(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 393 175**

(51) Int. Cl.:
A61K 35/14 (2006.01)
A61L 15/64 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61L 24/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **09807902 .3**
(96) Fecha de presentación: **24.08.2009**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2334307**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **22.06.2011**

(54) Título: **Producto sanguíneo multicapa**

(30) Prioridad:
22.08.2008 WO PCT/DK2008/000299

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.12.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.12.2012

(73) Titular/es:
REAPPLIX APS (100.0%)
Blokken 45
3460 Birkerød, DK

(72) Inventor/es:
LUNDQUIST, RASMUS y
HOLM, NIELS ERIK

(74) Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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).

ES 2 393 175 T3

DESCRIPCION

Producto sanguíneo multicapa.

Campo técnico

La presente invención se refiere a un producto sanguíneo multicapa, a un método para preparar el producto sanguíneo, a un producto sanguíneo obtenible por el método y a un medio recipiente preparador del producto sanguíneo.

Antecedentes de la técnica

El sistema de coagulación humano es capaz de detener el sangrado e iniciar la curación. La función del sistema es muy conocida y está exhaustivamente investigada. Sin embargo, la importancia de los productos de coagulación en la iniciación de la curación solo se ha reconocido recientemente.

Productos sanguíneos tales como selladores de fibrina y concentrados de plaquetas se producen aislando el plasma rico en plaquetas (PRP) a partir de sangre íntegra anticoagulada. La presencia de plaquetas y plasma inicia parcialmente el sistema natural de coagulación humano por activación de la trombina. Esto conduce a un concentrado autólogo plaquetario de factores promotores de crecimiento en una matriz de fibrina. Tal composición se puede usar para cubrir superficies de heridas y se reivindica para iniciar la curación.

La publicación “Fibrina rica en plaquetas (PRF): Un concentrado plaquetario de segunda generación. Parte I: Conceptos tecnológicos y evolución, Cirugía Oral, Medicina Oral, Patología Oral, Radiología Oral, Endodoncia 2006; 101:E37-44”, por David M. Dohan y colaboradores, describe cómo preparar una red de fibrina sólida rica en plaquetas a partir de sangre íntegra sin añadir aditivos o reactivos. El protocolo de PRF es como sigue: Se toma una muestra de sangre sin anticoagulante en tubos de vidrio de 10 mL o de plástico revestido de vidrio que se centrifugan inmediatamente a 400 g aproximadamente durante 10 minutos. La ausencia de anticoagulante implica la activación, en pocos minutos, de la mayoría de las plaquetas de la muestra de sangre en contacto con las paredes de los tubos de vidrio y la liberación de las cascadas de coagulación. El fibrinógeno se concentra inicialmente en la parte superior del tubo antes de que la trombina circulante lo transforme en fibrina. Se obtiene entonces un coágulo de fibrina en el centro del tubo, que se extiende desde la parte superior de los glóbulos rojos de la parte inferior del tubo al plasma acelular de la parte superior. Las plaquetas son atrapadas de forma masiva en las mallas de fibrina. El éxito de esta técnica depende totalmente de la velocidad de la recogida de sangre y su traslado a la centrífuga. De hecho, sin anticoagulante, las muestras de sangre comienzan a coagular casi inmediatamente después del contacto con el vidrio de tubo, y se necesita un mínimo de unos pocos minutos de centrifugación para concentrar fibrinógeno en la parte media y superior del tubo. La manipulación rápida es la única forma de obtener un coágulo de PRF utilizable clínicamente. Si la duración requerida para recoger la sangre e iniciar la centrifugación es demasiado larga, se producirá fallo: la fibrina se polimerizará de manera difusa en el tubo y se obtendrá solamente un pequeño coágulo de sangre sin consistencia. En conclusión, el protocolo PRF hace posible recoger un coágulo de fibrina cargado de suero y plaquetas. Separando el coágulo del tubo, cortando manualmente la parte de los glóbulos rojos, y expulsando manualmente los fluidos atrapados en la matriz de fibrina (suero), los profesionales obtendrán membranas de fibrina autóloga.

Sin embargo, esta red de fibrina incluye un trombo rojo que contiene una parte sustancial de glóbulos rojos, que tiene que ser cortado manualmente. Además, los componentes de la red de fibrina producida tales como fibrina, leucocitos y trombocitos, están distribuidos arbitrariamente y atrapados dentro del producto. La recuperación de leucocitos no está descrita, y la recuperación de leucocitos es pequeña a la baja fuerza *g* usada porque algunos se encuentran en la parte de los glóbulos rojos. El enredamiento de células dentro de la fibrina conduce a la liberación lenta o ausente de estas células y por tanto inhibe el potencial antimicrobiano, dependiente de contacto, de los leucocitos incluidos.

La publicación “, Cirugía Oral, Medicina Oral, Patología Oral, Radiología Oral, Endodoncia 2006; 101:E37-44 y 2006; 101:E45-50” por Dohan y colaboradores describe una red que no representa un concentrado de plaquetas en una forma y estructura, que es directamente aplicable para cubrir superficies de heridas. Para obtener una forma y estado/rigidez utilizable para cubrir superficies de heridas y evitar la inclusión de glóbulos rojos, la conocida red de fibrina sólida rica en plaquetas tendrá que ser reformada manualmente y comprimida. Además, el método comprende varias etapas y no se puede preparar en un sistema cerrado, y por tanto no es conveniente para uso clínico.

La publicación “Separación celular en la capa leucoplaquetaria. Biorreología. 1988; 25(4):663-73”, por Sutton y colaboradores, describe cómo la sangre íntegra anticoagulada se separa en varias capas tras centrifugación o sedimentación pasiva; glóbulos rojos, leucocitos y plaquetas (= capa leucoplaquetaria) y plasma. Además, usando fuerza centrífuga de 10000 *g* durante 10 minutos y usando un flotador de densidad de 1,053, la capa leucoplaquetaria se puede fijar por glutaraldehído y separar para investigación; sin embargo, ésta no se puede usar clínicamente debido a la toxicidad del glutaraldehído. Existen varios métodos para extraer la capa leucoplaquetaria de sangre anticoagulada que incluyen el uso de sustancias determinadas por la densidad (por ejemplo Lymphoprep).

Además de la necesidad de sangre anticoagulada las células extraídas se suspenderán – y se mezclarán (desorganizarán) – en el plasma que inevitablemente estará incluido.

El documento EP 1637145A describe un método de filtración de células de una suspensión (por ejemplo, células sanguíneas que incluyen plaquetas y leucocitos) a través de una membrana porosa de tipo laminar, dejando las células en la membrana como se ha descrito. El material poroso laminar se puede preparar a partir de fibrina. Sin embargo, no se obtiene estructura alguna en capas, las células son atrapadas en profundidad en el material poroso y el uso de fibrina alogénica aumenta el riesgo de infección cruzada de otros seres humanos. Además, el método comprende varias etapas y no se puede preparar en un sistema cerrado y por tanto no es conveniente para uso clínico.

Los métodos conocidos están limitados en su uso, especialmente el uso clínico. La adición de anticoagulantes antes de la separación celular conduce a productos no completamente autólogos, además la liberación de sustancias que favorecen la curación de heridas (por ejemplo factores de crecimiento) requiere la mezcla con otras sustancias no autólogas (por ejemplo, trombina, Ca_2^+, etc.) que conduce a productos finales homogéneos sin la distribución de células deseada.

Métodos conocidos que excluyen la anticoagulación conducen a una distribución desorganizada de células, las células están bloqueadas en el interior del producto, restringiéndose así la liberación y potencial de estas células. Además estos métodos necesitan manipulación manual fuera de un sistema cerrado para obtener un producto físicamente adecuado para uso clínico, una manipulación definida inadecuadamente que conduce a un resultado variable con un rendimiento celular inferior al óptimo. Además, la manipulación manual requerirá tiempo de trabajo (coste) y prologar el tiempo de preparación.

