

PROCEDIMIENTO PARA OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO DE ALTA PUREZA Y SUS USOS

SECTOR TÉCNICO

La presente invención se refiere a procedimiento para obtención y conservación de factores de crecimiento de alta pureza (mayores al 90%) aplicable en tratamientos clínicos de bioregeneración, particularmente en estomatología, odontología, estética, traumatología, dermatología y reumatología.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las plaquetas (PLT), comúnmente conocidas por su papel en el proceso de coagulación, son células que no poseen núcleo por lo que carecen de propiedades de división celular. Estos fragmentos citoplasmáticos procedentes de la división del megacariocito contienen tres tipos de gránulos en su interior: gránulos densos, lisosomales y gránulos alfa. Los gránulos alfa son de gran interés ya que en su interior albergan los llamados factores de crecimiento (FC) que poseen diversas funciones reparadoras de tejidos y marcada actividad angiogénica. De esta forma, existe el FC transformante beta, el FC de crecimiento epidérmico o epitelial, el FC endotelial vascular (angiogénico), el FC fibroblástico ácido-básico y el insulínico tipo IGF I, entre otros.

Los FC liberados por los gránulos alfa han demostrado ser efectivos para inducir la regeneración tisular y funcional en tejidos con células afectadas o hipofuncionantes. Por ejemplo, si un fibroblasto de la piel ha dejado de producir colágeno, una inyección de FC autólogos en la zona a tratar, proporciona un factor inductor sobre el fibroplasto (o célula diana), resultando en la 'nueva' producción de colágeno del fibroblasto afectado.

Por lo anterior, el plasma rico en factores de crecimiento activado (PRGF, de sus siglas en inglés *Plasma Rich Growth Factor*) tiene un gran interés científico. Su procedimiento de obtención va más allá de efectuar una extracción de sangre y centrifugarla para separar la fracción más rica en plaquetas. Las plaquetas por sí solas

no tienen acción regenerativa, sino que deben ser activadas a fin de que los gránulos alfa liberen los FC.

En el estado de la técnica se describen ampliamente procedimientos para obtención de PRP. Por ejemplo, el documento ES2567603T3 divulga un método que permite generar un concentrado de PRP, y que comprende la separación a partir de una muestra de sangre entera mezclada con anticoagulantes de una fracción de plasma pobre en plaquetas y de otra rica en plaquetas mediante centrifugación. El método incluye además la determinación por recuento de plaquetas de la concentración de estas después de la separación, y un procedimiento que comprende mezclar volúmenes ricos en plaquetas con volúmenes pobres en plaquetas de forma que se alcance una concentración mínima deseada de 800.000 a 2.000.000 de plaquetas/ μ l en todas las fracciones.

También, el documento WO2014126931A describe la obtención de PRP para usos cosméticos (estética) o terapéuticos en el ámbito de la traumatología y la reumatología. El procedimiento de obtención comprende el uso de cloruro de calcio como agente activador e inductor de la formación de gel a partir del PRP. Además, se hace referencia a la posibilidad de crio-preservar el material obtenido a temperaturas inferiores a -20°C por procedimientos conocidos para la preservación de células.

Por otra parte, también se describen algunos procedimientos para activación de PRP y las utilidades biológicas y médicas del producto. Ejemplos de esto puede encontrarse en el documento ES2527967A2, que indica el uso de gluconato de sodio como activador del plasma rico en plaquetas.

De manera particular, además, una publicación titulada "*Plasma rico en plaquetas*"¹, describe un procedimiento para obtención de PRP y su activación para aplicación en odontología. En dicho documento se describen las etapas de extracción de la muestra de sangre y depósito en recipientes, adición de citrato sódico al 3,2% como anticoagulante, centrifugación y adición de cloruro de calcio al 10% o gluconato de calcio como activador plaquetario para obtener factores de crecimiento a ser utilizado en odontología.

