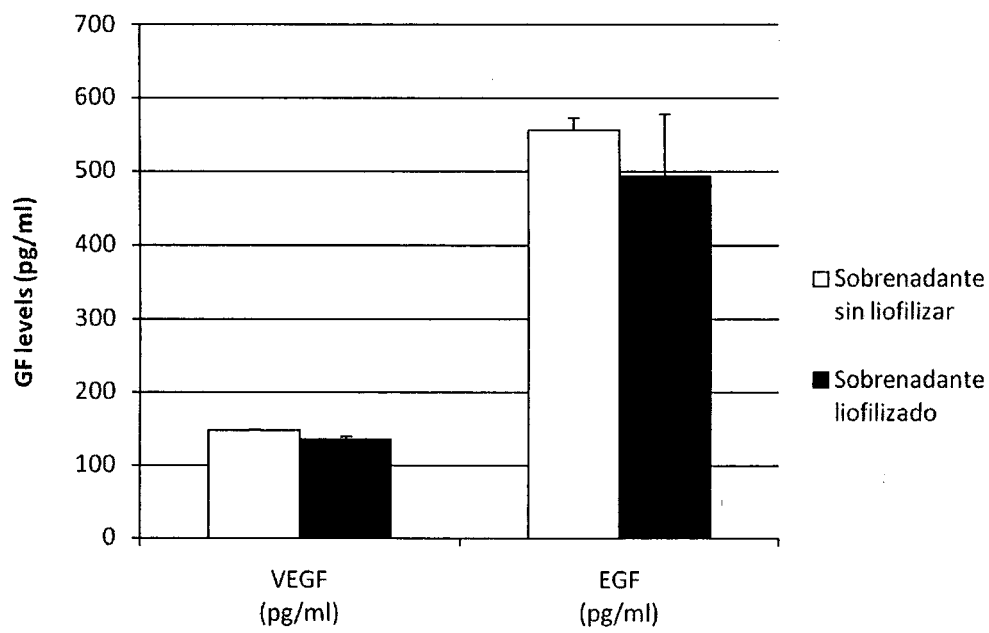


FIG.6

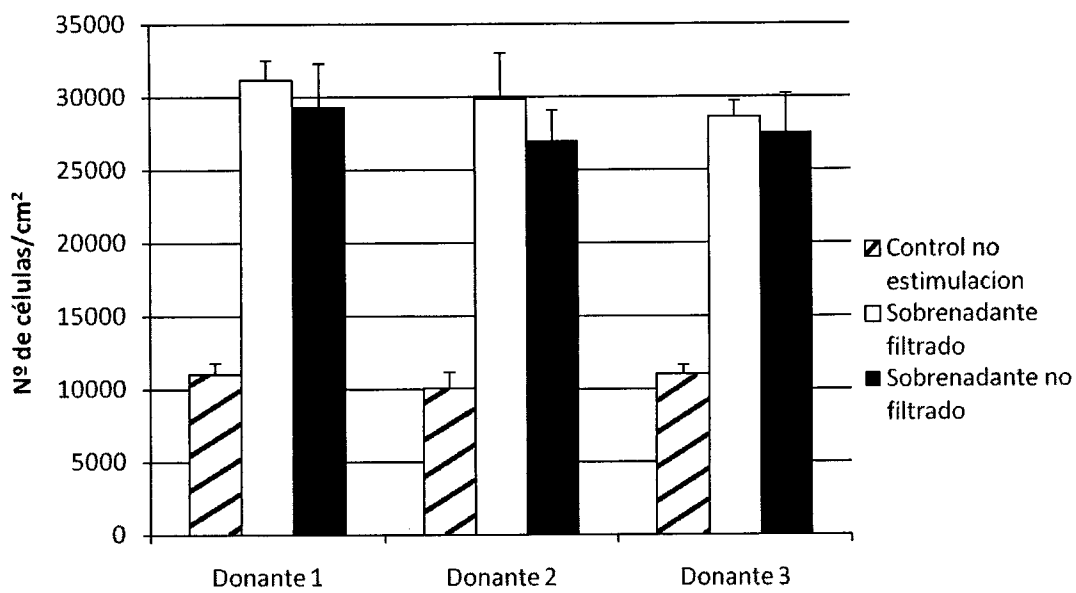


FIG.7

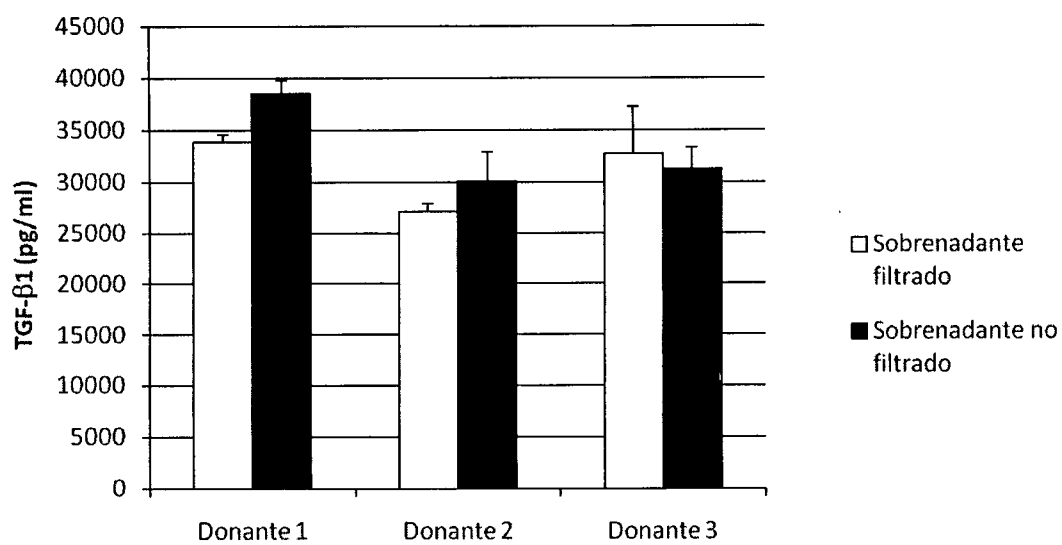


FIG.8

22

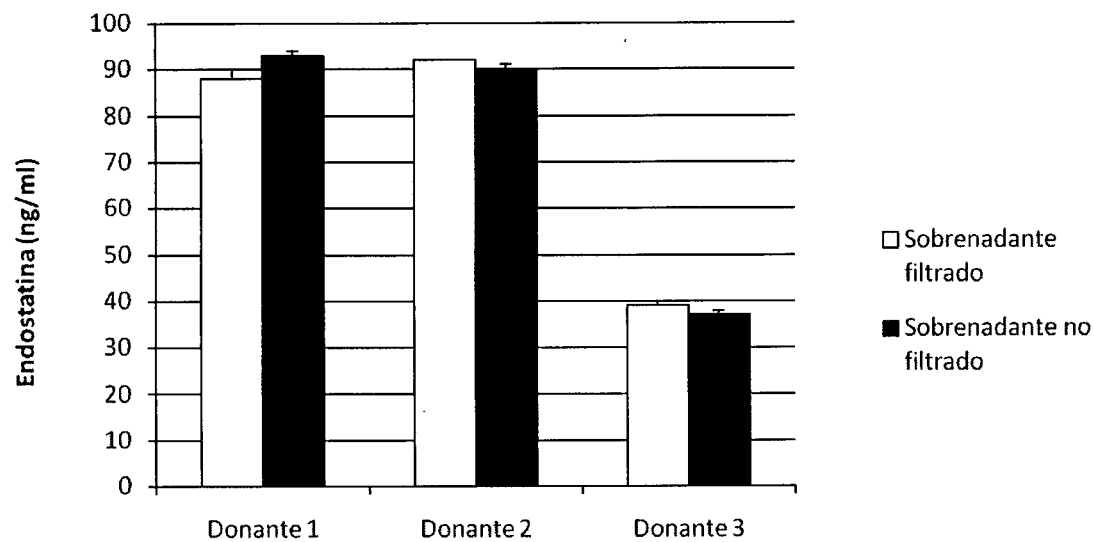


FIG.9

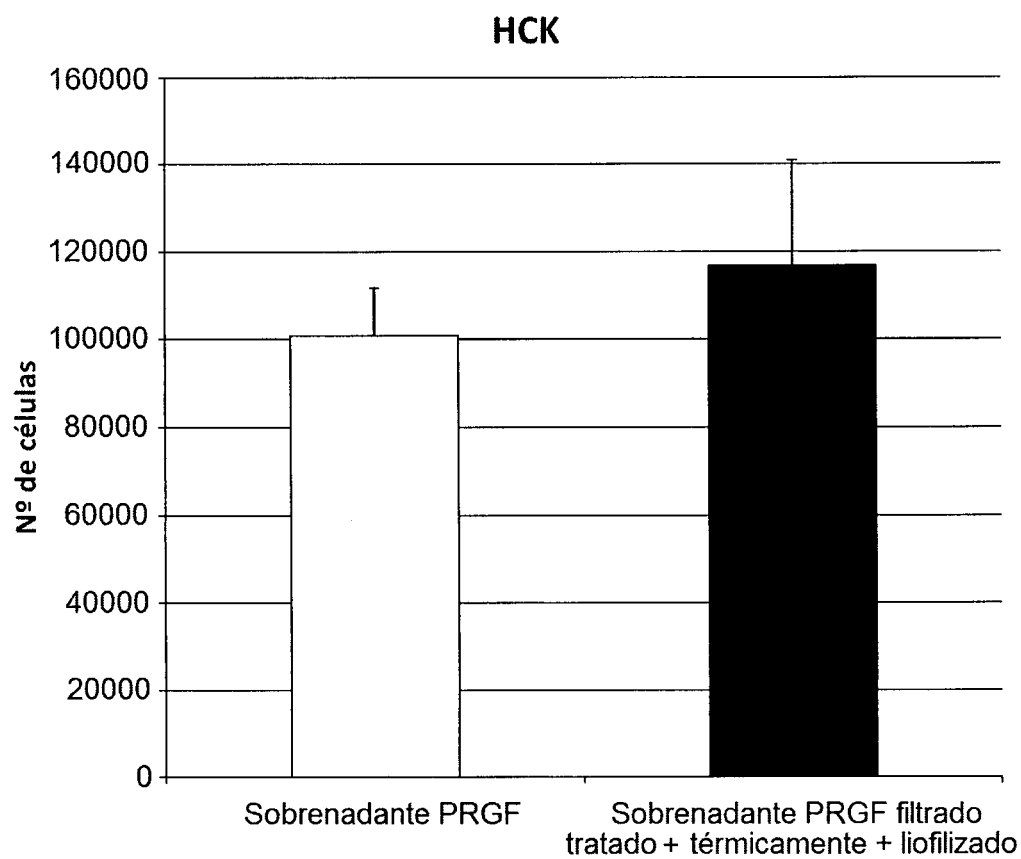


FIG.10

26

6/9

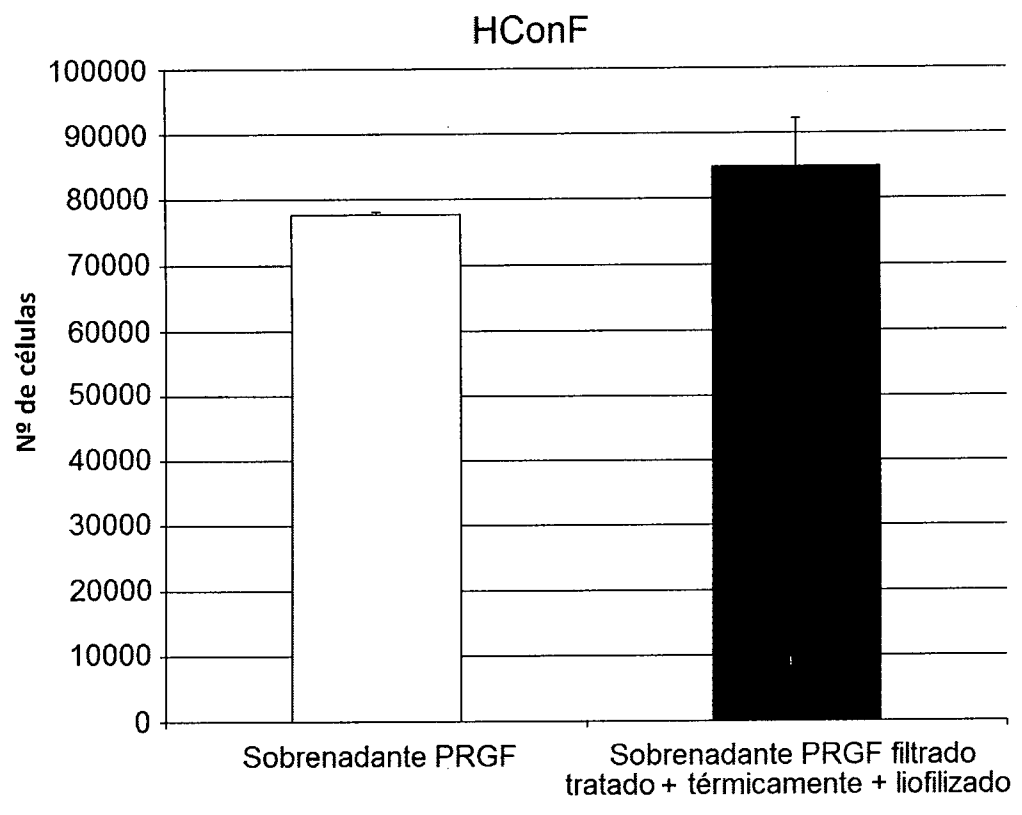


FIG.11

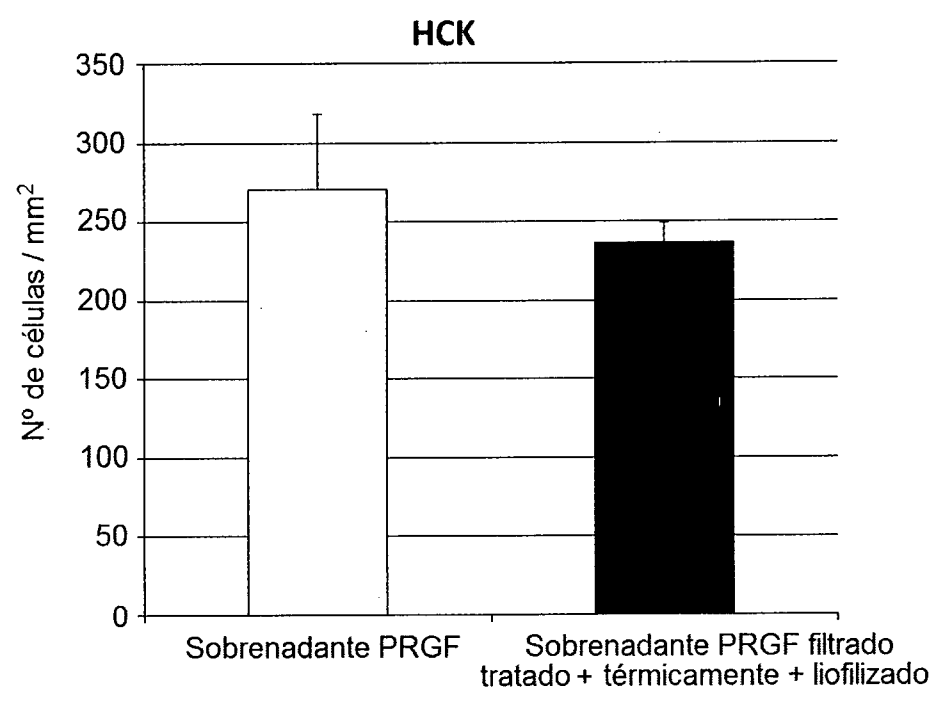