Los métodos que describen una estructura bien definida en capas dependen de la anticoagulación y adición de componentes tóxicos, no adecuados para uso clínico, para la fijación y autosostenibilidad de la estructura obtenida.

Descripción de la invención

El objetivo de la invención es proporcionar un producto sanguíneo nuevo y mejorado que supera o mejora al menos uno de los inconvenientes de la técnica anterior o que proporciona una alternativa útil. Además el objetivo de la invención es proporcionar un método nuevo y mejorado para obtener el producto sanguíneo que supera o mejora al menos uno de los inconvenientes de la técnica anterior o que proporciona una alternativa útil.

El objetivo de la invención se obtiene por un producto sanguíneo que comprende componentes de la sangre íntegra, especialmente fibrina, trombocitos y leucocitos, comprendiendo el producto sanguíneo una primera capa, una segunda capa y una tercera capa, siendo la segunda capa adyacente a la primera capa y tercera capa, definiendo la primera capa una primera superficie exterior del producto sanguíneo y definiendo la tercera capa una segunda superficie exterior del producto sanguíneo, comprendiendo la primera capa una mayoría de fibrina, comprendiendo la segunda capa una mayoría de trombocitos y comprendiendo la tercera capa una mayoría de leucocitos. Por esta razón se proporciona un producto sanguíneo con una estructura de multicapas, cada capa proporciona funcionalidad diferente debido a la composición diferente de cada una de las capas. El producto sanguíneo es autosustentable, compacto y sólido, y el producto sanguíneo tiene una estructura tal que el producto sanguíneo es aplicable directamente para el uso deseado. Por mayoría se entiende que un componente, tal como fibrina, trombocitos o leucocitos, comprende al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o incluso 100%, o cualquier intervalo que se puede definir a partir de combinaciones de estos porcentajes mencionados, en volumen y/o peso de la respectiva capa y/o en volumen y/o peso del producto sanguíneo. La primera, segunda y tercera capa es cada una continua y sustancialmente paralela una a otra, formando por ejemplo un producto sanguíneo estratificado y/o en multicapas. El producto sanguíneo consiste preferiblemente en tres capas, por ejemplo una primera capa que comprende una mayoría de fibrina, una segunda capa que comprende una mayoría de trombocitos, y una tercera capa que comprende una mayoría de leucocitos. El producto sanguíneo tiene preferiblemente una máxima relación anchura/espesor de 1, 2, 3, 4 ó 5, sin embargo la relación puede ser hasta 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o incluso hasta 100, donde la anchura se mide a lo largo de las capas del producto sanguíneo y el espesor se mide perpendicular a las capas del producto sanguíneo.

En otro aspecto de la invención, el producto sanguíneo consiste solamente en componentes de la sangre íntegra. Por esta razón se proporciona un producto sanguíneo que consiste solamente en componentes de sangre íntegra, significando que no se añaden aditivos a la sangre íntegra y/o producto sanguíneo, y que el producto sanguíneo es derivable directamente de sangre íntegra, fracciones de sangre íntegra o combinaciones de fracciones de sangre íntegra.

En otro aspecto de la invención el producto sanguíneo es autólogo.

En otro aspecto de la invención el producto sanguíneo es flexible. Por esta razón se proporciona un producto sanguíneo que puede resistir tensión aplicada durante el uso normal sin rotura. Debido a la flexibilidad del producto sanguíneo, el producto sanguíneo se ajusta a los contornos más continuos donde se aplica el producto sanguíneo.

En otro aspecto de la invención, el producto sanguíneo comprende además una primera sustancia elegida de un grupo que comprende fibroblastos, células queratinocíticas y ácido hialurónico. Por esta razón se proporciona un producto sanguíneo que incluye células adicionales conocidas por ser importantes para la regeneración de la piel y de este modo proporciona además el potencial curativo de heridas crónicas, especialmente heridas en áreas con tejido adyacente inferior o inviable. El ácido hialurónico, un componente conocido de la piel, tiene el potencial de aumentar la capacidad enlazante de agua del producto sanguíneo así como aumentar el potencial para la incorporación/infiltración del producto sanguíneo en áreas de pérdida de tejido.

La invención se refiere también a un producto sanguíneo para uso terapéutico y/o uso de un producto sanguíneo de acuerdo con el mencionado anteriormente para uso terapéutico.

La invención se refiere también al uso de un producto sanguíneo para la fabricación de un medicamento para uso terapéutico.

La invención se refiere también a un producto sanguíneo para tratamiento de una herida y/o al uso de un producto sanguíneo de acuerdo con el mencionado anteriormente para tratamiento de una herida.

La invención se refiere también al uso de un producto sanguíneo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una herida. Por esta razón se proporciona un producto sanguíneo que es particularmente adecuado para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una herida. Aplicando la segunda superficie exterior definida por la tercera capa contra la herida, la herida se preserva y/o se mantiene sustancialmente estéril, por ejemplo libre de infección, porque la tercera capa comprende una mayoría de leucocitos que son las primeras células activas y por tanto controla la infección y atrae otras células incluyendo macrófagos, mientras que la segunda capa comprende una mayoría de trombocitos que comprenden factores promotores de crecimiento que estimulan las células fibroblásticas, mientras que la primera capa del producto sanguíneo comprende una mayoría de fibrina, y por tanto la primera superficie exterior del producto sanguíneo proporciona una protección eficaz frente a la contaminación desde el ambiente; la primera capa comprende además factores promotores de crecimiento, que se libera a lo largo del tiempo. Aplicando la segunda superficie exterior definida por la tercera capa contra la herida, la herida se preserva y/o se mantiene sustancialmente libre de infección, porque la tercera capa comprende una mayoría de leucocitos que se liberan fácilmente del producto. Los leucocitos son células del sistema inmune que defienden al organismo frente a infecciones y cuerpos extraños, por tanto controlan las infecciones y además atraen otras células incluyendo macrófagos. La segunda capa comprende una mayoría de trombocitos que comprenden factores promotores de crecimiento que estimulan las células. Como los leucocitos se liberarán rápidamente del producto, la segunda capa cubrirá la superficie de la herida para la liberación óptima de sustancias promotoras de crecimiento a la herida. La primera capa del producto sanguíneo comprende una mayoría de fibrina, y por tanto la primera superficie exterior del producto sanguíneo proporciona una protección eficaz frente a la contaminación desde el ambiente; la primera capa comprende además factores promotores de crecimiento, que se libera a lo largo del tiempo.

La invención se refiere también a un producto sanguíneo para uso autólogo y/o uso de un producto sanguíneo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para uso autólogo.

La invención se refiere también al uso de un producto sanguíneo para la fabricación de un medicamento autólogo.

La invención se refiere también a un producto sanguíneo para uso quirúrgico, por ejemplo para sellar un área, para evitar adherencia post-quirúrgica y/o usar en procedimientos de anastomosis y/o usar un producto sanguíneo de acuerdo con el mencionado anteriormente para uso quirúrgico.

La invención se refiere también al uso de un producto sanguíneo para la fabricación de un medicamento para uso quirúrgico.

En otro aspecto de la invención, el producto sanguíneo es para anastomosis. Uso de un producto sanguíneo que se obtiene por un método de acuerdo con lo mencionado anteriormente para anastomosis.

En otro aspecto de la invención, el producto sanguíneo se usa para la fabricación de un medicamento para anastomosis.