¹ https://issuu.com/robertohdzvides/docs/plasma_rico_en_plaquetas.pptx

Aunque se describen varios procedimientos para la obtención del plasma con factores de crecimiento, la gran mayoría de estos procedimientos llegan a un plasma con contenido medio de factores de crecimiento que tienen que ser utilizados de forma inmediata ya que, de otra forma, disminuye la calidad del plasma en cuanto al contenido de factores de crecimiento activado.

Es así como los inventores de la presente invención, tras extensos y exhaustivos experimentos, han desarrollado un procedimiento de obtención de factores de crecimiento puros y conservación de estos de tal forma que puedan ser utilizados posteriormente de manera efectiva.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para obtención y conservación de factores de crecimiento de alta pureza (por encima del 90%) que puedan ser utilizados en procesos de bioregeneración celular.

El procedimiento de la presente invención consiste en que, una vez se cuenta con un plasma rico en plaquetas, se realizan las etapas de:

- a) adicionar un agente rompedor de membrana de plaquetas a un plasma rico en plaquetas para obtener un plasma rico en factores de crecimiento;
- b) incubar el plasma rico en factores de crecimiento de la etapa a) durante 30 a 40 minutos a una temperatura entre 37 y 40 °C;
- c) enfriar el plasma rico en factores de crecimiento de la etapa b) durante 5 a 7 minutos para obtener un gel y un sobrenadante, dicho sobrenadante que contiene factores de crecimiento a una concentración mayor del % 90;
- d) extraer el sobrenadante con factores de crecimiento de la etapa c);
- e) ultracongelar el sobrenadante con factores de crecimiento de la etapa d) a una temperatura entre -40°C y -18°C.

El sobrenadante obtenido en la etapa c) no contiene restos de plaquetas.

El procedimiento de la presente invención se realiza preferiblemente en un ambiente estéril, opcionalmente en una campana de flujo laminar.

En la etapa a), el agente rompedor de membrana de plaquetas es el encargado de liberar los factores de crecimiento, opcionalmente el agente rompedor de membrana de plaquetas es gluconato sódico en solución, preferiblemente con una concentración entre 100 mg/mL. Preferiblemente, la solución se adiciona al plasma rico en plaquetas al 20% v/v.

Los factores de crecimiento (sin restos de plaquetas) obtenidos mediante el procedimiento de la presente invención han demostrado tener una mayor efectividad cuando se utiliza en procesos de bioregeneración en comparación con el desempeño de otras formas de derivados plasmáticos como plasma rico en plaquetas, PRGF y PRGF activado. Al utilizar los factores de crecimiento de la presente invención se consigue un mayor efecto con menores dosis de producto y menor número de aplicaciones, lo que demuestra una mejor asimilación por parte del paciente.

Adicionalmente, el producto es almacenado hasta 18 meses y demuestra mantener su efectividad en cuanto a contenido de factores de crecimiento. El producto no presenta pérdida de efectividad al descongelarlo hasta tres veces.

EJEMPLOS

Para una mejor comprensión y con carácter no limitativo, la presente invención se describe en más detalle en los ejemplos de realización y ensayos descritos a continuación.

Ejemplo 1. Obtención y conservación de factores de crecimiento puros

Dentro de una campana de flujo laminar, en un tubo Vacutainer de 6 mililitros se depositó 1 mililitro de PRP con 0,2 mililitros de gluconato sódico en solución (con una concentración de 100 mg/ml).

El tubo se incubó durante 30 minutos a 40°C. Seguidamente, se enfrió con ventilador durante 5 minutos. Este proceso se llevó a cabo en un ISM Equipment)

Se obtuvo un gel y un sobrenadante con los factores de crecimiento. Se invirtió el tubo y con la ayuda de una jeringa se extrajo el sobrenadante hasta que el gel quedara muy

reducido.

Debido a que el sobrenadante que contiene los factores de crecimiento puros pierde muy rápidamente su actividad a temperatura ambiente, se procede rápidamente (en un tiempo significativamente inferior a 5 minutos) a depositar el material en viales estériles.

Prevía utilización, los viales se someten a un control bacteriológico para garantizar su esterilidad.

Seguidamente, se congelan los viales estériles a -18 °C y, en algunos casos, a -40°C utilizando nieve carbónica.