

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 085**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/14** (2015.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**C12N 5/071** (2010.01)

**A61P 17/02** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2012 PCT/US2012/044211**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2013 WO13003356**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2012 E 12804449 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 2723354**

54 Título: **Composiciones, usos y preparación de lisados de plaquetas**

30 Prioridad:

**27.06.2011 US 201161501411 P**

**17.10.2011 US 201161547897 P**

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

**10.03.2021**

73 Titular/es:

**EMORY UNIVERSITY (50.0%)**

**Office Of Technology Transfer 1599 Clifton Rd.**

**NE 4th Floor, 1599-001-1AZ**

**Atlanta, GA 30322, US y**

**CHILDREN'S HEALTHCARE OF ATLANTA, INC.**

**(50.0%)**

72 Inventor/es:

**COPLAND, IAN B y**

**GALIPEAU, JACQUES**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 811 085 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

Composiciones, usos y preparación de lisados de plaquetas

## 5 Campo

En ciertas realizaciones, esta divulgación describe composiciones que comprenden lisados de plaquetas agotado en fibrinógeno y crioprecipitado. En una realización adicional, la composición comprende además un componente de medio de cultivo celular. Esta divulgación también proporciona un método para preparar la composición, que comprende las etapas de (a) lisar plaquetas proporcionando un lisado; (b) eliminar los residuos celulares; y (c) agotar el fibrinógeno formando una masa removible agregando una sal metálica tal como cloruro de calcio. Además, la divulgación también describe el producto producido usando dicho método.

## 15 Antecedentes

La medicina regenerativa es un campo amplio en el que se emplean una multitud de tecnologías para potenciar la capacidad del cuerpo para curarse a sí mismo. Una de esas tecnologías es la terapia celular. Se han utilizado varios tipos de células para la terapia celular, incluidas, pero no limitándose a, células embrionarias, neonatales, somáticas, xenogénicas y pluripotentes inducidas. Las células madre mesenquimales (MSC) han demostrado en particular eficacia terapéutica al regenerar tejidos esqueléticos como hueso, cartílago y tendones, al mismo tiempo que tratan la degeneración neuronal y apoyan el injerto hematopoyético. Véanse, por ejemplo, Doucet et al., *J Cell Phys*, (2005), 205: 228-236 y Lange et al., *J Cell Physiol*, (2007), 213: 18-26.

Esfuerzos previos han proliferado células donadoras ex vivo usando un medio de crecimiento que contiene suero bovino fetal (FBS). La presencia de FBS en el medio de cultivo, a pesar del lavado de las células donantes antes de la transferencia al receptor, ha llevado a la generación de anticuerpos contra FBS y ha dado como resultado reacciones de tipo Arthus. Selvaggi et al., *Blood*, (1997), 89(3): 776-9. Las preocupaciones en cuanto a la transferencia de priones animales, contaminación viral y zoonótica también rodean el uso de FBS. Las posibles complicaciones asociadas con el uso de FBS en medios de crecimiento han generado un interés particular para suplementos de crecimiento no xenogénicos capaces de mantener la funcionalidad de las células.

Los sueros humanos autólogos y alogénicos se probaron como un reemplazo para FBS en un esfuerzo por proliferar MSC ex vivo. El suero alogénico provocó la detención del crecimiento celular y la muerte de las MSC. Shahdadfar et al., *Stem Cells*, (2005) 23(9): 1357-66. Aunque el suero autólogo prolifera MSC de manera efectiva, las preocupaciones pragmáticas como el coste y la disponibilidad de suero hacen que esta metodología sea poco práctica. Ver, por ejemplo, Kobayashi et al., *J Bone Joint Surg Br*, (2005), 87(10): 1426-33. Investigaciones anteriores indican que factores de crecimiento liberados por las plaquetas humanas potencian efectivamente el crecimiento de varios tipos de células, incluidas las MSC. En consecuencia, los esfuerzos recientes se han centrado en el uso de lisado de plaquetas en lugar de FBS como un suplemento de cultivo celular.

Las plaquetas son capaces de liberar múltiples factores de crecimiento, como múltiples factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ). Sanchez et al., *Int J Oral Maxillofac Implants*, (2003), 18(1): 93-103. Con el fin de complementar los medios de cultivo celular con estos factores de crecimiento, se demostró que el lisado de plaquetas es superior a las metodologías de adhesión plaquetaria y de agregación plaquetaria. Doucet et al., *J Cell Phys*, (2005), 205: 228-236.

A pesar de potenciar el crecimiento celular, el uso de lisado de plaquetas sin procesar presenta su propio conjunto de complicaciones. Los usos clínicos de la terapia celular ex vivo han utilizado FBS como un suplemento de crecimiento de cultivo celular hasta hace poco, y las consideraciones en cuanto al uso de lisado de plaquetas en aplicaciones clínicas aún no se han abordado. Estas consideraciones incluyen la presencia de residuos celulares, factores de coagulación y crioprecipitado, así como las características inmunosupresoras de células cultivadas en presencia de lisado de plaquetas. Además, el uso de lisado de plaquetas sin procesar en cultivo celular da como resultado la conversión de fibrinógeno en fibrina. En general, la heparina se agrega directamente al cultivo celular para evitar esta conversión. Ver, por ejemplo, Schallmoser et al., *Tissue Eng Part C Methods*, (2008), 14(3): 185-96. A pesar de este uso de heparina, se pueden formar grandes hebras fibrosas dentro de los medios y unirse a la monocapa MSC. Esto conlleva el riesgo de infundir a los pacientes con estas hebras fibrosas, resultando potencialmente en micro o macro oclusiones. Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar métodos mejorados para reducir la generación de hebras fibrosas.

La protrombina zimógena se produce en el hígado. Se escinde enzimáticamente en dos sitios por el Factor Xa, produciendo trombina. La trombina, a su vez, media la coagulación mediante la conversión de fibrinógeno en fibrina. La fibrina puede entrecruzarse con el factor XIII de transglutaminasa, formando un coágulo. La fibrina puede unirse en hebras fibrosas que son peligrosas si se transfieren a un paciente, como se describió anteriormente. La heparina se puede usar para aumentar la afinidad de la antitrombina por la trombina y el factor Xa, lo que podría interrumpir potencialmente la cascada de coagulación.

El documento WO 2010/064267 A1 se refiere al uso de lisado de plaquetas para tratar y/o prevenir la mucositis. Además, se describe una composición mucoadhesiva que comprende dicho lisado de plaquetas para la terapia y/o prevención de mucositis y de lesiones corneales.

## 5 Resumen

El objeto para el que se busca protección es el definido en las reivindicaciones.

10 En ciertas realizaciones, esta divulgación describe composiciones que comprenden lisados de plaquetas agotados en fibrinógeno y crioprecipitado. En una realización adicional, la composición comprende además un componente de medio de cultivo celular. Esta divulgación también proporciona un método para preparar la composición, que comprende las etapas de (a) lisar plaquetas proporcionando un lisado; (b) eliminar residuos celulares; y (c) agotar el fibrinógeno formando una masa removible agregando una sal metálica tal como cloruro de calcio. Además, la divulgación también describe el producto producido usando dicho método.

15 En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende componentes de lisado de plaquetas con una concentración de fibrinógeno de menos de 20 µg/ml.

20 En ciertas realizaciones, la composición de lisado de plaquetas está sustancialmente agotado en fibrinógeno. En algunas realizaciones, la concentración de fibrinógeno es inferior a 10 µg/ml. En algunas realizaciones, la composición tiene una concentración de fibrinógeno de menos de o aproximadamente 2 o 4 µg/ml. En algunas realizaciones, los componentes de lisado de plaquetas no están agotados de PDGF. En algunas realizaciones, el PDGF es PDGF-BB y la concentración de PDGF-BB es mayor de 10 ng/ml. En algunas realizaciones, la composición tiene una concentración de PDGF-BB de más de aproximadamente 15, 30 o 40 ng/ml. En algunas realizaciones, la composición no contiene citrato dextrosa ácida (ACD) o no contiene cantidades sustanciales de un anticoagulante quelante de calcio tal como citrato ácido. En algunas realizaciones, la composición está sustancialmente libre de residuos celulares. En algunas realizaciones, la composición está sustancialmente libre de crioprecipitado. En algunas realizaciones, la composición está sustancialmente agotada de trombina. En algunas realizaciones, la composición comprende además componentes del medio de cultivo celular y/o heparina y/o una sal de calcio. En algunas realizaciones, la sal de calcio es cloruro de calcio.

En algunas realizaciones, la composición es una solución acuosa. La invención también proporciona una composición hecha mediante el proceso de eliminación de agua de dicha composición.

35 En algunas realizaciones, la invención se relaciona con un método de cultivo de células usando un medio de cultivo celular que comprende una composición de la invención. Los medios de cultivo celular típicos contienen aminoácidos y opcionalmente insulina, hormonas, antibióticos y sacáridos. En algunas realizaciones, las células cultivadas son células somáticas, neonatales, embrionarias, xenogénicas o pluripotentes. En algunas realizaciones, las células cultivadas son MSC.

40 En algunos aspectos, la divulgación se relaciona con células expandidas de especies seleccionadas de roedores, porcinos, primates, primates humanos y primates no humanos.

45 En algunas realizaciones, la invención se relaciona con un método para preparar lisado de plaquetas agotado en fibrinógeno, que comprende las etapas de (a) lisar plaquetas proporcionando un lisado; (b) eliminar los residuos celulares; y (c) agotar el fibrinógeno del lisado de plaquetas formando una masa removible agregando una sal metálica bajo condiciones en donde la concentración de fibrinógeno es inferior a 20 µg/ml. En ciertas realizaciones, el método comprende además la etapa de (d) la eliminación de un anticoagulante quelante de calcio, por ejemplo, ACD, y recalcificación de la composición. En algunas realizaciones, los residuos celulares se eliminan por centrifugación y/o filtración. En algunas realizaciones, los residuos celulares se eliminan antes del agotamiento del fibrinógeno, después del agotamiento del fibrinógeno, o tanto antes como después del agotamiento del fibrinógeno. En algunas realizaciones, se agrupan múltiples lisados de plaquetas antes de eliminar los residuos celulares, después de eliminar los residuos celulares, cuando la eliminación de los residuos celulares está incompleta, antes de agotar el fibrinógeno, después de agotar el fibrinógeno o antes de que se complete el agotamiento del fibrinógeno. En algunas realizaciones, la agrupación se produce antes o después de la filtración. En algunas realizaciones, las plaquetas se lisan por congelación y descongelación. En algunas realizaciones, las plaquetas se lisan descongelando una o varias veces. En algunas realizaciones, las plaquetas se lisan por lisis mecánica o un regulador de lisis. En algunas realizaciones, la sal metálica, tal como la sal metálica divalente, típicamente una sal de calcio, por ejemplo, cloruro de calcio, se agrega a lisados individuales o agrupados. En algunas realizaciones, se agrega heparina a lisados individuales o agrupados. En algunas realizaciones, se observa lisado agrupado hasta que aparece un coágulo visual. En algunas realizaciones, dicho coágulo visual se elimina, por ejemplo, por centrifugación.