La invención se refiere también a un método para preparar un producto sanguíneo a partir de un volumen de sangre íntegra, comprendiendo el método las etapas siguientes: a) colocar el volumen de sangre íntegra en un medio recipiente, comprendiendo el medio recipiente un primer material que define una superficie interna con la que la sangre íntegra está en contacto, b) activar la coagulación de la sangre íntegra, c) separar la sangre íntegra en eritrocitos, suero y producto sanguíneo por una fuerza centrífuga que actúa sobre la sangre íntegra colocada en el medio recipiente, con lo cual la sangre íntegra se separa en capas que comprenden eritrocitos, producto sanguíneo y suero debido a las diferencias de densidades entre eritrocitos, producto sanguíneo y suero, comprendiendo el producto sanguíneo fibrina, leucocitos y trombocitos, siendo la fuerza centrífuga aplicada al menos 1000 veces mayor que la fuerza de la gravedad, por ejemplo *g*, que actúa sobre la sangre íntegra, y d) separar el producto sanguíneo del medio recipiente. Por esta razón se proporciona un método por el que se deriva un producto sanguíneo a partir de sangre íntegra. El método se puede procesar en un ciclo en un sistema cerrado, puesto que no

hay necesidad de un aislamiento de los eritrocitos; sin embargo el método se puede realizar también usando un aislamiento de los eritrocitos.

El rendimiento del método para extraer fibrina a partir de sangre íntegra es al menos superior a 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o incluso 100%, mientras que el rendimiento del método para extraer leucocitos a partir de sangre íntegra es al menos superior a 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o incluso 100%, mientras que el rendimiento del método para extraer trombocitos a partir de sangre íntegra es al menos superior a 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o incluso 100%. El producto sanguíneo obtenible tiene un volumen menor que 30%, 20%, 15%, 10% o incluso menor que 5% del volumen de la sangre íntegra. Por esta razón se proporciona un método por el que se obtiene un producto sanguíneo, por ejemplo por centrifugación que da lugar a una fuerza centrífuga. La fuerza centrífuga aplicada es al menos 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000, 13000, 14000, 15000, 16000, 17000, 18000, 19000 o incluso 20000 veces mayor que la fuerza de la gravedad, por ejemplo *g*, que actúa sobre la sangre íntegra, o la fuerza centrífuga aplicada está dentro de cualquier intervalo que puede definirse a partir de combinaciones de los números mencionados. La fuerza centrífuga se aplica durante al menos 30 segundos, 40 segundos, 50 segundos, 60 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 11 minutos, 12 minutos, 13 minutos, 14 minutos, 15 minutos, 16 minutos, 17 minutos, 18 minutos, 19 minutos, 20 minutos, 21 minutos, 22 minutos, 23 minutos, 24 minutos, 25 minutos, 26 minutos, 27 minutos, 28 minutos, 29 minutos o 30 minutos, o la fuerza centrífuga se aplica dentro de cualquier intervalo que se puede definir a partir de combinaciones de los números mencionados.

En un aspecto de la invención, el rendimiento del método para extraer fibrina a partir de la sangre íntegra es al menos superior a 60%.

En un aspecto de la invención, el rendimiento del método para extraer leucocitos a partir de la sangre íntegra es al menos superior a 50%.

En un aspecto de la invención, el rendimiento del método para extraer trombocitos a partir de la sangre total es al menos superior a 60%.

En un aspecto de la invención, la fuerza centrífuga se aplica durante al menos 30 segundos.

En un aspecto de la invención, el producto sanguíneo consiste únicamente en componentes de la sangre íntegra. Por esta razón se proporciona un método por el que se deriva un producto sanguíneo a partir de sangre íntegra, por tanto consistiendo únicamente en componentes de la sangre íntegra. Por tanto el método se realiza sin añadir aditivos a la sangre íntegra y/o al producto sanguíneo.

En otro aspecto de la invención, la coagulación en la etapa b) se activa por el primer material que define la superficie interna. Por esta razón se proporciona un método en el que la coagulación se inicia cuando la sangre íntegra se pone en contacto con la superficie interna, por tanto se puede evitar el añadir cualquier objeto o similar a la sangre íntegra para iniciar la coagulación.

En otro aspecto de la invención, la coagulación en la etapa b) se activa exponiendo la sangre íntegra a un objeto, tal como una perla de vidrio. Por esta razón se proporciona un método en el que la coagulación se inicia cuando la sangre íntegra se pone en contacto con el objeto añadido a la sangre íntegra. Por esta razón la coagulación se puede iniciar en un momento elegido que es óptimo para el método.

En otro aspecto de la invención, el primer material de la superficie interna del medio recipiente se elige de un grupo que comprende poli(propileno), poli(etileno), policarbonato, poliamida, acrilonitrilo butadieno estireno, estireno, estireno modificado, poliuretano y otros materiales poliméricos. Los polímeros del grupo mencionado pueden además estar rellenos de vidrio. Por esta razón se proporciona un método donde el medio recipiente con una superficie interna de un primer material puede ser tubos de ensayo típicos o similares, producidos a partir de toda clase de polímeros, metal o vidrio. Se puede elegir también el material de manera que la propiedad del material proporciona una fuerza adhesiva/fricción mínima entre el producto sanguíneo y la superficie interna. Se prefieren poliamida y poliuretano porque estos materiales inician la coagulación dentro de un nivel preferido de activación que es superior al nivel obtenido usando otros polímeros.

En otro aspecto de la invención, la superficie interna del medio recipiente es superficie tratada, por ejemplo revestida, con el fin de reducir la fricción entre el producto sanguíneo y la superficie interna del primer material. Por esta razón se proporciona un método en el que un medio recipiente con una superficie interna de un primer material puede ser tubos de ensayo o similares producidos a partir de toda clase de polímeros, metal o vidrio. La superficie interna puede ser superficie tratada y/o revestida para obtener un mínima fuerza adhesiva/fricción entre el producto sanguíneo y la superficie interna.

En otro aspecto de la invención, la fuerza centrífuga es mayor que una fuerza adhesiva que actúa entre la superficie interna y el producto sanguíneo. Por esta razón se proporciona un método en el que la fuerza centrífuga predomina con respecto a la fuerza adhesiva, lo que asegura una estructure en capas bien definida del producto sanguíneo. La fuerza centrífuga puede ser al menos 10, 100, 1000, 5000, 10000, 20000, 50000, 100000, 1000000 o incluso

10000000 veces mayor que la fuerza adhesiva, o la fuerza centrífuga está dentro de cualquier intervalo que se puede definir a partir de combinaciones de los números mencionados. En otro aspecto de la invención, la fuerza centrífuga y tiempo de centrifugación es de tal magnitud que la fuerza adhesiva que actúa entre la superficie interna y la fibrina se interrumpe/libera y permitiendo con ello que la capa de fibrina se compacte/comprima. Por esta razón se proporciona un método en el que la fuerza centrífuga es dominante en comparación con la fuerza adhesiva, lo que asegura una estructura en capas bien definida del producto sanguíneo. La fuerza centrífuga necesaria para liberar la adhesión a la pared dependerá de la densidad de la fibrina. La densidad de la fibrina dependerá de varios factores que incluyen la activación de la coagulación, concentración de fibrina, tiempo, etc. La fuerza de centrifugación puede ser al menos 10, 100, 1000, 5000, 10000, 20000, 50000, o incluso 100000, *g*, o la fuerza centrífuga está dentro de cualquier intervalo que se puede definir a partir de combinaciones de los números mencionados.

En otro aspecto de la invención, el producto sanguíneo que se adhiere a la superficie interna está separado de la superficie interna, al menos una vez, durante la etapa c). Por esta razón se proporciona un método en el que la posible adhesión del producto sanguíneo a la superficie interna se puede abordar separando el producto sanguíneo al menos una vez durante la etapa c). La separación se puede realizar por medios mecánicos tales como por recorte o similares. La compactación de la fibrina se puede realizar a una fuerza *g* inferior porque la fuerza *g* no necesita liberar la fibrina de la pared.