FIG.12

29

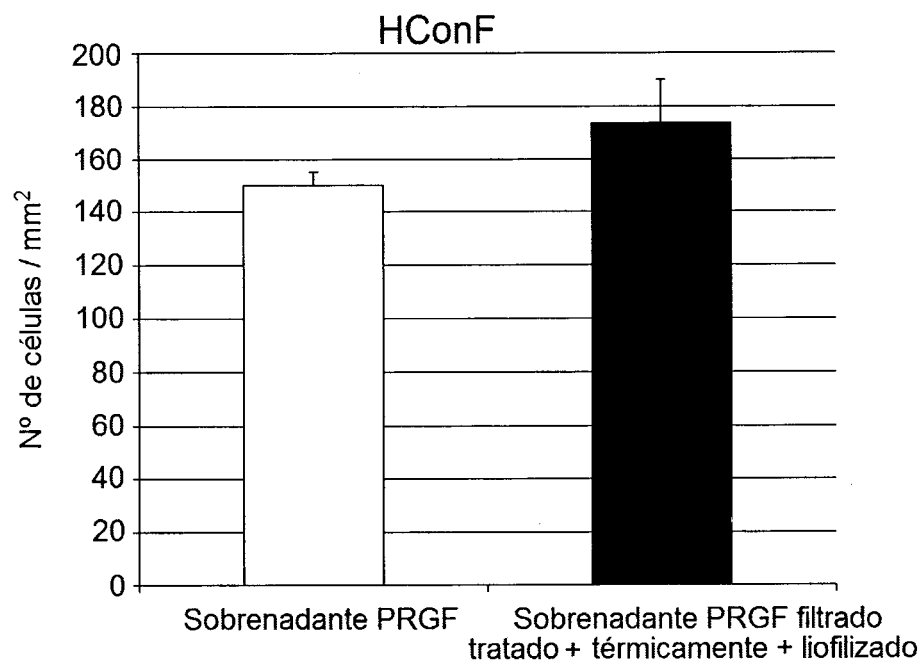


FIG.13

30

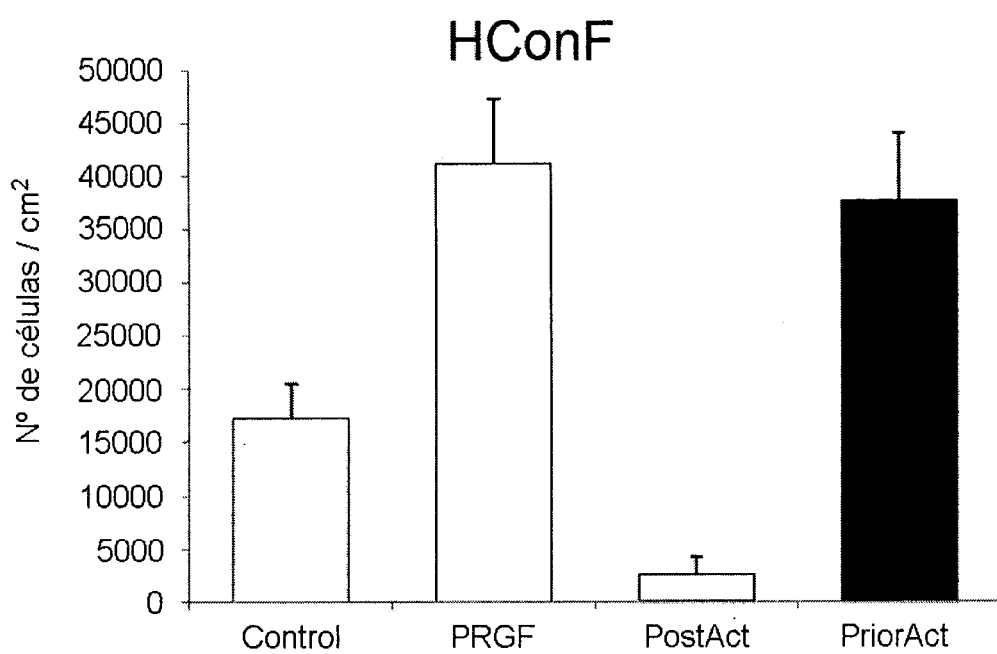


FIG.14

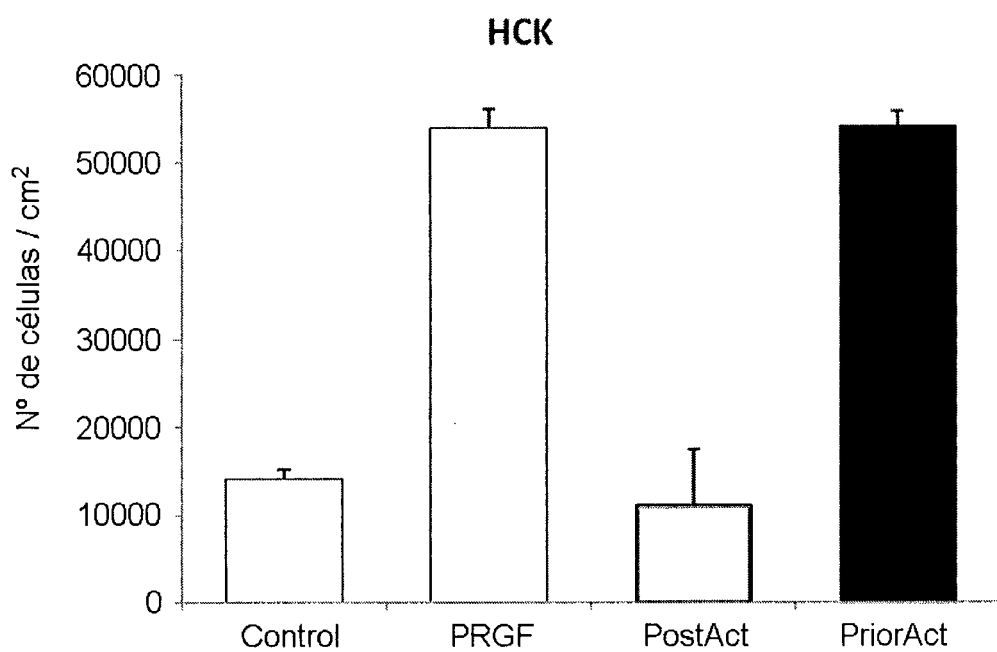


FIG.15

4

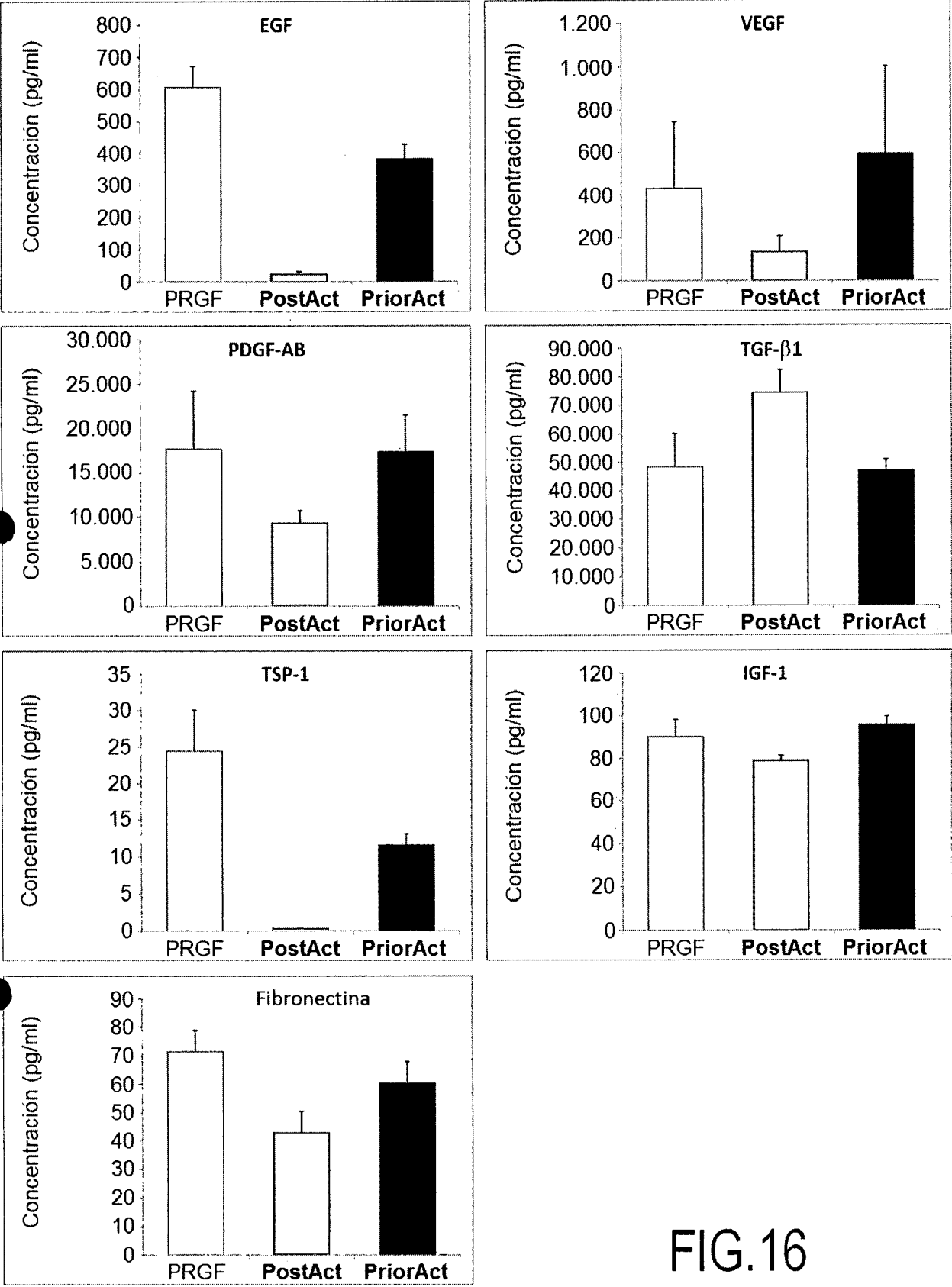


FIG.16

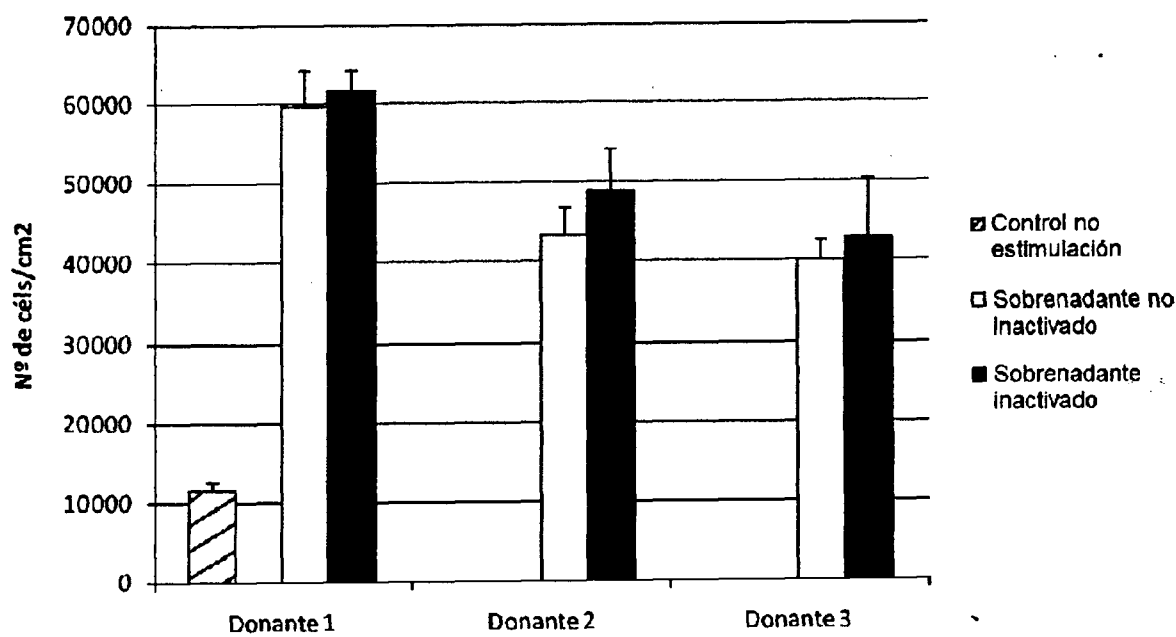


FIG.1

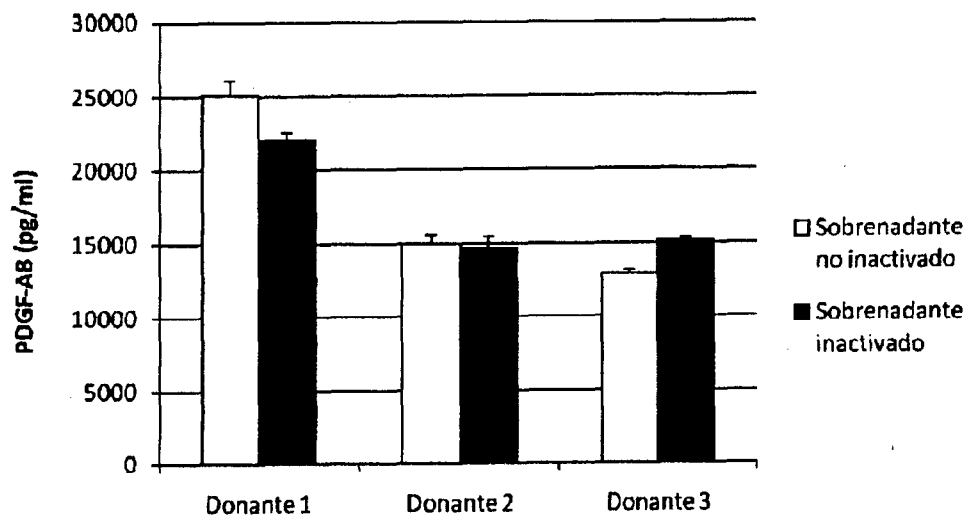


FIG.2

37

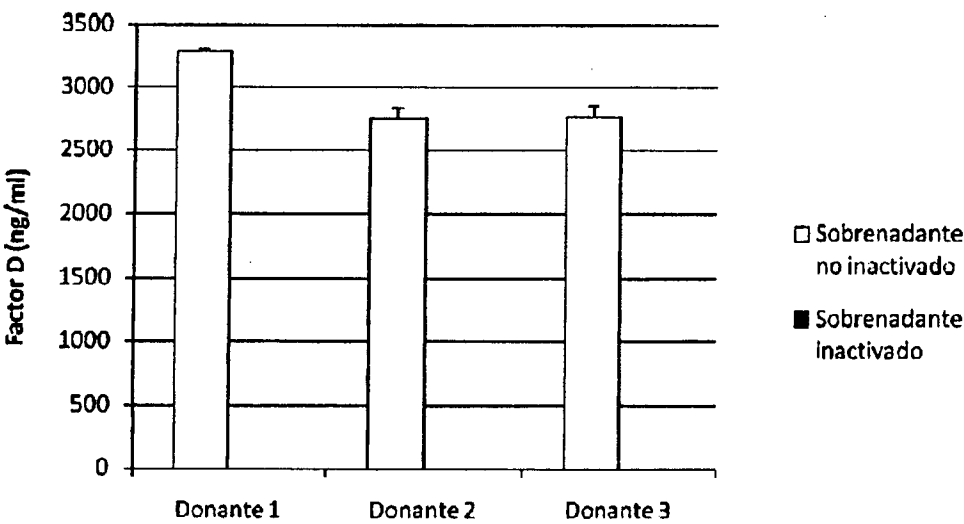