65 En algunas realizaciones, la invención se relaciona con el producto producido por los métodos divulgados aquí. En algunas realizaciones, el producto es estéril o sustancialmente libre de bacterias, por ejemplo, es negativo a micoplasma. En algunas realizaciones, el producto tiene una concentración de fibrinógeno de menos de 2, 3, 4, 5 o

10 µg/ml. En algunas realizaciones, el producto tiene una concentración de PDGF-BB mayor que 1, 5, 10, 15 o 40 ng/ml.

5 En ciertos aspectos, la divulgación se relaciona con métodos de tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones proporcionadas aquí que comprenden administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende lisado de plaquetas agotado en fibrinógeno o componentes a un sujeto que lo necesita.

10 En algunas realizaciones, la invención se relaciona con usos como un agente tópico y/o la generación de productos celulares en oftalmología. En ciertas realizaciones, la invención se relaciona con composiciones de la invención para uso en métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad o afecciones oculares, en donde los métodos comprenden administrar una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende composiciones divulgadas aquí a un sujeto que lo necesita. En ciertas realizaciones, el sujeto lo necesita porque el sujeto está diagnóstico con, está en riesgo de, o presenta síntomas de escleritis, queratitis, úlcera o abrasión corneal, neovascularización corneal, distrofia de Fuch, queratoconjuntivitis, iritis, uveítis, catarata, inflamación coriorretiniana, ciclitis posterior, cicatrices coriorretinianas, degeneración coriorretiniana, distrofia coroidea, hemorragia o ruptura coroidea, desprendimiento coroideo, desprendimiento de retina, retinosquiasis, retinopatía hipertensiva, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, degeneración macular, retinitis pigmentosa, edema macular, glaucoma, flotadores, neuropatía óptica, drusas del disco óptico, ambliopía, escotoma, nictalopía, ojos rojos, xeroftalmia o ceguera.

20 En ciertas realizaciones, la invención se relaciona con composiciones de la invención para uso en métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección ocular, en donde el método comprende administrar una cantidad efectiva de composición que comprende componentes de lisado de plaquetas divulgados aquí a un sujeto que necesita del mismo.

25 En ciertas realizaciones, la composición se administra dejando caer una solución que comprende una composición divulgada aquí en el ojo del sujeto. En ciertas realizaciones, la composición se administra al interior del ojo, por ejemplo, mediante una jeringa u otro dispositivo de transferencia tal como un catéter delgado o cubo que se inserta a través de las células del ojo externo en el humor acuoso o humor vítreo.

30 En ciertos aspectos, la divulgación contempla el uso de lisado de plaquetas agotado en fibrinógeno para la generación de monocitos inmunosupresores.

35 En ciertos aspectos, la divulgación contempla el uso de células madre/estromales mesenquimatosas generadas y divulgadas aquí para generar in vivo osteoblastos, adipocitos y condrocitos, miocitos y neuronas.

40 En ciertas realizaciones, la invención se relaciona con composiciones que comprenden componentes de lisado de plaquetas con cantidades reducidas de fibrinógeno en comparación con lisados de plaquetas producidos por un proceso de congelación y descongelación, por ejemplo, en donde la composición está sustancialmente agotada de fibrinógeno y los componentes de lisado de plaquetas no están sustancialmente agotados de PDGF. En cierta realización, la composición es una solución acuosa con una concentración de fibrinógeno de menos de 2 o 4 µg/ml en donde la concentración de PDGF-BB es mayor de 15 ng/ml. En ciertas realizaciones, la invención se relaciona con composiciones hechas por los procesos de eliminación de agua por liofilización, de composiciones de lisado de plaquetas divulgadas aquí.

45 En ciertas realizaciones, la invención contempla métodos de cultivo de células, en donde las células se cultivan en un medio que comprende componentes de lisado de plaquetas divulgados aquí. En ciertas realizaciones, las células son células progenitoras o células madre tales como células madre pluripotentes, células madre multipotentes, células madre somáticas, células madre mesenquimatosas/estromales, células madre/estromales derivadas de tejido adiposo, células madre endoteliales, células madre de pulpa dental, células madre embrionarias, células madre de médula ósea o hematopoyéticas, células madre amnióticas, células madre linfoides o mieloides.

50 En ciertas realizaciones, la invención se relaciona con composiciones de la invención para uso en métodos de tratamiento de una herida o cierre de herida, en donde el método comprende aplicar en la herida una composición que comprende composiciones o componentes de lisado de plaquetas divulgados aquí. En ciertos aspectos, la divulgación contempla el vendaje para heridas que comprende composiciones o componentes de lisado de plaquetas divulgados aquí. Ejemplos de apósitos para heridas incluyen vendajes, gasas, pegamentos, por ejemplo, pegamentos de cianoacrilato o suturas. En ciertos aspectos, el apósito para heridas comprende además un antibiótico.

60 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra datos gráficos que indican que a pesar de la reducción en fibrinógeno, FD-PL y phPL contienen niveles similares de factores de crecimiento deseables como PDGF, TGF-beta, EGF y BDNF medidos por ELISA

65

La Figura 2 muestra el análisis microscópico después de 7 días de almacenamiento, lo que indica que FD-PL (arriba) está esencialmente libre de residuos, mientras que phPL (abajo) contiene partículas de tamaño variable.

5 La Figura 3 muestra datos donde las MSC se expanden ex vivo en FBS, phPL y FD-PL, lo que demuestra que el cultivo de MSC en FD-PL puede acortar significativamente el tiempo de duplicación en comparación con FBS y phPL.

10 La Figura 4 muestra datos sobre la capacidad de respuesta INF-gamma de las MSC a base de la inducción deIDO cuando se cultivan a partir de FD-PL (GMP) y phPL (RG), lo que indica que las MSC expandidas con FD-PL tienen un potencial inmunosupresor superior.

15 La Figura 5 muestra el análisis microscópico (vista derecha expandida de la izquierda) de FD-PL (arriba), phPL (medio) y suero (abajo) indicando que FD-PL es capaz de promover la unión y expansión de una población de monocitos positivos CD11b y CD33.

La Figura 6 muestra datos sobre la proliferación (arriba) y viabilidad (abajo) del uso de células epiteliales corneales humanas (HCEC) de crecimiento de phPL (izquierda), FD-PL (centro) y suero (derecha).

#### 20 Descripción detallada

##### Agotamiento de fibrinógeno de lisados de plaquetas usando heparina y sales metálicas

25 Las plaquetas, o trombocitos, son células que no tienen un núcleo que contenga ADN derivado de la fragmentación de megacariocitos precursores. Las plaquetas circulan en la sangre de mamíferos y participan en la hemostasia, lo que conduce a la formación de coágulos sanguíneos. La plaquetoféresis se refiere al método de recolección de plaquetas. Las plaquetas se pueden agrupar de sangre entera o mediante un dispositivo que separa las plaquetas y devuelve otras porciones de la sangre a un donante. El suero se coloca generalmente en una centrifuga grande en lo que se conoce como un "centrifugado suave". En esta configuración, las plaquetas permanecen suspendidas en el plasma. El plasma rico en plaquetas (PRP) se extrae de los RBC y luego se centrifuga a una configuración más rápida para cosechar las plaquetas del plasma. Las plaquetas recolectadas generalmente se enfrían para desacelerar la degradación de las células.

35 Como se usa aquí, el término "lisado de plaquetas" se refiere a los productos de lisis de plaquetas. El lisado de plaquetas también puede incluir cualquier medio en el que estén contenidas las plaquetas lisadas. La congelación y descongelación es el método típico, pero no el único, para lisar células en la presente invención. La lisis mecánica, típicamente mediante el uso de fuerzas de corte, es otro método contemplado para producir un lisado. Los reguladores de lisis, que generalmente actúan al colocar las células en una solución hipotónica, son otra opción. El proceso de lisis puede consistir en combinaciones de estos métodos.

40 En ciertas realizaciones, la presente invención se relaciona con métodos en donde se añaden heparina y sal de calcio directamente al lisado de plaquetas para agotar el fibrinógeno, recalcificar el lisado y para neutralizar el citrato. En otra realización, el lisado resultante se combina con medios de cultivo celular. Anteriormente, se agregaba heparina directamente a los medios de cultivo celular, antes de la suplementación con lisado de plaquetas; no se presentó evidencia de agotamiento de fibrinógeno utilizando esta metodología previa. Ver, por ejemplo, Schallmoser et al., *Tissue Eng Part C Methods*, (2008), 14(3):185-96.

50 En algunas realizaciones, la presente invención se relaciona con composiciones de lisado de plaquetas en donde el complemento está sustancialmente agotado. Este agotamiento se puede lograr por múltiples medios, como se describe aquí. Un uso para esta disminución es que las realizaciones pueden usarse con células no humanas mientras se minimiza el riesgo de cualquier reactividad inmune mediada por el complemento por el lisado de plaquetas humano contra las células no humanas.