En otro aspecto de la invención, el método comprende además una etapa de compactación, en la que el producto sanguíneo se compacta por un medio compactador, tal como un filtro colocado en el medio recipiente. Por esta razón se proporciona un método en el que el producto sanguíneo se puede compactar, por ejemplo por un filtro. El filtro se puede colocar fijo o movible en el medio recipiente y el filtro se puede usar para aislar el producto sanguíneo.

En otro aspecto de la invención, el método comprende además una etapa de aislamiento en la que los eritrocitos se aíslan del producto sanguíneo durante la etapa c). Por esta rezón se proporciona un método en el que los eritrocitos se aíslan del suero y producto sanguíneo durante el método.

En otro aspecto de la invención, el método comprende además una etapa de lavado en la que el producto sanguíneo se lava de manera que prácticamente todos los eritrocitos y/o suero unidos al producto sanguíneo se separan. Por esta razón se proporciona un método de manera que el producto sanguíneo está sustancialmente limpio de otros componentes, los del mismo producto sanguíneo. El suero formado durante la centrifugación se puede usar como un fluido de lavado.

En otro aspecto de la invención, el medio recipiente es un tubo que comprende un extremo abierto, que se puede cerrar por una tapadera separable, y un extremo cerrado. Por esta razón se proporciona un método en el que se puede usar un tubo de ensayo estándar o similar para realizar el método.

En otro aspecto de la invención, la etapa b) precede a la etapa a). Por esta razón la coagulación se puede activar antes de que la sangre íntegra se coloque en el medio recipiente, por tanto el medio recipiente no necesita comprender ningún activador de coagulación y/o la sangre íntegra no necesita comprender un activador de coagulación cuando la sangre íntegra está colocada en el medio recipiente. La coagulación se puede activar, como un ejemplo, durante la extracción de sangre colocando perlas de vidrio en el tubo de extracción de sangre, o eligiendo un material de tubo que active la sangre. Por tanto se puede evitar añadir cualquier objeto o similar a la sangre íntegra para iniciar la coagulación.

En otro aspecto de la invención, la etapa b) sucede al menos 1 minuto antes de la etapa a). Por esta razón se proporciona un método en el que no es necesaria manipulación muy rápida. La etapa b) puede suceder al menos 30 segundos, 40 segundos, 50 segundos, 60 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 11 minutos, 12 minutos, 13 minutos, 14 minutos, 15 minutos, 16 minutos, 17 minutos, 18 minutos, 19 minutos o incluso 20 minutos antes de la etapa a). El nivel de activación de la coagulación en la etapa b) se puede controlar también por el método. Esto permite que se prolongue el tiempo entre la etapa b) y a) porque la separación celular en la etapa c) ha de suceder antes de que los niveles de fibrina sean suficientes para inhibir la separación celular.

En otro aspecto de la invención, la etapa b) sucede al mismo tiempo que la etapa c). Por esta razón la coagulación se puede activar en un momento óptimo para el método durante la etapa c). La coagulación se puede activar/iniciar por un activador de coagulación integrado en el medio recipiente, y/o usando un material recipiente que active la sangre. El material coagulador puede ser un objeto, tal como perlas de vidrio, añadido a la sangre íntegra en el medio recipiente.

En otro aspecto de la invención, se añade a la sangre íntegra una primera sustancia elegida de un grupo que comprende fibroblastos, células queratinocíticas y ácido hialurónico. Por esta razón se obtiene un producto sanguíneo que incluye células adicionales conocidas por ser importantes para la regeneración de la piel y además con ello mejora la curación de heridas crónicas, especialmente heridas en áreas con tejido adyacente inferior o inviable. El ácido hialurónico, un componente conocido de la piel, tiene el potencial de aumentar la capacidad

enlazante de agua del producto sanguíneo así como aumentar el potencial para la incorporación/infiltración del producto sanguíneo en áreas de pérdida de tejido.

En otro aspecto de la invención, el medio compactador, tal como un filtro, tiene una primera posición fija y una segunda posición. El filtro se fija en una posición en la parte del medio recipiente que contiene los eritrocitos durante la primera parte de la centrifugación en la que los leucocitos y trombocitos se han separado, mientras que la fibrina en el suero no se ha compactado. Siempre que la densidad del filtro sea menor que la del suero, una liberación del filtro causará que el filtro se traslade a la parte superior del tubo y recoger de este modo la capa de leucocitos y trombocitos y compactar la capa de fibrina.

En otro aspecto de la invención, el medio compactador, tal como un filtro, se fija en la primera posición fija por una deformación en la pared del medio recipiente. El filtro se fija deformando la pared del tubo. El filtro se libera quitando la deformación de la pared.

En otro aspecto de la invención, en vez de sangre íntegra se usa plasma que comprende fibrina y una capa leucoplaquetaria que comprende leucocitos y trombocitos. Por esta razón se proporciona un método en el que se puede usar sangre íntegra excepto eritrocitos, de este modo el producto sanguíneo es derivable directamente de sangre íntegra, fracciones de sangre íntegra o combinaciones de fracciones de sangre íntegra.

En otro aspecto de la invención, el método se realiza en menos de 15 minutos. El método se realiza en menos de al menos 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 11 minutos, 12 minutos, 13 minutos, 14 minutos, 15 minutos, 16 minutos, 17 minutos, 18 minutos, 19 minutos, 20 minutos, 21 minutos, 22 minutos, 23 minutos, 24 minutos, 25 minutos, 26 minutos, 27 minutos, 28 minutos, 29 minutos o al menos 30 minutos.

En otro aspecto de la invención, el producto sanguíneo obtenido por el método es el producto sanguíneo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

La invención se refiere también a un producto sanguíneo, obtenible por un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17-41, que comprende componentes de sangre íntegra, especialmente fibrina, trombocitos y leucocitos, comprendiendo el producto sanguíneo una primera capa, una segunda capa y una tercera capa, siendo la segunda capa adyacente a la primera capa y a la tercera capa, definiendo la primera capa una primera superficie externa del producto sanguíneo y definiendo la tercera capa una segunda superficie externa del producto sanguíneo, comprendiendo la primera capa una mayoría de fibrina, comprendiendo la segunda capa una mayoría de trombocitos y comprendiendo la tercera capa una mayoría de leucocitos. Por esta razón se obtiene un producto con una estructura de multicapas; donde cada una de las capas proporciona diferente funcionalidad debido a la diferente composición de cada una de las capas. El producto sanguíneo es autosustentable, compacto y sólido, y el producto sanguíneo tiene una estructura tal que el producto sanguíneo es directamente aplicable para el uso deseado. Por mayoría se entiende que un componente, tal como la fibrina, trombocitos o leucocitos, comprende al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o incluso 100%, o cualquier intervalo que se puede definir a partir de combinaciones de estos porcentajes mencionados, en volumen y/o en peso de la respectiva capa o en volumen y/o en peso del producto sanguíneo. La primera, segunda y tercera capa son cada una continua y/o sustancialmente paralela una a otra, formando por ejemplo un producto sanguíneo estratificado y/o en multicapas. El producto sanguíneo consiste preferiblemente en tres capas, por ejemplo una primera capa que comprende una mayoría de fibrina, una segunda capa que comprende una mayoría de trombocitos y una tercera capa que comprende una mayoría de leucocitos. El producto sanguíneo tiene preferiblemente una máxima relación anchura/espesor de 1, 2, 3, 4 ó 5, sin embargo la relación puede ser hasta 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó incluso hasta 100, donde la anchura se mide a lo largo de las capas del producto sanguíneo y el espesor se mide perpendicular a las capas del producto sanguíneo.