FIG.3

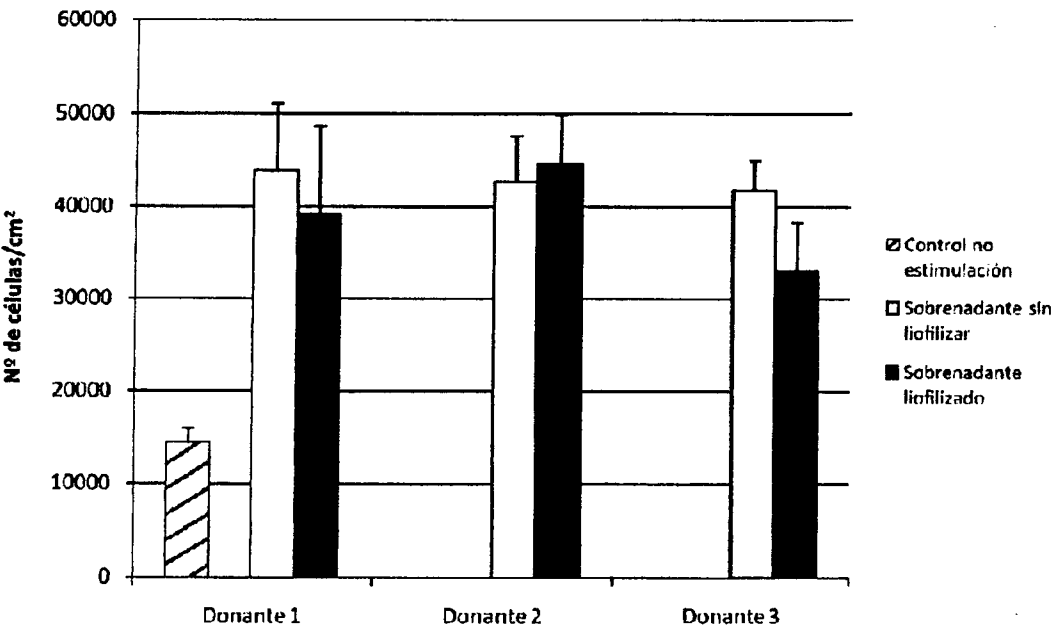


FIG.4

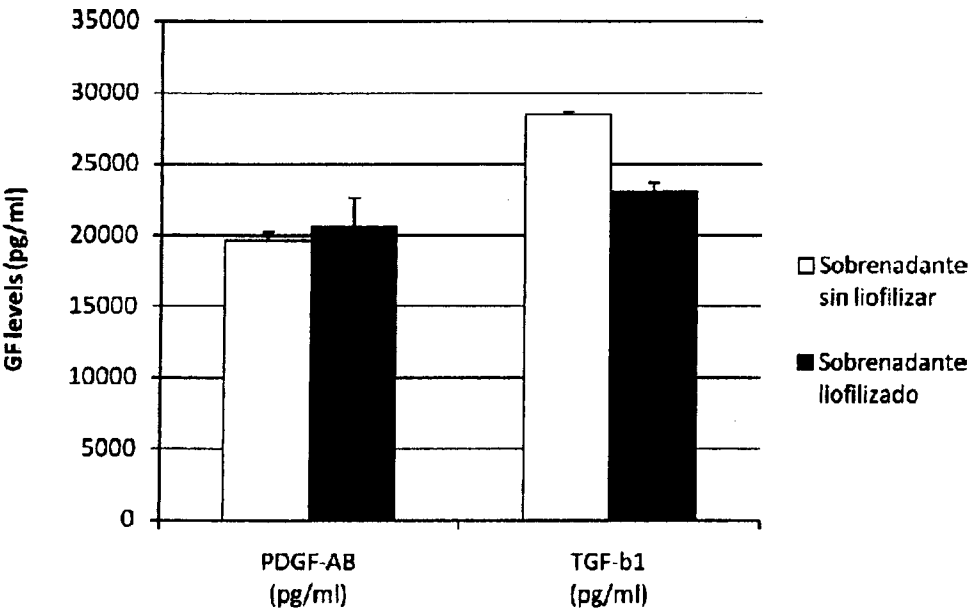


FIG.5

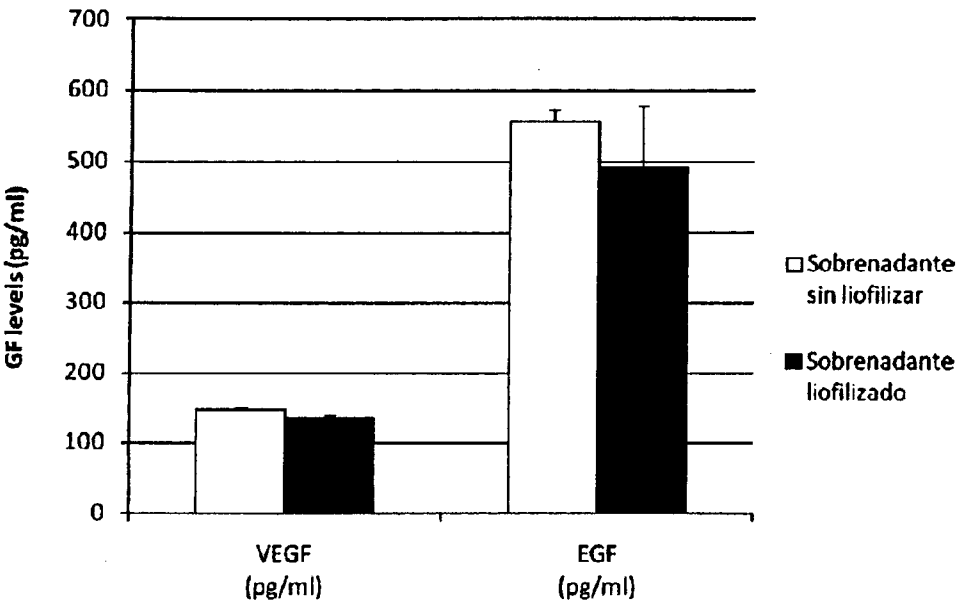


FIG.6

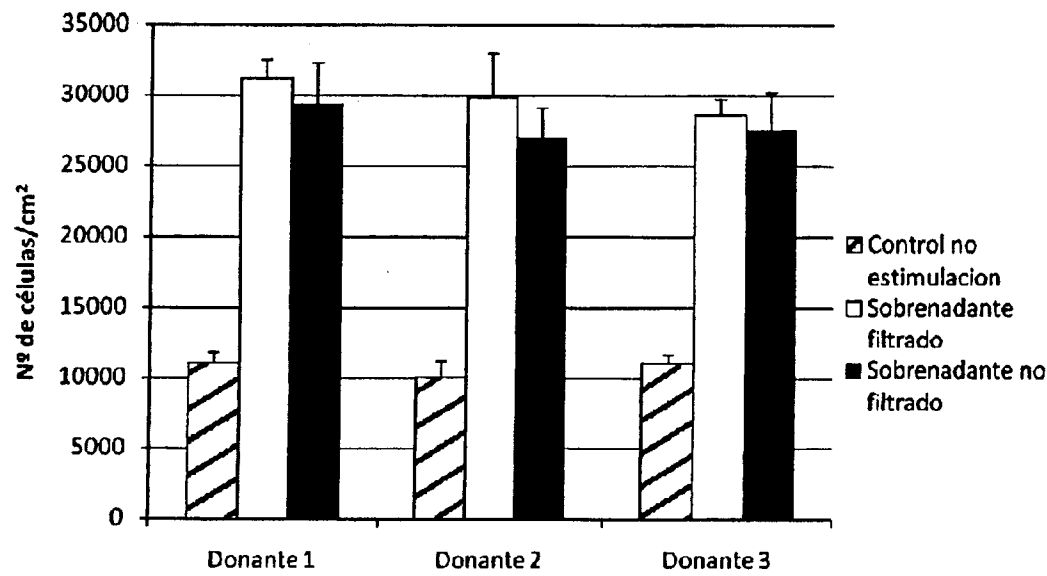


FIG.7

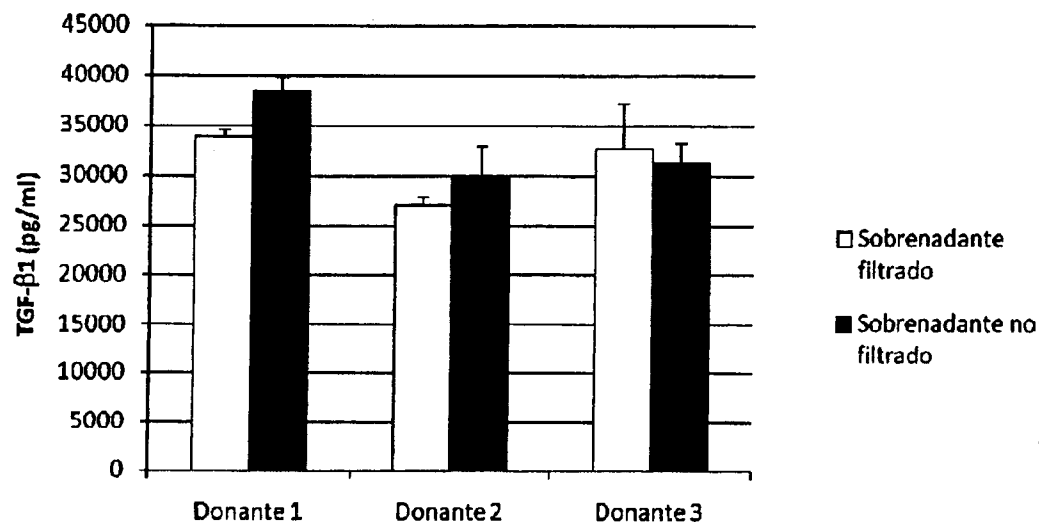


FIG.8

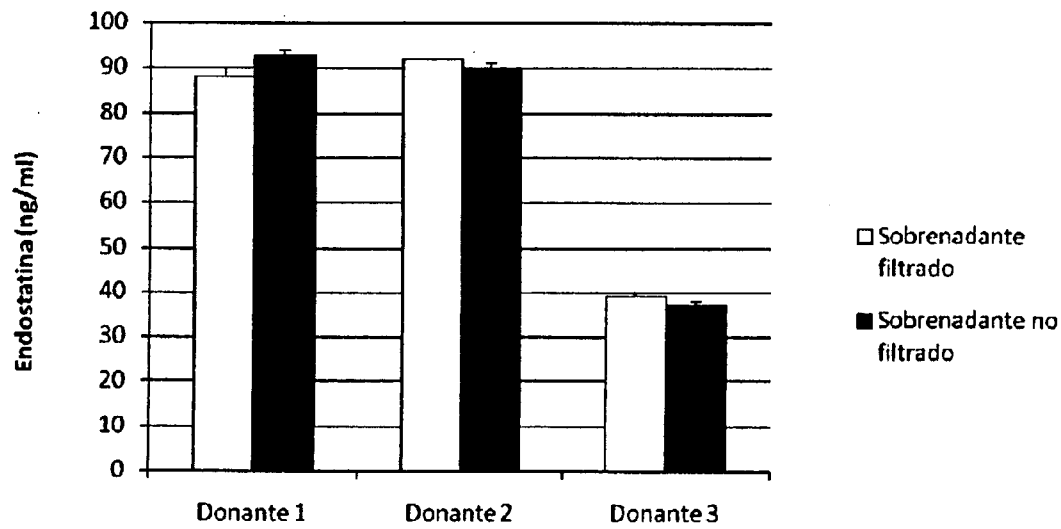


FIG.9

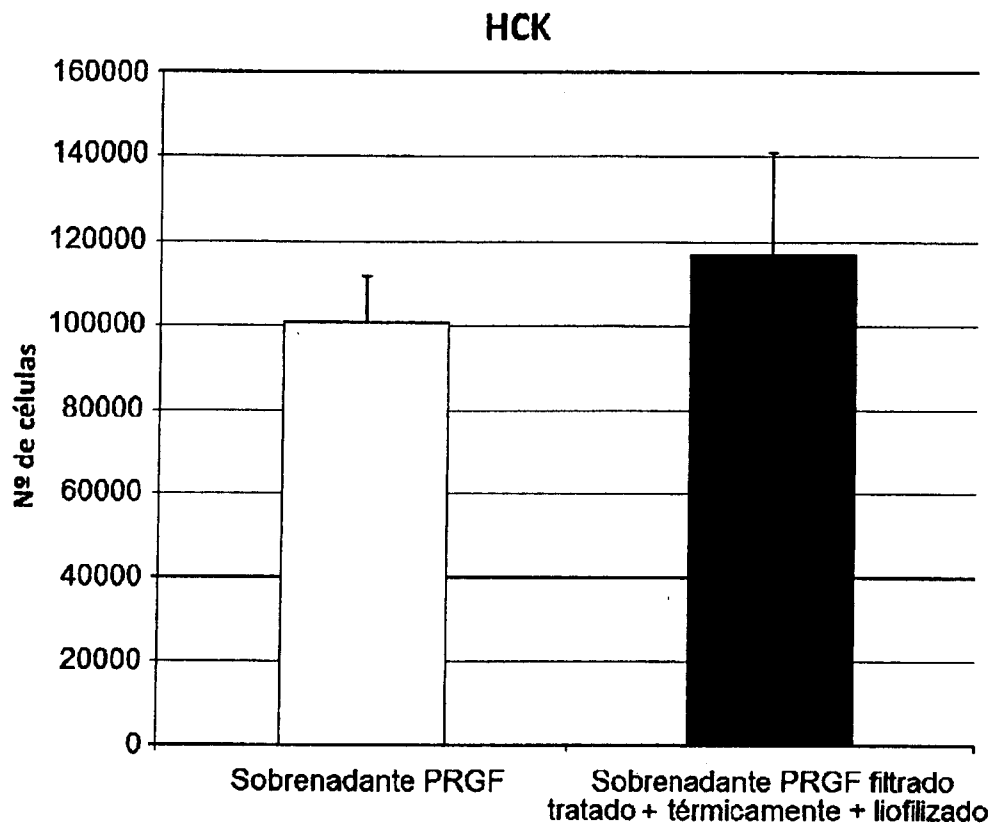