55 Típicamente, el ácido citrato dextrosa (ACD) se usa como anticoagulante. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente publicada de Estados Unidos No. 12/441,870 (ACD descrito como "un anticoagulante sanguíneo importante"). Al reducir la disponibilidad de calcio, el ACD roba el mecanismo de coagulación del calcio del que depende. Ver, por ejemplo, Reich-Slotky et al. *J Clin Apher*, (2009), 24(6):265-8. El calcio para uso en la actividad celular normal también se reduce con ACD, presentando así una toxicidad potencial. En esta invención, la heparina se usa como anticoagulante, evitando así los efectos potencialmente tóxicos y agotadores de calcio de ACD. La adición de una sal como la sal de calcio, idealmente  $\text{CaCl}_2$ , neutraliza aún más la toxicidad del citrato y recalcifica el lisado de plaquetas. En algunas realizaciones, el  $\text{CaCl}_2$  se disuelve en un regulador, por ejemplo, Plasmalyte A. En algunas realizaciones, el  $\text{CaCl}_2$  se disuelve en una solución de electrolito isotónico estéril a aproximadamente un pH 7.4. En ciertas realizaciones, la eliminación de ACD (un anticoagulante quelante de calcio) es parte de los métodos de la invención. Los quelantes de calcio son perjudiciales para el cultivo celular y el suministro adecuado de calcio conduce a una función óptima. Además, la estabilización inducida por heparina de los factores de crecimiento y la clarificación del producto son resultados incorporados en la presente invención. En ciertas realizaciones, los métodos de la invención no requieren el uso de ACD.

El lisado de plaquetas agotado en fibrinógeno (FD-PL o Multiplate FD) se compara favorablemente con el lisado de plaquetas sin procesar. Los beneficios incluyen, pero no se limitan a, los hallazgos de que Multiplate FD es superior al lisado de plaquetas no procesado y FBS en MSC en expansión, Multiplate FD no es xenogénico (es decir, no presenta riesgo de zoonosis o transmisión de priones), Multiplate FD elimina la necesidad de heparina adicional en medios de cultivo, Multiplate FD evita el riesgo de que se formen hebras fibrosas en los medios y se unan a la monocapa MSC (es decir, disminuye el riesgo de micro o macrooclusiones), Multiplate FD es superior con respecto a la estabilidad al lisado de plaquetas no procesado en la fabricación de MSC para terapias autoinmunes y aloinmunes, Multiplate FD conserva las características inmunosupresoras observadas con el suero fetal bovino y es más versátil que el lisado de plaquetas sin procesar para la expansión de células de múltiples linajes y especies.

Las realizaciones descritas aquí pueden aplicarse a tratamientos clínicos para medicina regenerativa, inmunoterapia, liberación de factores bioactivos, cáncer y otros campos relacionados.

#### 15 Análisis del contenido de proteínas en lisado de plaquetas

Usando el RayBio® Human Cytokine Antibody Array C Serie 4000 se compararon los niveles de expresión relativa de aproximadamente 174 proteínas. Se detectaron proteínas en al menos una de las cuatro soluciones (suero humano, plasma pobre en plaquetas, lisado de plaquetas crudo (phPL) y lisado de plaquetas agotado en fibrinógeno (FD-PL)). De las 116 proteínas, 87 pudieron detectarse en FD-PL, mientras que en phPL fueron detectables 113 proteínas. En suero se detectaron 67 mientras que en PPP se detectaron 60 proteínas. Las proteínas más abundantes en todas las muestras fueron típicamente MSP-alfa, ACRP30, ANGIOGENIN y RANTES. La proteína estimuladora de macrófagos (cadena MSP-alfa) también se conoce como proteína tipo HGF (proteína tipo factor de crecimiento de hepatocitos) y MST1 (estimulante de macrófagos 1). Es un heterodímero unido por disulfuro de 70 kDa (subunidades de 47 y 22 kDa) y cuando está activo envía señales a través de CD136. La proteína relacionada con el complemento de adipocitos de 30 kDa (ACRP30) es estructuralmente idéntica a la adiponectina y es un potente potenciador de la insulina. La angiogenina también es una proteína plasmática abundante producida por el hígado y se ha demostrado que tiene propiedades tanto angiogénicas como antiinflamatorias. Rantes o CCL5 es conocido principalmente por su actividad como una citoquina quimiotáctica, pero puede tener un papel potencial en la defensa del huésped como un agente antiviral directo. Dado que cada una de estas proteínas puede considerarse un componente normal del plasma, los niveles no fueron sorprendentemente similares entre las diversas soluciones probadas. En consecuencia, se realizó un análisis de la proporción entre suero versus PPP, FD-PL vs PPP y phPL vs PPP para determinar qué factores se liberaron o agotaron debido a la desgranulación/coagulación o lisis de las plaquetas. Seis proteínas mostraron una expresión de proteína relativa aumentada en FD-PL, mientras que 37 proteínas disminuyeron. De particular interés fue el aumento de los niveles de leptina, PDGF-AA y PDGF-AB en FD-PL en comparación con phPL y una reducción en varias MMP, quimiocinas inflamatorias.

En un análisis separado, el suero humano normal, plasma pobre en plaquetas, lisado de plaquetas crudo (phPL) y el lisado de plaquetas agotado en fibrinógeno (FD-PL) se sometieron a digeridos tripticos y se analizaron para la expresión de proteínas usando espectrometría de masas. Las apolipoproteínas fueron la familia de proteínas detectadas con mayor representación (N=3), seguidas por miembros de la cascada del complemento (N=6). Confirmando nuestros datos ELISA, el análisis MS mostró que el protocolo de fabricación de lisado de plaquetas agota fibrinógeno. En FD-PL, los niveles de fibrinógeno se reducen al menos 10 veces en comparación con phPL que se asemeja a los niveles séricos más que el plasma pobre en plaquetas. El protocolo de fabricación también agota selectivamente el complemento 4, el subcomponente del Complemento C1 y el factor del complemento B, que se retienen en phPL y PPP. En comparación con el suero y PPP, los lisados de plaquetas (phPL y FD-PL) contienen niveles detectables de varias proteínas citoesqueléticas y asociadas al citoesqueleto como actina, filamina, talina y zixina. Ambas PL contienen niveles detectables de Timosina beta 4 con FD-PL que tiene aproximadamente el doble de la cantidad de ThB4 de phPL. Además, FD-PL está agotado en factores que incluyen, hemopexina, apolipoproteína CIII, apolipoproteína AI alfa-2-macroglobulina y alfa-IB-glucoproteína, pero potenciada para alfa-2-HS-glucoproteína, apolipoproteína L1, clusterina/apolipoproteína J y proteína básica de plaquetas.

Además del agotamiento del complemento y MMP, el agotamiento de fibrinógeno y fibrina potencia la seguridad del producto FD-PL. El fibrinógeno se convierte en fibrina. Se ha reportado que la fibrina induce inflamación. Ver Rowland et al., *Curr Eye Res.* 1985, 4(5):537-53. La fibrina puede causar que CEC produzca IL-8. Ver Ramsby et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994, 35(12):3980-90 y Drew et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000, 41(1):67-72.). Además, el fibrinógeno puede señalar directamente en monocitos a través de TLR4 para aumentar MCP-1 MIP-1-alfa, MIP-1-beta y MIP-2. Ver Smiley et al., *J. Immunol.* 2001, 167(5):2887-94 y Sitrin et al., *J Immunol* 161:1462-1470, 1998. Puede prolongar la respuesta inflamatoria de los neutrófilos al enlazarse a la subunidad- $\alpha$  de CD11b/CD18 en la superficie de los neutrófilos y activando así la ruta de señalización de Erk. Ver Rubel et al. *J Immunol* 166:2002-2010, 2001. Finalmente, se ha demostrado que el fibrinógeno adsorbido es el componente principal del plasma responsable por las respuestas inflamatorias agudas a muchos materiales implantados. Ver Tang et al., *J Exp Med* 178:2147-2156, 1993. Por lo tanto, el agotamiento de fibrinógeno de nuestro lisado de plaquetas reduce la posibilidad de que este producto afecte negativamente a las células (como MSC que expresan TLR4) en cultivo y crea un mejor perfil de seguridad para la aplicación tópica directa de este producto a pacientes.

## Indicaciones terapéuticas

En ciertas realizaciones, la presente invención contempla que las composiciones de lisado de plaquetas agotado en fibrinógeno contenidas aquí pueden usarse directamente o agotadas de agua mediante un proceso tal como liofilización, es decir, desecación por congelación, para proporcionar productos deshidratados que pueden agregarse a cultivos celulares y excipientes farmacéuticamente aceptables y usarse en aplicaciones terapéuticas proporcionadas aquí.

El ojo seco es una complicación importante asociada con la enfermedad crónica de injerto contra huésped después del trasplante de células madre hematopoyéticas. Pezzotta et al., Bone Marrow Transplant, 2012, doi: 10.1038/bmt.2012.64, reportaron que el lisado de plaquetas autólogo puede usarse para el tratamiento de GvHD ocular. En ciertas realizaciones, esta invención se relaciona con el tratamiento del ojo seco que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición de lisado de plaquetas agotado en fibrinógeno divulgada aquí al ojo de un sujeto.

Sandri et al., Int J Pharm, 2012, 426(1-2):1-6 reportan que las gotas para los ojos que contienen lisado de plaquetas son útiles para el tratamiento de úlceras corneales. En ciertas realizaciones, esta invención se relaciona con el tratamiento de enfermedades o afecciones corneales que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición de lisado de plaquetas agotado en fibrinógeno de la invención al ojo de un sujeto.

FD-PL y phPL tienen una serie de similitudes, pero debido a nuestro procedimiento de fabricación hay un agotamiento selectivo y una acumulación de varias proteínas que hacen de FD-PL un producto distinto. De particular interés es el hecho de que FD-PL ha aumentado las cantidades de TB4, un factor que tiene propiedades angiogénicas, prosupervivencia y antiinflamatorias y actualmente se está evaluando clínicamente para la regeneración del tejido ocular.

Ranzato et al., J Cell Mol Med, 2009, 13(8B):2030-8, informan que los lisados de plaquetas de fibroblastos humanos promueven el cierre de herida por arañazos. En ciertas realizaciones, la presente invención se relaciona con uso de composiciones o componentes de lisado de plaquetas agotado en fibrinógeno para aplicaciones de curación de heridas. En ciertas realizaciones, la invención se relaciona con las composiciones de la invención para uso en métodos de tratamiento de heridas, los métodos que comprenden administrar o aplicar una composición que comprende componentes de lisado de plaquetas agotado en fibrinógeno al sujeto o en un área del sujeto con una herida. La composición farmacéutica puede estar en la forma de una loción o aceite o solución acuosa que contiene composiciones de lisado de plaquetas agotado en fibrinógeno.