En otro aspecto de la invención, una mayoría de fibrina comprendida en el producto sanguíneo está comprendida en la primera capa. Por esta razón se obtiene un producto sanguíneo donde una mayoría de la fibrina comprendida en el producto sanguíneo completo está comprendida en la primera capa.

En otro aspecto de la invención, una mayoría de los trombocitos comprendidos en el producto sanguíneo está comprendida en la segunda capa. Por esta razón se obtiene un producto sanguíneo donde una mayoría de los trombocitos comprendidos en el producto sanguíneo completo está comprendida en la segunda capa.

En otro aspecto de la invención, una mayoría de los leucocitos comprendidos en el producto sanguíneo está comprendida en la tercera capa. Por esta razón se obtiene un producto sanguíneo donde una mayoría de los leucocitos comprendidos en el producto sanguíneo completo está comprendida en la tercera capa.

En otro aspecto de la invención, el producto sanguíneo consiste únicamente en componentes de sangre íntegra. Por esta razón se obtiene un producto sanguíneo que consiste únicamente en componentes de sangre íntegra, que significa que no se añaden aditivos a la sangre íntegra y/o al producto sanguíneo, y el producto sanguíneo es derivable directamente de sangre íntegra, fracciones de sangre íntegra o combinaciones de fracciones de sangre íntegra.

En otro aspecto de la invención, el producto sanguíneo es autólogo.

En otro aspecto de la invención, el producto sanguíneo es flexible. Por esta razón se obtiene un producto sanguíneo que puede resistir tensión aplicada durante el uso normal sin ruptura. Debido a la flexibilidad del producto sanguíneo, el producto sanguíneo se ajusta a los contornos más continuos donde se aplica el producto sanguíneo.

En otro aspecto de la invención, el producto sanguíneo comprende además una primera sustancia elegida de un grupo que comprende fibroblastos, células queratinocíticas y ácido hialurónico. Por esta razón un producto sanguíneo incluye células adicionales que se conocen por ser importantes para la regeneración de la piel y con ello mejora además la curación de heridas crónicas, especialmente heridas en áreas con tejido adyacente inferior o inviable. El ácido hialurónico, un componente conocido de la piel, tiene el potencial de aumentar la capacidad enlazante de agua del producto sanguíneo así como aumentar el potencial para la incorporación/infiltración del producto sanguíneo en áreas de pérdida de tejido.

En otro aspecto de la invención, el producto sanguíneo es para uso terapéutico. Uso de un producto sanguíneo obtenible por un método de acuerdo con el mencionado anteriormente para uso terapéutico.

En otro aspecto de la invención, el producto sanguíneo se usa para la fabricación de un medicamento para uso terapéutico.

En otro aspecto de la invención, el producto sanguíneo es para tratamiento de una herida. Uso de un producto sanguíneo obtenible por un método de acuerdo con el mencionado anteriormente para tratamiento de una herida.

En otro aspecto de la invención, el producto sanguíneo se usa para la fabricación de un medicamento para tratamiento de una herida. Por esta razón se obtiene un producto sanguíneo que es en particular adecuado para la fabricación de un medicamento para tratamiento de una herida. Aplicando la segunda superficie externa definida por la tercera capa contra la herida, la herida se preserva y/o se mantiene sustancialmente estéril, por ejemplo libre de infección, porque la tercera capa comprende una mayoría de leucocitos que son las primeras células activas y por tanto controla la infección y atrae otras células incluyendo macrófagos, mientras que la segunda capa comprende una mayoría de trombocitos que comprenden factores promotores de crecimiento que favorecen la curación de heridas y/o la granulación, mientras que la primera capa del producto sanguíneo comprende una mayoría de fibrina, y por tanto la primera superficie externa del producto sanguíneo proporciona una protección eficaz frente a la contaminación desde el ambiente; la primera capa comprende además factores promotores de crecimiento, que se libera a lo largo del tiempo. Aplicando la segunda capa externa definida por la tercera capa contra la herida, la herida se preserva y/o se mantiene sustancialmente libre de infección, porque la tercera capa comprende una mayoría de leucocitos que se liberan fácilmente del producto. Los leucocitos son células del sistema inmune que defienden al organismo frente a infecciones y cuerpos extraños, por tanto controlan infecciones y además atraen otras células incluyendo macrófagos. La segunda capa comprende una mayoría de trombocitos que comprenden factores promotores de crecimiento que estimulan las células. Como los leucocitos se liberarán rápidamente del producto, la segunda capa cubrirá la superficie de la herida para la liberación óptima de sustancias promotoras de crecimiento a la herida. La primera capa del producto sanguíneo comprende una mayoría de fibrina, y por tanto la primera superficie exterior del producto sanguíneo proporciona una protección eficaz frente a la contaminación desde el ambiente; la primera capa comprende además factores promotores de crecimiento, que se libera a lo largo del tiempo.

En otro aspecto de la invención, el producto sanguíneo se usa para uso autólogo. Uso de un producto sanguíneo obtenible por un método de acuerdo con el mencionado anteriormente para uso autólogo.

En otro aspecto de la invención, el producto sanguíneo se usa para la fabricación de un medicamento autólogo.

La invención se refiere también a un producto sanguíneo para uso quirúrgico, por ejemplo para sellar un área, para evitar adherencia post-quirúrgica y/o usar en procedimientos de anastomosis y/o usar un producto sanguíneo de acuerdo con el mencionado anteriormente para uso quirúrgico.

En otro aspecto de la invención, el producto sanguíneo es para anastomosis. Uso de un producto sanguíneo obtenible por un método de acuerdo con el mencionado anteriormente para anastomosis.

En otro aspecto de la invención, el producto sanguíneo se usa para la fabricación de un medicamento para anastomosis.

La invención se refiere también a un medio recipiente de preparación de producto sanguíneo para preparar un producto sanguíneo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el medio recipiente de preparación de producto sanguíneo comprende poliamida y/o poliuretano. Por esta razón se proporciona un medio recipiente de preparación de producto sanguíneo que activa la coagulación de sangre íntegra, o más específicamente proporciona una activación complementaria, y al mismo tiempo comprende un material polimérico, que se prefiere más que recipientes de vidrio, debido a la fragilidad y/o costes de los polímeros, y que otros recipientes poliméricos debido a sus propiedades de ser inactivos en la coagulación. El hecho de que poliamida y/o poliuretano active la coagulación de sangre íntegra es sorprendente y proporciona una mejor alternativa a los típicos

medios recipientes de vidrio conocidos y medios recipientes poliméricos inactivos en la coagulación, porque el medio recipiente de preparación de producto sanguíneo combina las ventajas de los conocidos medios recipientes de vidrio y medios recipientes poliméricos.

La invención se refiere también al uso de un medio recipiente de preparación de producto sanguíneo de acuerdo con la reivindicación 58 para la fabricación de un producto sanguíneo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

La invención se refiere también a un medio recipiente de preparación de producto sanguíneo, donde el medio recipiente de preparación de producto sanguíneo comprende poliamida y/o poliuretano. Por esta razón se proporciona un medio recipiente de preparación de producto sanguíneo que activa la coagulación de sangre íntegra, o más específicamente proporciona una activación complementaria, y al mismo tiempo comprende un material polimérico, que se prefiere más que los recipientes de vidrio, debido a la fragilidad y/o costes de los polímeros, y que

otros recipientes poliméricos debido a sus propiedades de ser inactivos en la coagulación. El hecho de que poliamida y/o poliuretano active la coagulación de sangre íntegra es sorprendente y proporciona una mejor alternativa a los típicos medios recipientes de vidrio conocidos y medios recipientes poliméricos inactivos en la coagulación, porque el medio recipiente de preparación de producto sanguíneo combina las ventajas de los conocidos medios recipientes de vidrio y medios recipientes poliméricos.