FIG.10

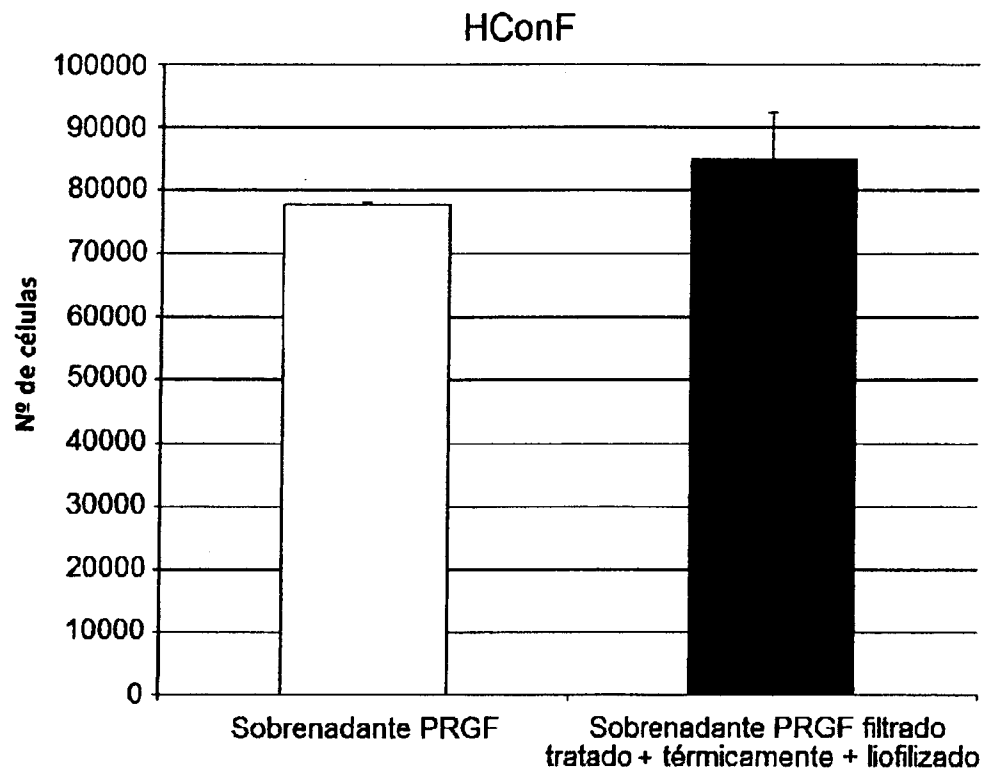


FIG.11

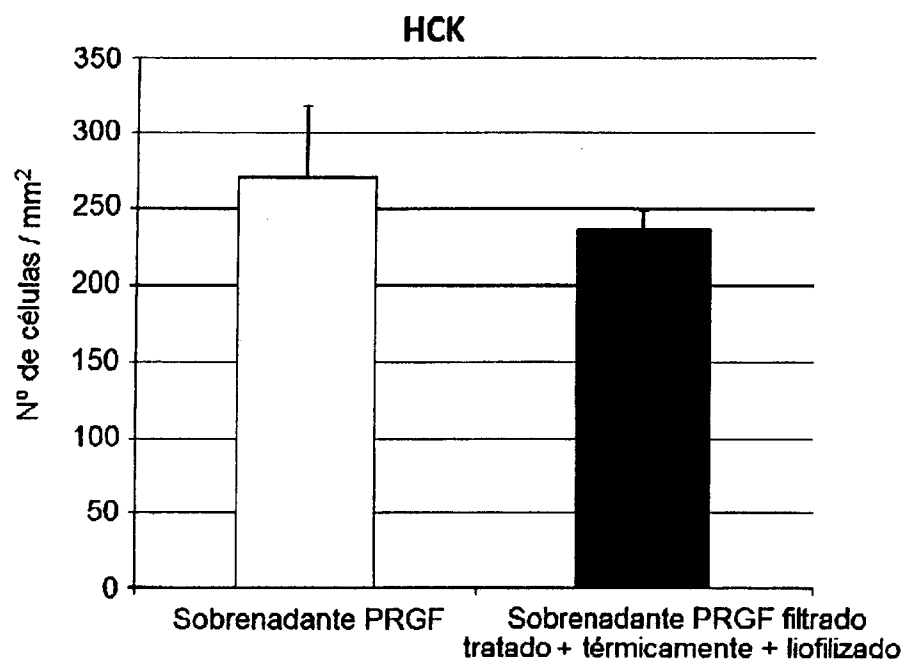


FIG.12

cf
m

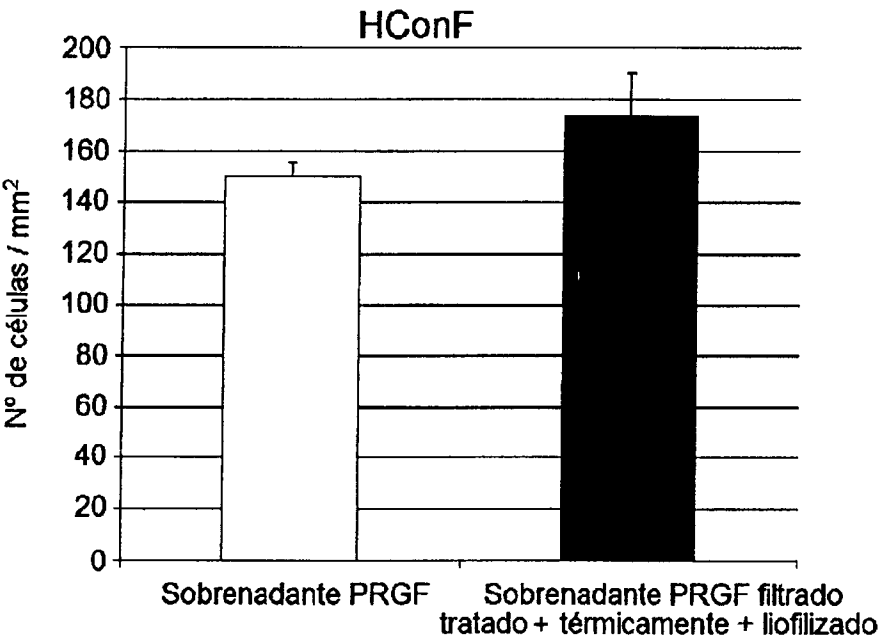


FIG.13

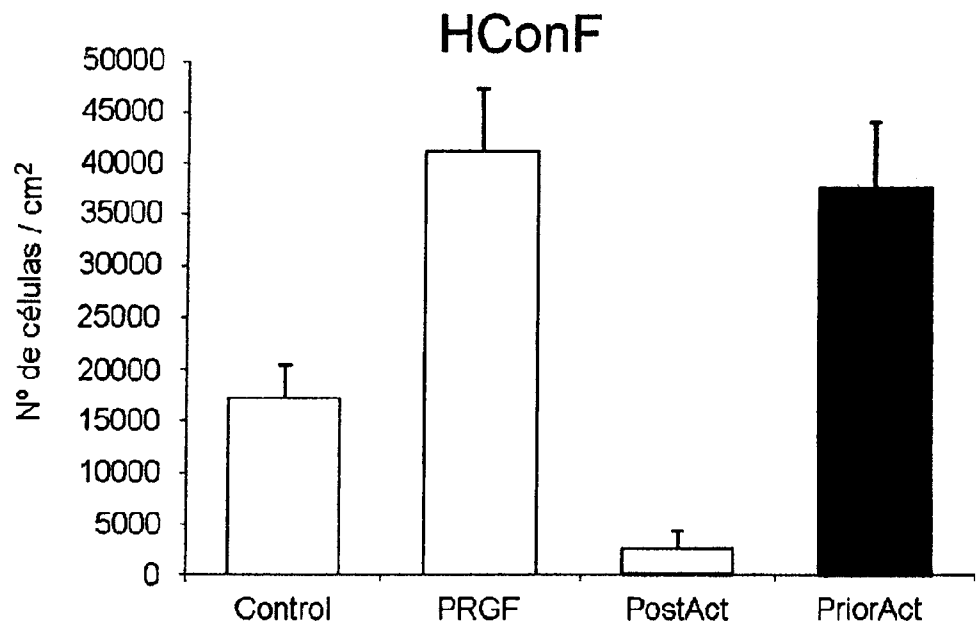


FIG.14

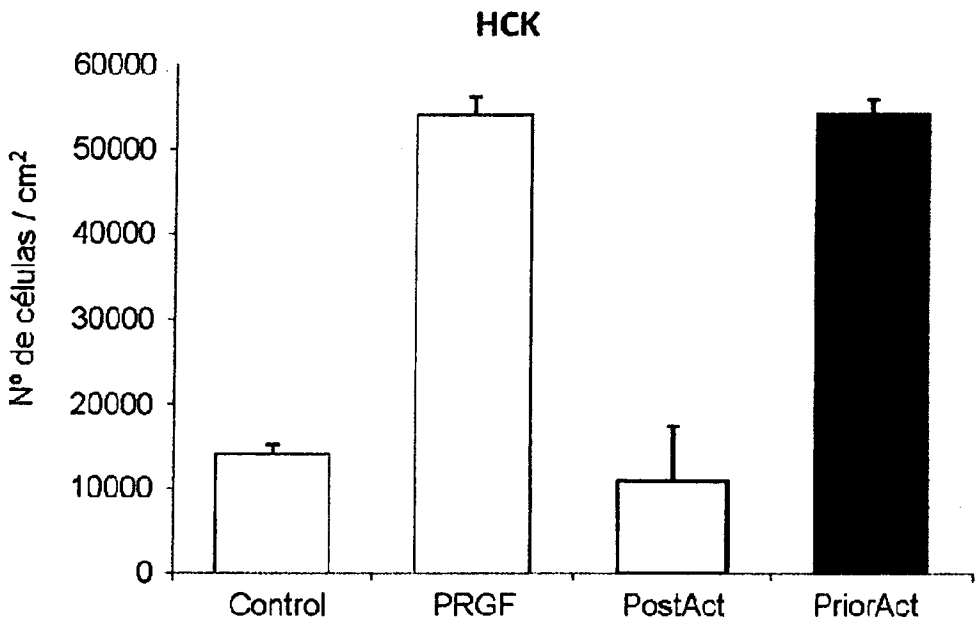


FIG.15

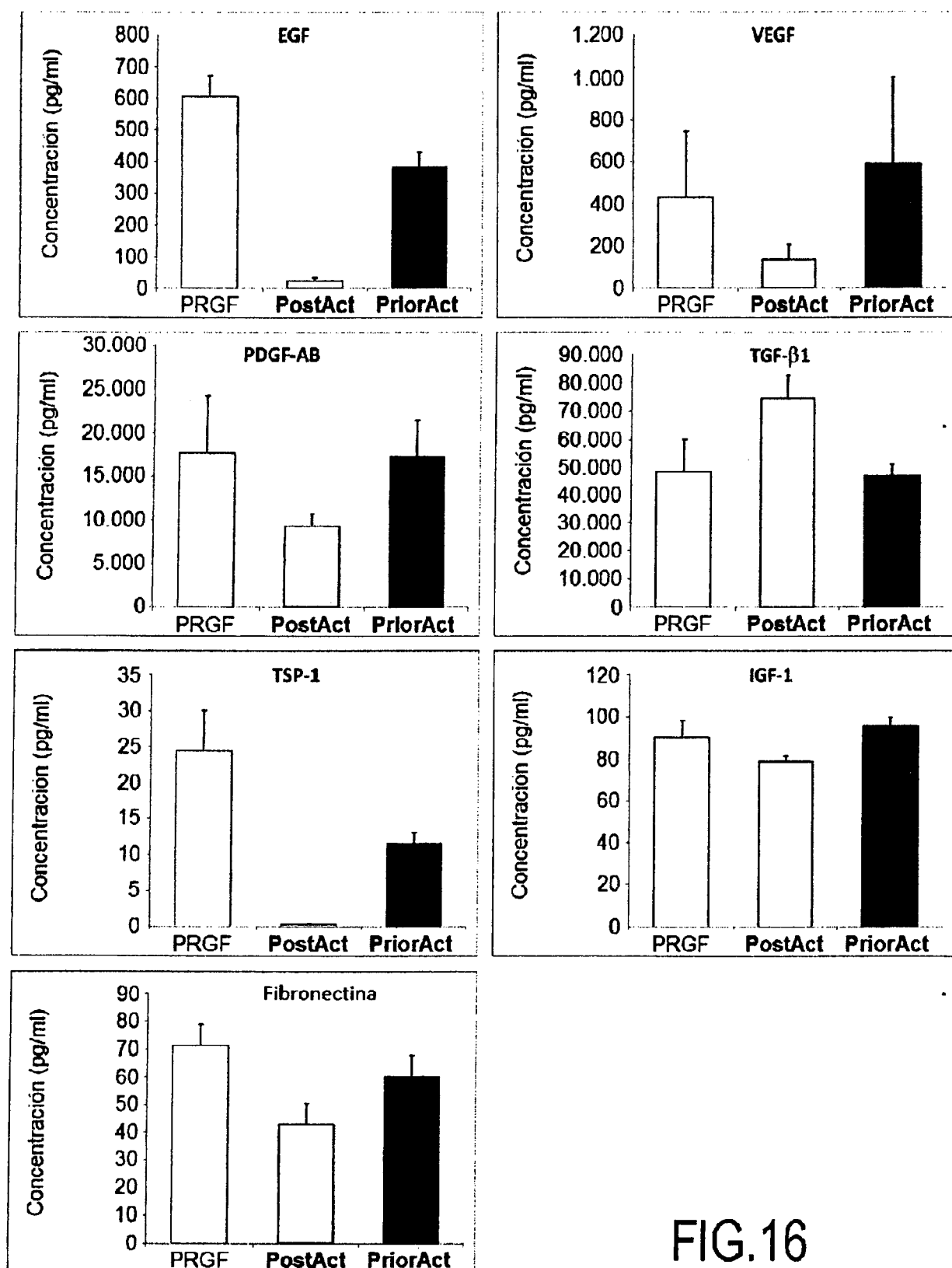


FIG.16

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

41



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 008141

Bogotá D.C., Enero 24 de 2014 - 12:16:05

RECIBIDO DE : CASTILLO GRAU & ASOCIADOS LTDA.

NI 800.098.704

RE

***** Soporte del Pago *****

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	457323602	24/01/2014	4.994.000.00
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	457323613	24/01/2014	515.000.00

***** Conceptos Pagados *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
			<u>\$515.000.00</u>

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. ____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-013982- -00000-0000

Fecha: 2014-01-24 13:13:27
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 42

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.slc.gov.co e-mail: info@slc.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 24 de 2014 - 12:16:07

42



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-013982- -00000-0000

Fecha: 2014-01-24 13:13:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 42



No. 14-013982- -00000-0000

Fecha: 2014-01-24 13:13:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 42

Industria y Comercio
 SUPERINTENDENCIA

ADMISIÓN A

PATENTE DE INVENCION ☐MODELO DE UTILIDAD ☐

Art. 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Descripción de la invención
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
 - ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