## Condiciones

Como se usa aquí, el término "medio de cultivo celular" se refiere a cualquier medio capaz de soportar la proliferación in vitro de células de mamífero. Típicamente, esto comprenderá una solución isotónica a aproximadamente un pH 7.4 que contiene aminoácidos, uno o más antibióticos, vitaminas, sales y glucosa. Los ejemplos de medios que contienen algunos o todos estos criterios incluyen, pero no se limitan a, DMEM y RPMI.

Como se usa aquí, el término "heparina" se refiere a cualquier variedad de polisacáridos sulfatados, fragmentos y derivados que tienen propiedades anticoagulantes. Típicamente, las composiciones de heparinas son una mezcla con un intervalo de pesos moleculares de aproximadamente 3 kDa a aproximadamente 30 kDa. La heparina se enlaza al inhibidor enzimático antitrombina (AT). Cuando está enlazado, AT experimenta un cambio de conformación y se activa. El AT activado es capaz de inactivar la trombina y otras proteasas. Esto evita que la trombina convierta el fibrinógeno en fibrina, lo que interrumpe el proceso de coagulación.

Como se usa aquí, el término "MSC" se refiere a una célula madre mesenquimatosa, también conocida como célula del estroma mesenquimatoso. Un MCS humano se identifica típicamente mediante marcadores de superficie que incluyen CD29, CD44, CD45, CD51, CD71, CD73, CD90, CD105, CD106 y CD166. Las MSC son células pluripotentes que se pueden obtener de múltiples ubicaciones dentro del cuerpo, como médula ósea, tejido adiposo o sangre. Las MSC son el tipo de célula típico, pero no el único, que se prolifera usando las realizaciones descritas en esta divulgación.

Como se usa aquí, el término "PDGF" se refiere a un factor de crecimiento derivado de plaquetas. En el lisado de plaquetas humano, existen múltiples tipos de PDGF (Gen Bank No. de acceso AAA60552.1), incluidos PDGF-AB, PDGF-AA y PDGF-BB (Gen Bank no. de acceso CAA45383.1). Las tres isoformas de PDGF se enlazan a PDGFR $\alpha$ , mientras que PDGF-AB y PDGF-BB se enlazan a PDGFR $\beta$ . Ambos PDGFR son receptores de tirosina quinasa. Los PDGFR se fosforilan una vez enlazados por PDGF. Esto a su vez estimula la actividad catalítica de la quinasa, así como la formación de sitios de enlace para moléculas de señalización corriente abajo que contienen SH2. Ver Heldin et al., Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor, Physiol Rev, (1999), Oct;79(4):1283-316. El enlace de PDGF a PDGFR puede inducir numerosos efectos biológicos. PDGF tiene una amplia variedad de funciones biológicas. PDGF es fundamental para el desarrollo embrionario, participa en el desarrollo del sistema nervioso central, mantiene la presión del fluido intersticial, tiene un efecto angiogénico en el sistema vascular y se ha

demostrado que aumenta la tasa de curación de heridas. In vitro, el PDGF, como componente del lisado de plaquetas humano, ha demostrado ser una alternativa viable al FBS para células en proliferación, en particular las MSC. Véase, por ejemplo, Horn et al., Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells, *Cytherapy*, (2010), 12(7):888-98. El término PDGF no pretende limitarse a ninguna secuencia particular, siempre que haya suficiente homología de secuencia y atributos funcionales.

Experimental

Ejemplo 1: Fabricación de PL para recuperación y agotamiento de fibrinógeno.

Aproximadamente el 10% del volumen de citrato que actúa como un quelante de calcio se agrega a los productos de plaquetoféresis (phPL) para evitar la coagulación accidental del producto antes de las infusiones del paciente. La inserción de una etapa de recalcificación en el proceso de fabricación de phPL se probó para evaluar si se produce un producto más estable y uniforme. Como tal, se evaluaron varias concentraciones de cloruro de calcio y tiempos de incubación.

Durante estos estudios se evaluaron las siguientes condiciones.

1. PL+5mM CaCl<sub>2</sub>, RT (1-12 horas)
2. PL+5mM CaCl<sub>2</sub>, 37C (1-12 horas)
3. PL+10mM CaCl<sub>2</sub>, RT (1-12 horas)
4. PL+10mM CaCl<sub>2</sub>, 37C (1-12 horas)
5. PL+16mM CaCl<sub>2</sub>, RT (1-12 horas)
6. PL+16mM CaCl<sub>2</sub>, 37C (1-12 horas)
7. PL+20mM CaCl<sub>2</sub>, RT (1-12 horas)
8. PL+20mM CaCl<sub>2</sub>, 37C (1-12 horas)

Los datos de estos estudios demostraron que CaCl<sub>2</sub> 5 mM era incapaz de formar un coágulo a cualquier temperatura. 12 horas de CaCl<sub>2</sub> a 37 °C 10 mM fue capaz de formar un coágulo, sin embargo, este coágulo se solidificó casi por completo permitiendo una recuperación muy pequeña de los sobrenadantes. Las concentraciones más altas de CaCl<sub>2</sub> también generalmente formaron coágulos completamente rígidos si se dejan incubar durante más de 1 hora. En experimentos posteriores, las concentraciones de CaCl<sub>2</sub> se evaluaron entre 6-10 mM. Si ocurrió la coagulación, generalmente ocurrió rápidamente y fue completa. Además, hubo variabilidad entre lotes a la concentración de CaCl<sub>2</sub> necesaria para iniciar la formación de coágulos.

Para refinar aún más este proceso 1) se añadió heparina a una concentración de 2 U/mL para controlar el procedimiento de coagulación 2) se disolvió CaCl<sub>2</sub> en Plasmalyte vs agua para aumentar la estabilidad 3) se realizó una congelación descongelación doble para aumentar la lisis de la membrana plaquetaria, 4) se permitió que se formara el coágulo durante 1 hora a temperatura ambiente o 37 °C, luego durante la noche a 4 °C. Tras la dilución de phPL no modificado en medios de cultivo celular, el calcio presente en los medios basales es suficiente para abrumar la capacidad quelante de citrato que permite la conversión de fibrinógeno libre a fibrina que luego puede amalgamarse para formar un coágulo.

Se usaron los grupos 5-8 de nuestros primeros experimentos. Todos los grupos mostraron un cierto grado de formación de coágulos y la incubación de las soluciones durante la noche a 4 grados permitió que el coágulo se estabilizara. En comparación con nuestros primeros experimentos, los cambios implementados nos permitieron centrifugar la solución al día siguiente y recuperar la mayoría de las soluciones (es decir, 70-80 %), mientras que en los primeros experimentos con concentraciones más altas de CaCl<sub>2</sub> nuestra recuperación fue más cercana al 20 %. Al agregar heparina a la solución quedaba algo de fibrinógeno residual, sin embargo, esto no fue suficiente para causar la posterior formación de gel. Se hizo evidente que el uso de una congelación y descongelación doble resultó en la liberación de factores de crecimiento como PDGF-BB. En base a estos experimentos, un procedimiento de congelación y descongelación doble fue seguido por recalcificación con CaCl<sub>2</sub> 20 mM en presencia de 2 U/ml de heparina. Este proceso se realizó posteriormente en una serie de ejecuciones de fabricación para establecer regularidad. El producto FD-PL podría producirse de manera confiable de modo que el contenido de fibrinógeno fuera inferior a 4 ug/ml con una variabilidad aproximada del 12 % entre lotes. El phPL no procesado típicamente tenía un contenido de fibrinógeno de 60 µg/ml. De particular interés es el hecho de que, a pesar de la reducción en fibrinógeno, FD-PL y phPL contienen niveles similares de factores de crecimiento deseables como PDGF, TGF-beta, EGF y BDNF medidos por ELISA. Ver Figura 1.

A continuación se proporciona una preparación GMP típica de FD-PL (Multiplate FD) a partir de productos de plaquetoféresis humanos congelados. Aproximadamente cinco productos de plaquetoféresis de donantes humanos obsoletos reexaminados se retiraron de un congelador y se descongelaron durante la noche a 4 ° C. Las muestras se transfirieron luego a una sala limpia de clase 10,000 cGMP para volver a congelar a -20 ° C. Se tomaron pequeñas alícuotas de cada muestra para pruebas microbiológicas. Las muestras con alícuotas libres de contaminación se descongelaron durante la noche a 4 ° C. A continuación, las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos para sedimentar los residuos celulares utilizando un procesador de células COBE. Los sobrenadantes de cada muestra se pasaron a través de un filtro de 40 µm y luego se agruparon. Este filtrado de muestra agrupado se colocó luego en tubos de centrifuga de 250 ml para centrifugación a 3000 g durante 15 minutos a 4 ° C para sedimentar cualquier residuo restante. El sobrenadante de la muestra agrupada resultante recibió una identificación de ocho dígitos con base en la fecha (por ejemplo, 13 de diciembre de 2010 = 13122011). Luego se añadió CaCl<sub>2</sub> 16-20 mM (disuelto en Plasmalyte A) para recalificar y neutralizar el contenido de citrato en la muestra. Luego se agregaron 1.5-2.5 unidades/ml de heparina (1000 unidades/ml de solución madre) a la muestra para modular este proceso. La muestra se mantuvo a 37 ° C +/- 2 ° C durante 2-4 horas hasta que apareció un coágulo visual. La muestra se colocó a 4 ° C durante 16-24 horas hasta que el tamaño del coágulo se estabilizó. La muestra se centrifugó durante 15 minutos a 3000 g. La muestra se aclaró luego mediante filtración de 0.2 µm. La muestra se almacenó a 4 ° C o se congeló a una temperatura tan baja como -80±10 ° C. Si se congela, se tomó una pequeña alícuota de muestra agrupada para la prueba de esterilidad de micoplasma y la cuantificación de fibrinógeno/PDGF. La muestra fue aprobada si la detección de micoplasma fue negativa, la concentración de fibrinógeno fue inferior a 2 µg/ml y la concentración de PDGF-BB fue superior a 15 ng/ml.