La invención se refiere también al uso de un medio recipiente de preparación de producto sanguíneo de acuerdo con la reivindicación 60 para la fabricación de un producto sanguíneo.

Breve descripción de los dibujos

La invención se explica con detalle más adelante con referencia a los dibujos, en los que

La Fig. 1 muestra una vista en sección transversal de una primera realización del medio recipiente de acuerdo con la invención,

La Fig. 2 muestra una vista en sección transversal de una segunda realización del medio recipiente de acuerdo con la invención,

La Fig. 3 muestra una vista en sección transversal de una tercera realización del medio recipiente de acuerdo con la invención,

La Fig. 4 muestra una vista en sección transversal de una cuarta realización del medio recipiente de acuerdo con la invención,

La Fig. 5 muestra una vista en sección transversal de la primera realización del medio recipiente de acuerdo con la invención,

La Fig. 6 muestra una vista en sección transversal de la segunda realización del medio recipiente de acuerdo con la invención,

La Fig. 7 muestra una vista en sección transversal de la tercera realización del medio recipiente de acuerdo con la invención,

La Fig. 8 muestra una vista en sección transversal de la cuarta realización del medio recipiente de acuerdo con la invención,

La Fig. 9 ilustra una vista en sección transversal de una realización del producto sanguíneo de acuerdo con la invención, y

La Fig. 10 muestra una vista en sección transversal de una realización del producto sanguíneo de acuerdo con la invención.

Descripción detallada

Las Figuras 1 a 4 ilustran respectivamente una primera, segunda, tercera y cuarta realización de un medio recipiente 1. El medio recipiente 1 de la cuarta realización comprende una cavidad que tiene una superficie interna 3. La cavidad está definida por una pared 4, un extremo cerrado 12 y un extremo abierto que se puede cerrar por una tapadera 2. El medio recipiente 1 define un volumen de sangre íntegra 5 y se cierra al ambiente por medio de la tapadera 2 montada sobre el extremo abierto del medio recipiente 1. El medio recipiente 1 se puede hacer de cualquier material, y el material se puede elegir de manera que el material del medio recipiente 1, debido al contacto con la sangre íntegra 5 por medio de la superficie interna 3, activa la cascada de coagulación de la sangre íntegra 5, que es el caso para la primera realización en la Fig. 1 y la tercera realización en la Fig. 3. Alternativamente, el material del medio recipiente 1 se puede elegir de manera que el material es inactivo con relación a la cascada de coagulación de la sangre íntegra 5, que es el caso para la segunda realización en la Fig. 2 y la cuarta realización en

la Fig. 3, donde un objeto 7, hecho de un material que activa la cascada de coagulación de la sangre 5, se añade en cambio a la sangre íntegra 5 de tal manera que el objeto 7 se usa para activar la cascada de coagulación de sangre íntegra 5. La superficie interna 3 del medio recipiente 1 de la cuarta realización se puede revestir y/o tratarse la superficie con el fin de reducir la fricción entre la superficie interna 3 y cualquier componente de la sangre 5. Además el material del medio recipiente 1 se puede elegir de manera que se obtenga una fricción baja entre la superficie interna 3 y cualquier componente de la sangre 5, por ejemplo eligiendo un material con una baja capacidad de enlace a proteínas. En la tercera y cuarta realización mostrada en la Fig. 3 y 4 se coloca en el medio recipiente 1 un medio compactador 8, tal como un filtro, con lo cual el producto sanguíneo 10 se compacta frente al medio compactador.

El medio compactador 8 se puede fijar en el extremo cerrado 12 del medio recipiente 1, donde están localizados los eritrocitos, en la parte inicial del procedimiento. En un momento posterior el medio compactador 8 se puede liberar y, siempre que la densidad del medio compactador 8 sea inferior a la del plasma, el medio compactador estará impulsado hacia la parte superior del plasma. Separando la tapadera 2, el producto sanguíneo 10 se puede separar del medio recipiente 1. El medio de compactación 8, o parte del medio compactador, se puede usar para soportar el producto sanguíneo 10 durante el transporte desde el medio recipiente 1.

La sangre íntegra 5 en las cuatro realizaciones se somete a una fuerza centrífuga 6 que actúa hacia abajo como se ilustra. Sin embargo la fuerza centrífuga 6 no está limitada a actuar en la dirección mostrada. La fuerza centrífuga 6 funciona como un medio de separación, ya que los componentes de la sangre íntegra 5 tienen diferentes densidades y por tanto responderán de diferente modo a la fuerza centrífuga 6.

La Fig. 1 a 4 ilustran las cuatro realizaciones del medio recipiente 1 en un momento en el que la fuerza centrífuga 6 acaba de aplicarse, por tanto no es visible separación alguna de la sangre íntegra 5, mientras que las Fig. 5 a 8 respectivamente muestran la primera, segunda, tercera y cuarta realización del medio recipiente 1 en un momento en el que la fuerza centrífuga 6 ha estado actuando tiempo suficientemente largo y con suficiente magnitud, por tanto la sangre íntegra 5 se ha separado en el suero 9, con la fibrina distribuida por toda esta parte de suero, la capa 10 de plaquetas y leucocitos, y los eritrocitos 11. En un momento posterior el medio compactador 8 se puede liberar y, siempre que la densidad del medio compactador 8 sea inferior a la del suero, el medio compactador será impulsado hacia la parte superior del suero y liberando de este modo la fibrina de la pared y compactando la fibrina. Separando la tapadera 2, el producto sanguíneo 10 se puede separar del medio recipiente 1. El medio de compactación 8, o parte del medio compactador, se puede usar para soportar el producto sanguíneo 10 durante el transporte desde el medio recipiente 1.

La Fig. 9 ilustra una vista esquemática en sección transversal del producto sanguíneo 10 que comprende una primera capa 21, una segunda capa 22 y una tercera capa 23, donde la segunda capa es adyacente a la primera capa 21 y a la tercera capa 23. La primera capa 21 define una primera superficie externa 24 del producto sanguíneo 10 y la tercera capa 23 define una segunda superficie externa del producto sanguíneo 10. La primera capa 21 comprende una mayoría de fibrina, mientras que la segunda capa 22 comprende una mayoría de trombocitos y la tercera capa 23 comprende una mayoría de leucocitos. Por tanto el producto sanguíneo 10 tiene una estructura en multicapas bien definida, teniendo cada capa composiciones diferentes y por tanto tienen funcionalidades diferentes.

La Fig. 10 muestra una vista en sección transversal de un producto sanguíneo obtenido experimentalmente usando un tubo de ensayo fabricado de poli(propileno) como medio recipiente.

La invención se ha descrito con referencia a una realización preferida. Sin embargo, el alcance de la invención no está limitado a la realización ilustrada, y se pueden realizar alteraciones, combinaciones y modificaciones sin desviarse del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

1. Tomar un recipiente de plástico (por ejemplo un tubo de microcentrífuga de 2 ml) y añadir un agente activador de coagulación, por ejemplo 4 perlas de vidrio (2 mm de diámetro).
2. Extraer sangre en el recipiente de plástico.
3. Mezclar con volteo la sangre y activador de coagulación durante 2 minutos.
4. Centrifugar el recipiente a 16200 *g* durante 20 minutos.
5. Después de esto se formará el producto sanguíneo en una capa entre los glóbulos rojos y el suero.
6. Separar el producto sanguíneo usando fórceps.

En este método, el tiempo de centrifugación y la velocidad de centrifugación dependerán de la potencia de activación. Por ejemplo, si la activación de coagulación es alta las células deben separarse antes de que sean

atrapadas en la red de fibrina, esto requerirá una alta velocidad de centrifugación. Debido a la alta velocidad de centrifugación, el tiempo de centrifugación puede ser inferior.