Ejemplo 2: La reducción óptima de niveles de fibrinógeno no altera significativamente el factor bioquímico o de crecimiento, citoquina o quimiocina.

Las unidades de plaquetas descongeladas se filtraron individualmente a través de un filtro de transfusión de sangre PALL de 40 µm (PALL BIOMEDICAL, INC Fajardo, PR) y se dejaron agruparse en una bolsa de recolección. El lisado filtrado agrupado se dividió en partes alícuotas iguales en tubos cónicos de 250 ml marcados (Corning® Lowell, MA Estados Unidos) y se centrifugó durante 20 minutos a 4600 rpm a temperatura ambiente. El lisado centrifugado se filtró nuevamente (40 µm), se dividió en alícuotas en nuevos tubos cónicos de 250 ml marcados y se filtró progresivamente hasta 0.2 µm (PL no modificado). Alícuotas de lisado de plaquetas no modificado se combinaron luego con diversas concentraciones de CaCl<sub>2</sub> y se incubaron durante diversos tiempos a temperaturas específicas. Se encontró que una formulación preferida era una congelación y descongelación doble de las unidades de plaquetas seguido de recalificación a CaCl<sub>2</sub> 20 mM en combinación con sulfato de heparina 2 U/ml seguido de incubación a 37 ° C +/- 2 ° C durante 2 horas para permitir que se forme un coágulo. Esto fue seguido por una incubación de 16 horas a 4 ° C para permitir la estabilización del tamaño del coágulo. Este procedimiento permitió una reducción de fibrinógeno mayor de 150 veces, con una variabilidad entre lotes de aproximadamente 10 %. Bioquímicamente, la adición de CaCl<sub>2</sub> a Multiplate FD hace que la osmolaridad y las concentraciones de calcio y cloruro sean más altas que las del lisado de plaquetas sin procesar, sin embargo, numerosos otros factores, específicamente, Na, K, glucosa, proteína total y niveles de albúmina no fueron significativamente diferentes entre PL no modificado y Multiplate FD.

	Suero	PPP	FD-PL	PL
Osmolaridad	301	311	350	309
NA	140	141	154	160
K	4.1	>15	5	5
CL	105	100	123	85
Glu	92	101	217	247
Bun	11	12	12	14
Creat	0.94	1.04	1	1
CO	279	282	313	326
TPROT	7.1	7.1	5	5
ALB	4.6	4.5	3	3
CA	9.6	<2.0	>20	6
AP	45	<5	47	41
AST	30	30	36	42

El lisado de plaquetas difiere tanto del suero como del plasma en que contiene no solo productos normales de liberación de desgranulación de plaquetas, sino también componentes intracelulares que normalmente no se liberan. Además, el lisado de plaquetas contiene una concentración mucho mayor de plaquetas en comparación con el plasma o suero normal y, por lo tanto, la concentración de factores de liberación es considerablemente mayor. Para obtener una visión general amplia de las citoquinas y los factores de crecimiento prevalentes en plasma pobre en plaquetas (PPP), se emplearon suero y lisado de plaquetas y Multiplate FD en una tecnología de detección de matriz de proteínas. La tecnología se basa en el principio de inmunoensayo sándwich. Se inmovilizó un panel de anticuerpos (captura) en ubicaciones puntuales específicas en la superficie de una membrana. La incubación de membranas de matriz con muestras biológicas da como resultado la captura de citoquinas por los anticuerpos correspondientes. Las citoquinas unidas se detectan con un cóctel de anticuerpos biotinilados. Las señales se visualizan luego usando quimioluminiscencia. El uso de RayBio® Human Cytokine Antibody Array C4000 nos permitió detectar simultáneamente 174 citoquinas. Según el protocolo del fabricante, las membranas se incubaron con una cantidad equivalente de proteína total para PPP, suero o lisado de plaquetas y Multiplate FD diluido en medio  $\alpha$ -MEM.

Usando estas matrices, algunas proteínas se expresaron de manera similar entre los grupos; sin embargo, en algunos casos, el lisado de plaquetas y Multiplate FD mostraron una mayor expresión para varias proteínas. De particular interés son los niveles elevados de proteínas como las tres isoformas de PDGF, EGF y BDNF, así como los inhibidores de proteasas como TIMP-1 y PAI-1 que se encuentran en PL versus suero y PPP. Confirmando los datos de la matriz, los niveles de PDGF-BB, EGF, BDNF, TGF- $\beta$ 1 y VEGF se analizaron en PPP, suero, lisado de plaquetas y Multiplate FD. En comparación con PPP y suero, Multiplate FD y lisado de plaquetas phPL tuvieron concentraciones incrementadas para cada citoquina. En promedio (N=3 lotes) no hubo diferencias estadísticas entre los niveles de EGF, PDGF-BB, TGF- $\beta$ 1 o BDNF entre Multiplate FD y PL, sin embargo, la variabilidad entre lotes con respecto a PDGF-BB y TGF- $\beta$ 1 fueron menores en Multiplate FD en comparación con PL. El agotamiento del fibrinógeno del lisado de plaquetas da como resultado un producto más confiable con respecto a la consistencia.

Ejemplo 3: Multiplate FD es más estable que el lisado de plaquetas no procesado (phPL).

Se reportan estrategias para usar phPL como un suplemento de crecimiento para MSC. Sin embargo, los cultivos que emplean phPL como suplemento de crecimiento incluyen la adición de heparina (generalmente 2 U/ml) para prevenir la formación de gel de fibrina. Al trabajar con lisado de plaquetas no agotado en fibrinógeno (phPL), se observó que una vez fabricada y filtrada a 0.2  $\mu$ m, la solución es ópticamente transparente y no contiene residuos notables, sin embargo, al congelarla y descongelarla o al almacenarla a 4 ° C se forman nuevos precipitados en este phPL. Esto se acumula con el tiempo haciendo que la solución sea turbia, lo cual no puede eliminarse por centrifugación sola, por lo general requiere una nueva filtración. Por lo tanto, para obtener una mejor idea de si FD-PL era susceptible a una acumulación de precipitados similar, phPL y FD-PL se fabricaron a partir del mismo grupo de plaquetoféresis. Los productos se congelaron a -30 ° C hasta su uso. Luego se descongelaron alícuotas de phPL y FD-PL a 4 ° C durante la noche, se centrifugaron a 3000 xg durante 10 minutos para eliminar el crioprecipitado y se filtraron a 0.2  $\mu$ m, y el análisis de partículas se realizó inmediatamente o después del almacenamiento a 4 ° C durante 24 horas o 7 días.

El análisis de partículas se realizó en phPL y FD-PL utilizando un citómetro de flujo Beckmann Coulter Canto II utilizando señales de dispersión frontal y lateral para estimar tamaño, abundancia y granularidad de partículas. La potencia del láser para FSC y SSC se ajustó a escala logarítmica y se ajustó para garantizar que se registrarían partículas de todos los tamaños. Para obtener una cuantificación relativa de partículas, se estableció la recopilación de datos para cada muestra durante exactamente 15 segundos. Inmediatamente después de la filtración, tanto phPL como FD-PL detectaron una pequeña cantidad de residuos que no cambiaron notablemente en FD-PL con el tiempo. Por el contrario, incluso después de 24 horas de filtración, phPL mostró un aumento en número y tamaño de partículas, que continuó hacia afuera a los 7 días. El análisis microscópico podría demostrar una observación similar de tal manera que a los 7 días FD-PL estaba esencialmente libre de residuos, mientras que phPL contiene partículas de tamaño variable. Ver Figura 2. Usando el proceso de fabricación divulgado, se puede generar un producto de lisado de plaquetas que contiene significativamente menos residuos y es más estable.

Después de la fabricación sin procesar y Multiplate FD a partir del mismo grupo de 5 donantes de alícuotas de producto de plaquetoféresis, se congelaron a -80 ° C durante 1 mes. Posteriormente, se descongelaron alícuotas durante la noche a 4 ° C centrifugadas a 3000 xg para eliminar el crioprecipitado y luego se filtraron progresivamente a 0.2  $\mu$ m. Después de la filtración, el lisado de plaquetas sin diluir o diluido (20 % en Plasmalyte A) y Multiplate se analizaron inmediatamente por citometría de flujo en busca de residuos, luego se almacenaron a 4 ° C y posteriormente se analizaron cada día durante 4 días. Inmediatamente después de la filtración, tanto el lisado de plaquetas como el Multiplate FD tienen una cantidad similar de residuos tanto en las muestras no diluidas como en las diluidas, sin embargo, a las 24 horas hubo una acumulación significativa y progresiva de formación de residuos en el lisado de plaquetas en comparación con Multiplate FD. De acuerdo con nuestro análisis de citometría de flujo, la visualización de la acumulación de residuos demuestra que en Multiplate FD la acumulación de residuos es dramáticamente menor que el lisado de plaquetas y significativamente más pequeño. En el lisado de plaquetas, los

residuos parecen acumularse con el tiempo y para el día 3 estos agregados pueden alcanzar tamaños en el ámbito de 5-10  $\mu\text{m}$ , mientras que los residuos no parecen acumularse y generalmente son más pequeños que 2  $\mu\text{m}$ .

Ejemplo 4: Multiplate FD logra una rata superior de proliferación de MSC a FBS y lisado de plaquetas sin procesar, y mantiene propiedades inmunofenotípicas e inmunosupresoras.

Se han reportado MSC autólogas y alogénicas para tratar afecciones que involucran tanto isquemia como desregulación inmune. La mayoría de las manipulaciones celulares ex vivo han dependido de suero fetal bovino (FBS) para propagar MSC en cultivos adherentes. Como FBS es xenogénico, las células expuestas a él tienen el potencial de volverse inmunogénicas, y se ha reportado que la administración repetida de células cultivadas con FBS puede provocar reacciones adversas en pacientes. Con este fin, las MSC se han cultivado en alternativas a FBS derivadas de humanos, incluido suero y plasma rico en plaquetas humano. Se ha reportado que reemplazar FBS con factores de crecimiento derivados de plaquetas humanas (en la forma de lisado de plaquetas humano, hPL) puede promover el crecimiento de MSC.