Ejemplo 2

1. Tomar un tubo de centrifugación estándar de 50 ml como recipiente y añadir un activador de coagulación, por ejemplo perlas de vidrio.
2. Extraer sangre en el tubo de centrifugación.
3. Mezclar la sangre en el tubo durante 1 minuto.
4. Centrifugar el tubo a 3000 *g* durante 20 minutos.
5. Abrir la tapadera y liberar la fibrina (formada en el suero en la parte superior) de la pared (usando una varilla delgada de plástico o aguja).
6. Centrifugar la muestra otros 5 minutos a 3000 *g*.
7. Después de esto se formará el producto sanguíneo en una capa entre los glóbulos rojos y el suero.
8. Separar el producto sanguíneo usando fórceps.

Ejemplo 3

1. Tomar un recipiente de 20 ml (diámetro interior: 26 mm) preparado de poliamida o poliuretano.
2. Añadir una tapadera y crear un vacío en el interior del recipiente.
3. Insertar una aguja en el paciente.
4. Conectar la aguja al recipiente sin perder el vacío.
5. Extraer sangre en el recipiente de plástico con ayuda del vacío.
6. Centrifugar el tubo a 15000 *g* durante 12 minutos.
7. Después de esto se formará el producto sanguíneo en una capa entre los glóbulos rojos y el suero.
8. Separar la tapadera y separar el producto sanguíneo con fórceps.

Ejemplo 4

1. Tomar un recipiente de 20 ml (diámetro interior: 26 mm) preparado de poliamida o poliuretano.
2. Colocar un disco en el fondo del recipiente. La densidad del disco será menor que 1, preferiblemente lo más baja posible.
3. Fijar el disco en el fondo del recipiente, por ejemplo mediante la compresión la pared del recipiente.
4. Añadir una tapadera y crear un vacío en el interior del recipiente.
5. Insertar la aguja en el paciente.
6. Conectar la aguja al recipiente sin perder el vacío.
7. Extraer sangre en un recipiente de plástico con ayuda del vacío.
8. Centrifugar el tubo a 3000 *g* durante 8 minutos. En esta etapa los leucocitos estarán en la parte superior de los glóbulos rojos y la fibrina se polimerizará a través de la capa superior de suero porque la fuerza *g* es pequeña y no es capaz de comprimirla en la parte superior de las plaquetas.
9. Liberar el disco en el fondo.
10. Centrifugar el tubo a 3000 *g* durante 2 minutos. Esto hará que el disco se mueva a la parte superior y recogiendo de este modo los leucocitos y plaquetas y comprimirá la capa de fibrina en una lámina.
11. Separar la tapadera y separar el producto sanguíneo, que está colocado en la parte superior del recipiente.

Ejemplo 5

1. Tomar un recipiente de 20 ml (diámetro interior: 26 mm) preparado de poliamida o poliuretano.

2. Colocar un disco en el fondo del recipiente. La densidad del disco será menor que 1, preferiblemente lo más bajo posible.
3. Fijar el disco en el fondo del recipiente, por ejemplo mediante la compresión de la pared del recipiente.
4. Crear un vacío dentro del recipiente y añadir una tapadera.
5. Insertar una aguja en el paciente.
6. Conectar la aguja al recipiente sin perder el vacío.
7. Extraer sangre en un recipiente de plástico con ayuda del vacío.
8. Centrifugar el tubo a 3700 *g* durante 3 minutos. En esta etapa los leucocitos estarán en la parte superior de los glóbulos rojos y la fibrina se polimerizará a través de la capa superior de suero porque la fuerza *g* es pequeña y no es capaz de comprimirla en la parte superior de las plaquetas.
9. Esperar durante 8 minutos.
10. Liberar el disco en el fondo.
11. Centrifugar el tubo a 3000 *g* durante 2 minutos. Esto hará que el disco se mueva a la parte superior y recogiendo de este modo los leucocitos y plaquetas y comprimirá la capa de fibrina en una lámina.
12. Separar la tapadera y separar el producto sanguíneo, que está colocado en la parte superior del recipiente.

Como se desprende de los ejemplos anteriores, se puede variar dentro de ciertos límites la combinación de activación de coagulación, velocidad de centrifugación (*g*), tiempo de centrifugación, tiempo de descanso entre centrifugación.

Estos se ilustran en las tablas a continuación:

Activación de coagulación	**Velocidad de centrifugación**	**1. Tiempo de centrifugación**	**Tiempo de coagulación después o durante la centrifugación 1**	**2. Centrifugación**
Baja	Baja	Largo	Largo	Sí, alta
Baja	Baja	Largo	Largo	Sí, puede ser baja si la adhesión de fibrina a la pared del recipiente se libera mecánicamente de la pared o la adhesión a la pared es baja.
Baja	Alta	Corto	Largo	Sí, alta
Alta	Alta	Largo	Corto	No
Alta	Alta	Corto	Corto	Sí, alta

Si se procesa con un disco:

Activación de coagulación	**Velocidad de centrifugación**	**1. Tiempo de centrifugación**	**Tiempo de coagulación después o durante la centrifugación 1**	**2. Centrifugación donde el disco se libera**
Baja	Baja	Largo	Largo	Baja
Baja	Alta	Corto	Largo	Baja
Alta	Alta	Largo	Corto	Baja
Alta	Alta	Corto	Corto	Baja

Ejemplo 6 – Optimización de la fuerza de centrifugación relativa y tiempo.

1. Se introdujo sangre íntegra en tubos de 6 ml con EDTA (Vacutainer, BD®).

2. Un recipiente de 20 ml (diámetro interno: 26 mm) preparado de poliamida o poliuretano se llenó con 18 ml y se centrifugó a diferentes RCFs (fuerzas de centrifugación relativas) durante tiempos diferentes.

3. Se tomaron muestras (~ 300 μl) en el fondo con una jeringa (aproximadamente 5 mm por encima del fondo) y en la parte superior (aproximadamente 5 mm por debajo de la superficie) después de los anteriores tiempos de centrifugación – después se continuó la centrifugación para obtener la próxima muestra. Las muestras del fondo se diluyeron 1:1 con D-PBS.

4. Las muestras se analizaron por recuento celular automatizado (XE 2100, Sysmex Corporation) y se calcularon los números de células en la muestra original. Los resultados se dan en millones de células por ml.

Millones de plaquetas por mililitro en la parte superior (arriba) e inferior (fondo) de sangre centrifugada a la fuerza de centrifugación relativa (*g*) dada como una función del tiempo (minutos):

Minutos	0	1	3	5	7	11
2000 *g* arriba	178	480	224	113	59	13
2000 *g* fondo	178	7	5	3	2	4
3000 *g* arriba	178	378	103	38	14	0
3000 *g* fondo	178	3	2	5	3	1
3700 *g* arriba	178	364	97	27	8	0
3700 *g* fondo	178	2	11	2	1	0

Millones de leucocitos por mililitro en la parte superior (arriba) e inferior (fondo) de sangre centrifugada a la fuerza de centrifugación relativa (x*g*) dada como una función del tiempo (minutos):

Minutos	0	1	3	5	7	11
2000 *g* arriba	7,43	0,28	0	0	0	0
2000 *g* fondo	7,43	0,89	0,02	0,13	0,26	0,12
3000 *g* arriba	7,43	0,19	0	0	0,01	0
3000 *g* fondo	7,43	0,07	0,04	0,11	0,02	0,02
3700 *g* arriba	7,43	0,05	0,03	0	0	0
3700 *g* fondo	7,43	0,03	0,59	0,07	0,02	0,01

Ejemplo 7 – Liberación de factor de crecimiento como una respuesta al fluido de herida crónica.