Para evaluar si la funcionalidad como suplemento de crecimiento se retiene en FD-PL, se realizó una serie de experimentos in vitro para comparar el producto FD-PL con phPL. Las células primarias se probaron a partir del linaje mesenquimatoso, el linaje endotelial y epitelial. Las células mesenquimales se aislaron de la médula ósea de voluntarios sanos y se expandieron hasta el pasaje. Después del pasaje, se sembraron dos preparaciones de células estromales mesenquimales a 1000 células/cm<sup>2</sup> en matraces de cultivo de tejidos que contenían medios con FBS, phPL o FD-PL. Luego se permitió que las MSC crecieran durante 3 días, se cosecharon y se contaron los números de células. Luego se calculó el tiempo de duplicación de la población. Tanto phPL como FD-PL podrían reducir significativamente el tiempo de duplicación. Cuando se comparó directamente entre sí, MSC expandido en FD-PL tuvo un tiempo de duplicación menor en comparación con MSC en phPL (Figura 3). Fenotípicamente, las MSC cultivadas en FBS, phPL o FD-PL expresaron todos los marcadores típicos de MSC que incluyen: CD44, CD90, CD73, HLA-I, CD105 y no mostraron expresión de CD45, CD11b, CD34 o CD19. Estos experimentos indican que las MSC crecen más rápido en FD-PL en comparación con FBS y phPL, y no afecta negativamente a su inmunofenotipo.

Se ha reportado que las MSC efectúan la activación y proliferación de células T in vitro. Un mecanismo por el cual se propone que las MSC influyan en la proliferación de células T es a través de la Indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO). IDO es una enzima inmunomoduladora que cataliza la degradación del aminoácido esencial L-triptófano a N-formilkinurenina. IDO es la primera enzima limitante de la ruta del catabolismo del triptófano a través de la ruta de la kinurenina. Se ha demostrado que el agotamiento del triptófano local detiene el crecimiento de las células T. Las MSC no estimuladas no expresan IDO, sin embargo, la expresión del gen IDO aumenta rápidamente por las citoquinas inflamatorias como INF- $\gamma$ . La capacidad de las MSC para sobreregular la expresión de IDO se correlaciona con su capacidad para suprimir la proliferación de células T.

Para evaluar si las MSC cultivadas en phPL o FD-PL influyen en su capacidad de sobreregular IDO a estímulos inflamatorios, poblaciones de MSC derivadas de médula ósea se propagaron en phPL o FD-PL durante 2 pasajes (es decir, 2 semanas). Cada población se sembró en placas de 6 pozos a una densidad de 100,000 células/pozo durante la noche. Al día siguiente, las MSC se estimularon con 5 ng/ml de INF- $\gamma$  o se dejaron sin estimular en sus respectivos medios durante 4 horas. Las células se lavaron y se lisaron en regulador RLT con b-mercaptoetanol y se almacenaron a -80 ° C hasta que se extrajo el ARN. El ARN total libre de ADN se extrajo y se transcribió inversamente como se describe. Los ensayos de qPCR en tiempo real se realizaron por duplicado en un termociclador de sistema de PCR en tiempo real rápido ABI 7500 y SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems) con secuencia de cebadores humanos (5'3'PARR62 hacia adelante, en reverso) para IDO y b-actina (gen de mantenimiento). El análisis de PCR en tiempo real demostró que las MSC no estimuladas cultivadas en phPL o FD-PL no tienen cantidades sustanciales de expresión del gen IDO, sin embargo, 4 horas de estimulación con INF- $\gamma$  son suficientes para aumentar la expresión de IDO en MSC en ambos medios. Ver Figura 4.

Ejemplo 5: FD-PL suprime la proliferación de células T ex vivo

ConA es una lectina que se enlaza y activa de forma inespecífica las células T. PHA y PMA son compuestos de éster de forbol que pueden activar múltiples vías de señalización proliferativa en células. Se utilizó un protocolo de estimulación CD3/CD28 que es específico para las células T. Usando la estimulación CD3/CD28 de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) etiquetadas con el marcador fluorescente CFSE, se puede rastrear la proliferación a base de células T usando citometría de flujo en función de la disminución relativa de la intensidad de la señal y luego evaluar si un tratamiento afecta la proliferación de células T activadas.

Al realizar los ensayos de proliferación de PBMC con o sin MSC, se observó que cuando las PBMC solas se cultivaban en RPMI al 10 % con FBS y se estimulaban con perlas CD3/CD28, las células T se proliferaban vigorosamente, sin embargo, cuando FBS se reemplazaba por FD-PL las PBMC estimuladas no proliferaron. El análisis de tres experimentos separados revela que, en comparación con el suero, FD-PL pudo suprimir una respuesta proliferativa de células T en PBMC estimuladas en 4.7 veces en comparación con FBS.

Como las células de respuesta PBMC representan una mezcla heterogénea de células linfomieloides que incluyen linfocitos y monocitos (típicamente en una proporción de 4:1), se realizó una serie posterior de experimentos para determinar si FD-PL actuó directamente sobre células T o monocitos. Usando separación inmunomagnética, realizamos una selección negativa para derivar una población de células T y monocitos altamente purificados para compararlos con PBMC no fraccionadas. Cuando las PBMC solas se estimularon en suero, las células T experimentaron una proliferación robusta, mientras que en phPL la proliferación se redujo. Para nuestra sorpresa, cuando las células T solas fueron estimuladas, la proliferación se produjo tanto en cultivos de suero como de phPL. Por lo tanto, implica que FD-PL no inhibe directamente la proliferación de células T. Confirmando esta hipótesis, se realizaron experimentos de adición e indicaron que suplementar las células T con concentraciones específicas de monocitos podría reducir, de forma dependiente de la dosis, la proliferación de células T en las condiciones de phPL. Posteriormente, se realizó una serie de experimentos utilizando PBMC sin etiquetar cultivadas durante 3 días en suero, phPL o FD-PL (concentración del 10 %) y se descubrió que FD-PL solo es capaz de promover la unión y expansión de una población de monocitos positiva para CD11b y CD33 que es negativa para CD14 la cual no puede generarse fácilmente usando suero o phPL. Ver Figura 5. Por lo tanto, FD-PL tiene propiedades antiinflamatorias robustas in vitro a través de acciones únicas en monocitos.

Ejemplo 6: FD-PL es más versátil para el cultivo ex vivo de múltiples tipos de células.

Las células epiteliales corneales humanas (HCEC) primarias congeladas de Life technologies se expandieron a sus medios optimizados y cóctel de suplementos de crecimiento para un pasaje. Al subcultivar, se colocaron HCEC en diversas condiciones para determinar si el suero, phPL o FD-PL podrían reemplazar el cóctel de suplemento de crecimiento optimizado. Las HCEC se sembraron sobre placas a 50,000 células/pozo en placas de 6 pozos en medios que contenían

- a) Medios óptimos + cóctel de factor de crecimiento óptimo
- b) Medios óptimos + suero alogénico a concentración al 1, 5 y 10 %.
- c) Medios óptimos + phPL alogénico a concentración al 1, 5 y 10 %.
- d) Medios óptimos + FD-PL alogénico a concentración al 1, 5 y 10 %.

Después de tres días en cultivo, se recolectaron los HCEC para cada condición analizada para el número de células y viabilidad. Ver Figura 6. Los resultados demostraron que el aumento de la concentración de FD-PL potenciaba la viabilidad de los HCEC y que al aumentar la concentración podía producir una respuesta proliferativa dependiente de la dosis. La respuesta proliferativa en HCEC fue máxima a una concentración al 5 % y fue equivalente al cóctel de factor de crecimiento disponible comercialmente. Por el contrario, tanto el suero como el PL crudo redujeron la viabilidad al aumentar la concentración e, independientemente de la concentración, fueron incapaces de producir una respuesta proliferativa que fuera comparable al cóctel de factor de crecimiento disponible comercialmente. Por lo tanto, FD-PL mostró un perfil toxicológico potenciado y uso funcional en células epiteliales en comparación con suero o phPL.

Las MSC se cultivaron en medios que contenían FBS al 10 % (v/v), lisado de plaquetas no modificado o FD-PL. Se añadieron 2 unidades/ml de heparina a los medios que contenían lisado de plaquetas sin procesar para evitar la conversión de fibrinógeno en fibrina. La proliferación de MSC tanto en grupos de lisado de plaquetas sin procesar y FD-PL fue superior a la proliferación de MSC en el grupo FBS. Después de 72 horas.

Se cultivaron diversos tipos de células en medios que contenían FD-PL o phPL. Tanto FD-PL como phPL fueron capaces de cultivar MSC de origen humano, porcino y de primates. FD-PL también fue superior al suero y phPL en la generación ex vivo de células derivadas de monocitos inmunosupresores a partir de células mononucleares de sangre periférica no fraccionadas. FD-PL también fue capaz de propagar células 4T1, NIH 3T3, células epiteliales corneales humanas y células endoteliales humanas, mientras que phPL no promovió la expansión o supervivencia de estas células.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende componentes de lisado de plaquetas con una concentración de fibrinógeno de menos de 20 µg/ml.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición está agotada de fibrinógeno.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1, en donde los componentes del lisado de plaquetas no están agotados de PDGF.
4. Una composición de la reivindicación 1, en donde la composición es una solución acuosa.
5. La composición de la reivindicación 4, en donde la concentración de fibrinógeno es inferior a 10 µg/ml.
- 15 6. La composición de la reivindicación 4, en donde el PDGF es PDGF-BB y la concentración de PDGF-BB es mayor que 10 ng/ml.
- 20 7. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición está libre de crioprecipitado y/o residuos celulares.
8. La composición de la reivindicación 1, que comprende además componentes del medio de cultivo celular y/o heparina y/o una sal de calcio, opcionalmente en donde la sal de calcio es cloruro de calcio.
- 25 9. Una composición hecha por el proceso de eliminar agua de una composición de la reivindicación 4.
10. Un método para cultivar células, en donde las células se cultivan en un medio que comprende la composición de la reivindicación 1.
- 30 11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección ocular, en donde el método comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de la composición a un sujeto que lo necesite.
- 35 12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en un método de tratamiento de una herida o cierre de herida, en donde el método comprende la etapa de aplicar la composición a la herida.
- 40 13. Un método para preparar lisado de plaquetas agotado en fibrinógeno que comprende
- (a) lisar plaquetas proporcionando un lisado;
- (b) eliminar los residuos celulares; y
- (c) agotar el fibrinógeno del lisado de plaquetas formando una masa removible añadiendo una sal metálica bajo condiciones en donde la concentración de fibrinógeno es inferior a 20 µg/ml.
- 45 14. El método de la reivindicación 13, en donde los residuos celulares se eliminan por centrifugación o filtración; y/o en donde las plaquetas se lisan
- (a) mediante congelación y descongelación, opcionalmente, en donde la congelación y descongelación se realiza múltiples veces; o
- 50 (b) por lisis mecánica o un regulador de lisis.
- 55 15. El método de la reivindicación 13, en donde la sal metálica es una sal de calcio y opcionalmente en donde la sal de calcio es cloruro de calcio.

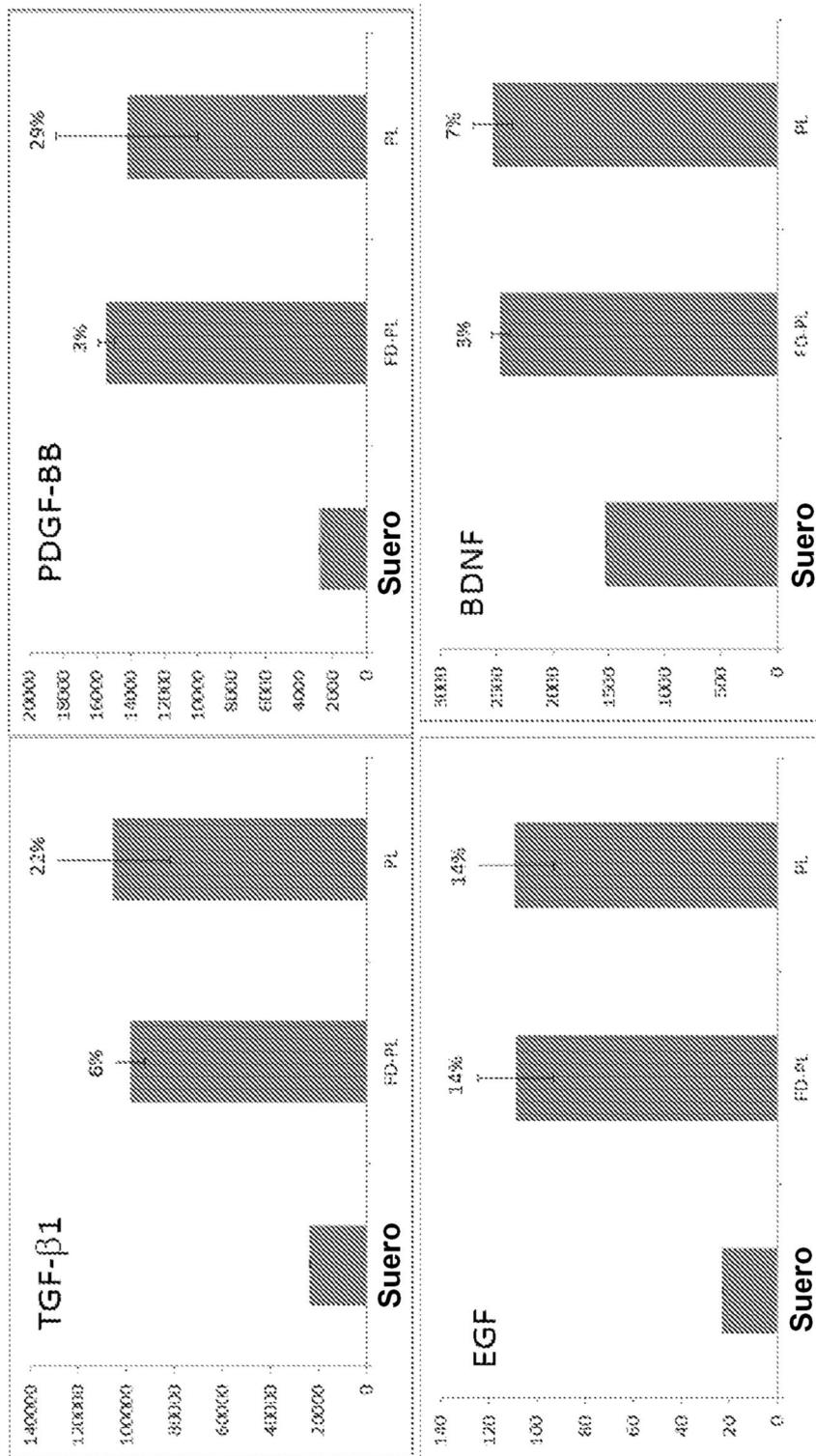
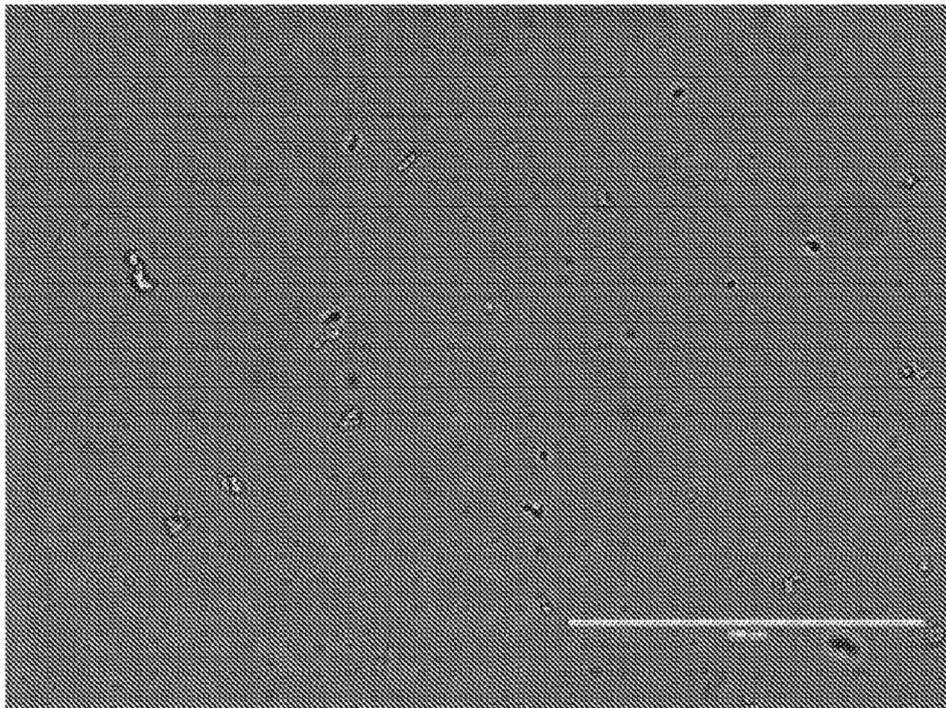
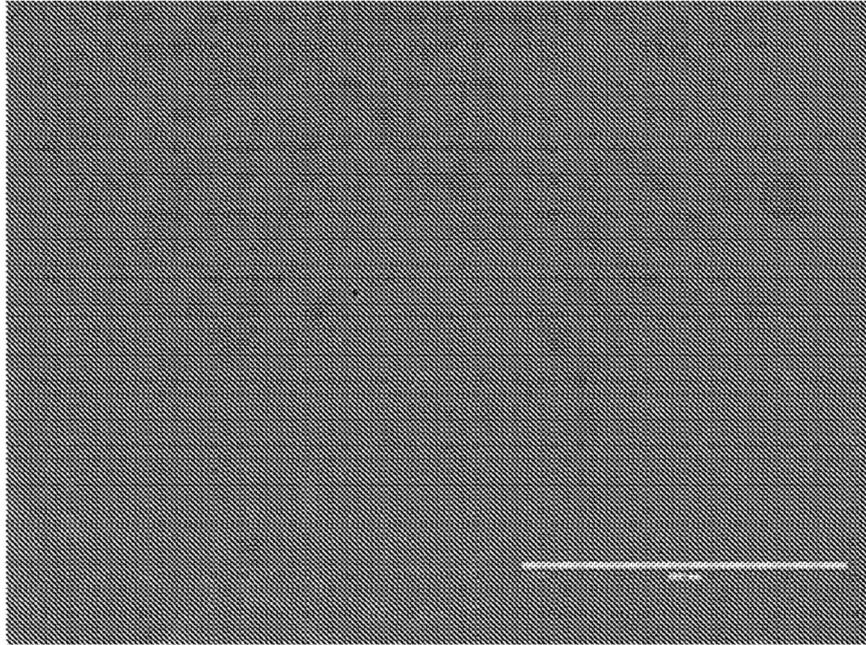


FIG. 1



**FIG. 2**

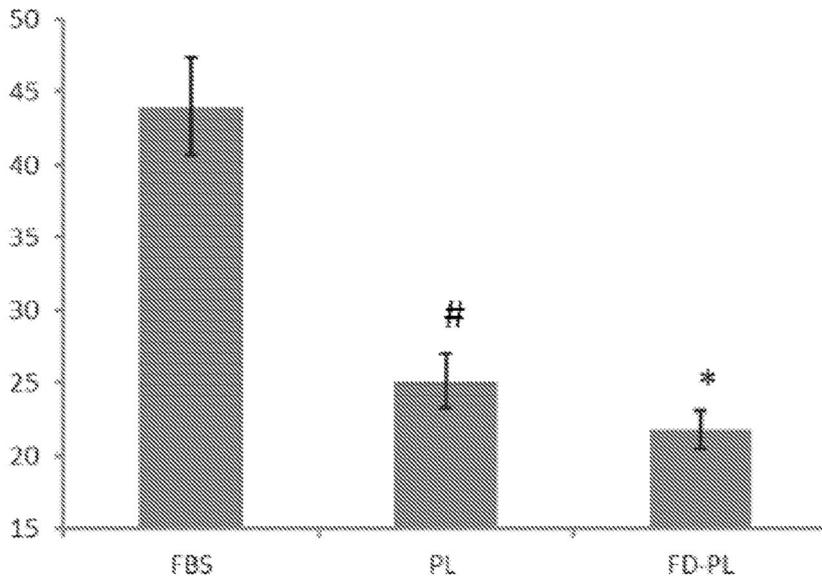


FIG. 3

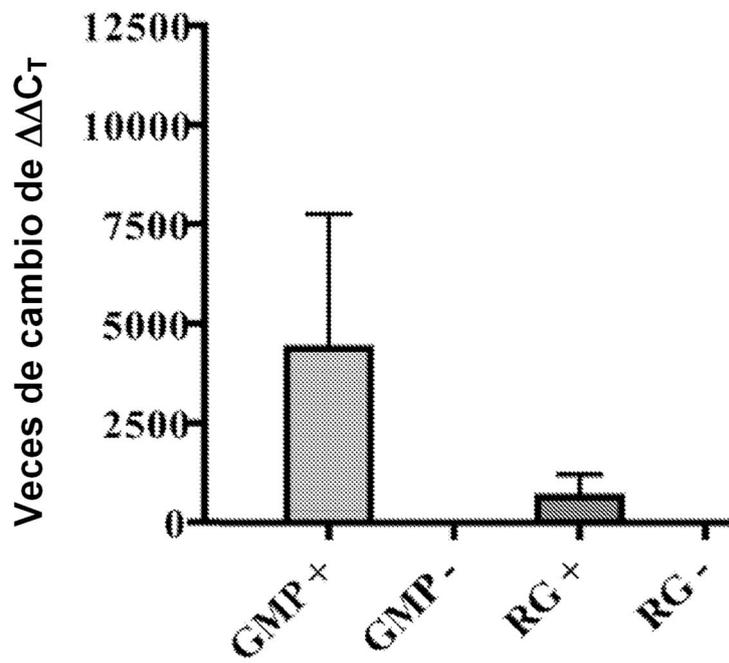
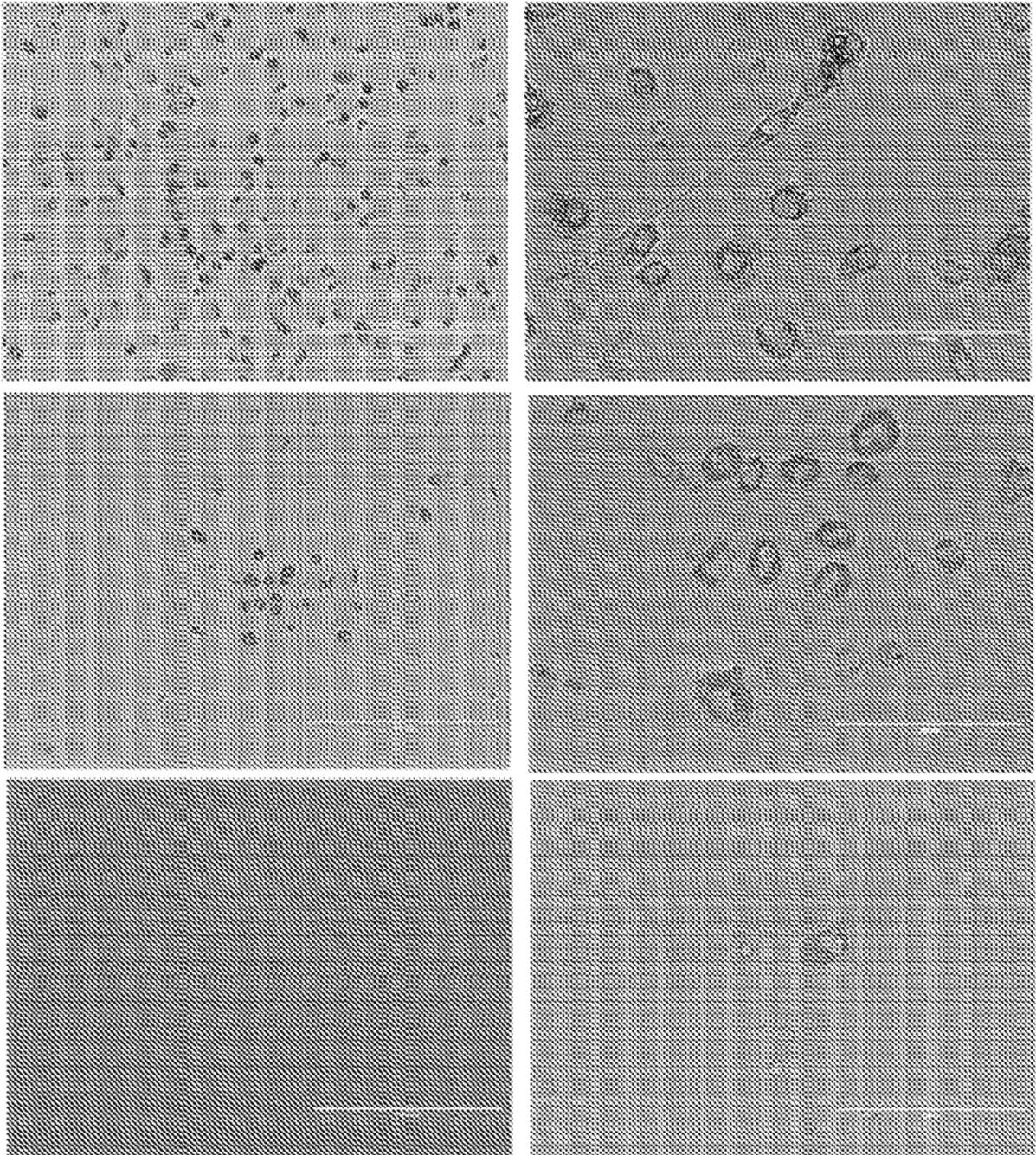


FIG. 4



**FIG. 5**

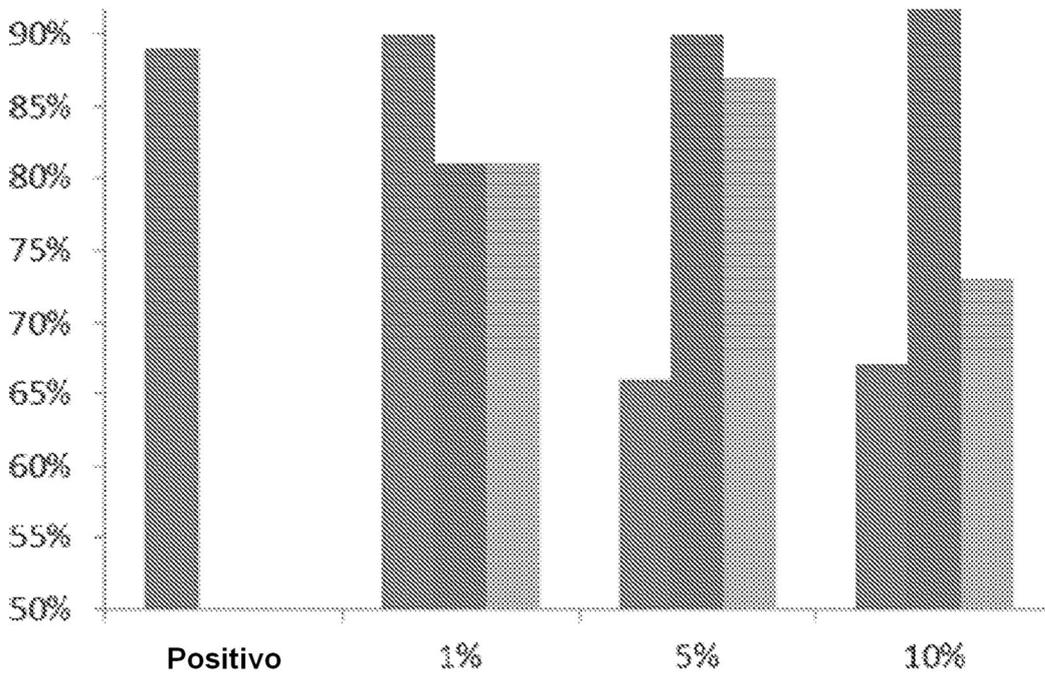
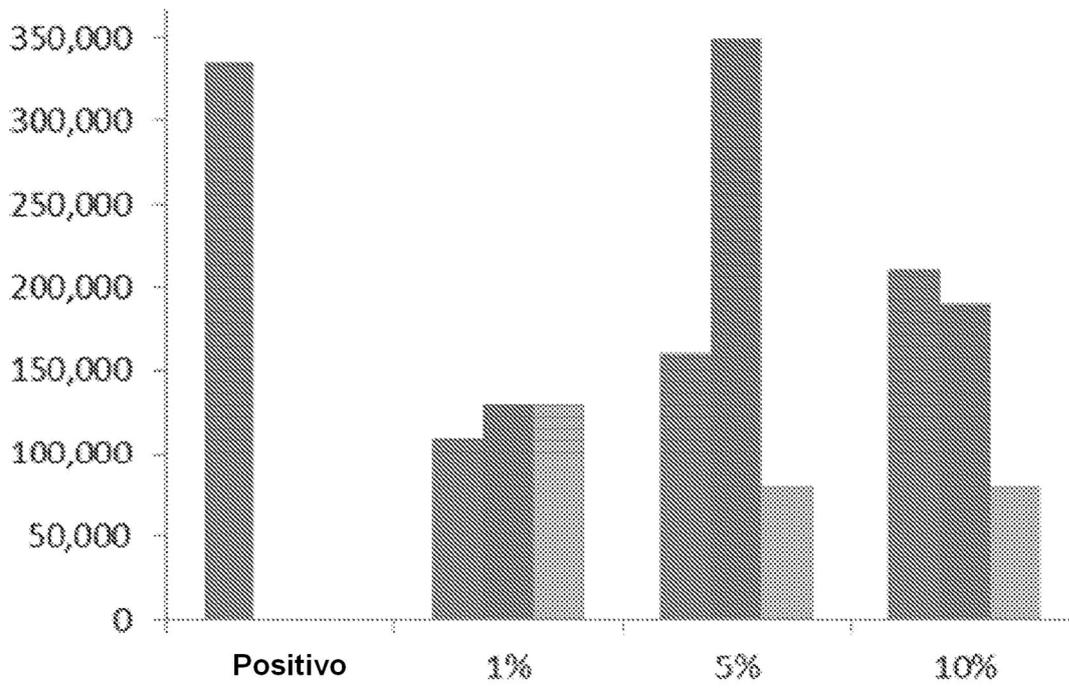


FIG. 6