1. El producto sanguíneo se generó por el método dado en el ejemplo 1.

2. El producto sanguíneo se cortó por la mitad y se colocó en 100 μl de PBS con BSA al 1% o 100 μl de fluido de herida crónica (recogido a lo largo de 24 horas de una úlcera venosa de las piernas) y se incubó a 37 grados centígrados.

3. Después de determinados momentos (1, 2, 3,5, 7, 14, 22 y 29 horas) las muestras se centrifugaron a 16000 *g* durante 10 minutos, y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, se añadió 1/10 (81 μl de muestra + 9 μl de PI) de Inhibidor de Proteasas (Complete®, Roche) y se congeló a -80 grados centígrados.

4. Se determinaron niveles de factor de crecimiento derivado de plaquetas AB usando un estuche ELISA (DuoSet® ELISA Cat. No. DY222, R&D systems) como se describe por el fabricante. Se calcularon las concentraciones de PDGF-AB en las muestras originales.

Liberación de factor de crecimiento derivado de plaquetas AB (PDGF-AB) de producto sanguíneo (ng/ml de producto sanguíneo) como una función del tiempo (horas).

Tiempo (horas)	1	2	4	7	22	29
Fluido de herida crónica (control)	0	0	0	0	0	0
Producto sanguíneo en PBS	153	172	160	174	206	233
Producto sanguíneo en fluido de herida crónica	426	490	602	497	234	275

Ejemplo 8

1. El producto sanguíneo se generó por el método dado en el ejemplo 1.
2. Se incubaron dos productos sanguíneos en 1 ml de DMEM (PAA, Germany) a 37ºC y 5% de CO_2 durante 48 horas.
3. Se incuban simultáneamente 2 productos sanguíneos en 1 ml de DMEM (PAA, Germany) que incluye lipopolisacárido ((10 ng/ml, (LPS derivado de Escherichia coli; L2654; Sigma-Aldrich) a 37ºC y 5% de CO_2 durante 48 horas.
4. Después de 48 horas los medios se transfirieron a tubos de microcentrífuga y se centrifugaron durante 20 minutos a 16200 xg. Los sobrenadantes se congelaron a -80ºC hasta su análisis.
5. Se realizaron agrupaciones analizadoras de proteoma ARY007 y ARY005 (ambas de R&D systems) como se describe por R&D systems, excepto que se usó tampón 4 (ARY007) en ambos estuches. Se diluyeron 420 μl de sobrenadante en 500 μl de tampón 4 y 580 μl de tampón 5 como se describe por R&D systems.
6. La reactividad con las agrupaciones se detectó usando sustrato HRP quimiluminiscente (Immobilon Western™, Millipore, US).
7. La emisión de luz se capturó usando un sistema Fluorchem 3000 (Alpha Innotech, US). La densidad media de píxeles se obtuvo por el programa informático Fluorchem (Alpha Innotech, US).

Sustancia detectada	**Producto sanguíneo (Densidad media de píxeles)**	**Producto sanguíneo + Lipopolisacárido (Densidad media de píxeles)**
CXCL8 (IL-8)	2605	404
CXCL10 (IP-10)	305,5	48,5
MMP-8	518	214
IL-1ra	1825,5	1117,5
IL-16	171	105
MMP-9	2663,5	1729,5
Angiopoyetina-1	676,5	537,5
PDGF-AB/PDGF-BB	851,5	704,5
PDGF-AA	1357	1159,5
CXCL16	300	256,5
TIMP-1	2507,5	2170,5
Endostatina	187	175,5
Angiogenina	689	650,5

MIF	1989	1880,5
IGFBP-2	1942	1883,5
IGFBP-3	444	468
EGF	612,5	670,5
IGFBP-1	291,5	401
sICAM-1	635,5	894,5
PAI-1	1940	2897,5
CCL5 (RANTES)	4104	6151,5
CD26	458,5	828,5
VEGF	246,5	891,5
CXCL1 (GRO-alpha)	336	2236
CCL4 (MIP-1-beta)	7	117,5
CCL2 (MCP-1)	6,5	334
G-CSF	7,5	429,5
IL-1Beta	7	600
IL-6	8	2094,5

REIVINDICACIONES

1. Un producto sanguíneo (10) que comprende componentes de sangre íntegra, especialmente fibrina, trombocitos y leucocitos, comprendiendo el producto sanguíneo (10) una primera capa (21), una segunda capa (22) y una tercera capa (23), siendo la segunda (22) capa adyacente a la primera capa (21) y tercera capa (23), definiendo la primera capa (21) una primera superficie externa (24) del producto sanguíneo (10) y definiendo la tercera capa (23) una segunda superficie externa (25) del producto sanguíneo (10), comprendiendo la primera capa (21) una mayoría de fibrina, comprendiendo la segunda capa (22) una mayoría de trombocitos y comprendiendo la tercera capa (23) una mayoría de leucocitos.

2. Un producto sanguíneo de acuerdo con la reivindicación 1, donde una mayoría de la fibrina comprendida en el producto sanguíneo (10) está comprendida en la primera capa (21).

3. Un producto sanguíneo de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, donde una mayoría de los trombocitos comprendidos en el producto sanguíneo (10) está comprendida en la segunda capa (22).

4. Un producto sanguíneo de acuerdo con la reivindicación 1, 2 ó 3, donde una mayoría de los leucocitos comprendidos en el producto sanguíneo (10) está comprendida en la tercera capa (23).

5. Un producto sanguíneo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el producto sanguíneo (10) consiste únicamente en componentes de sangre íntegra.

6. Un producto sanguíneo de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, donde el producto sanguíneo (10) comprende además una primera sustancia elegida de un grupo que comprende fibroblastos, células queratinocíticas y ácido hialurónico.

7. Un producto sanguíneo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para uso terapéutico.

8. Uso de un producto sanguíneo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la fabricación de un medicamento para uso terapéutico.

9. Uso de un producto sanguíneo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la fabricación de un medicamento para tratamiento de una herida.

10. Uso de un producto sanguíneo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para la fabricación de un medicamento para uso quirúrgico.

11. Un método para preparar un producto sanguíneo (10) a partir de un volumen de sangre íntegra (5), comprendiendo el método las etapas siguientes:

a) colocar el volumen de sangre íntegra (5) en un medio recipiente (1), comprendiendo el medio recipiente (1) un primer material que define una superficie interna (3) con la que el producto sanguíneo (5) está en contacto,

b) activar la coagulación de la sangre íntegra (5),

c) separar la sangre íntegra (5) en eritrocitos (11), suero (9) y producto sanguíneo (10) por una fuerza centrífuga (6) que actúa sobre la sangre íntegra (5) colocada en el medio recipiente (1), con lo cual la sangre íntegra (5) se separa en capas que comprenden eritrocitos (11), producto sanguíneo (10) y suero (9) debido a las diferencias en densidades entre los eritrocitos (11), producto sanguíneo (10) y suero (9), comprendiendo el producto sanguíneo (10) fibrina, leucocitos y trombocitos, siendo la fuerza centrífuga (6) aplicada al menos 1000 veces mayor que la fuerza de la gravedad, por ejemplo *g*, que actúa sobre la sangre íntegra, siendo la fuerza centrífuga (6) de tal valor y aplicada en un tiempo que los componentes de la sangre se separan en un producto sanguíneo de 3 capas (10), y

d) separar el producto sanguíneo (10) del medio recipiente (1).

12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, donde la fuerza centrífuga se aplica durante al menos 30 segundos.

13. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-12, donde la coagulación en la etapa b) se activa por el primer material que define la superficie interna (3).

14. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, donde la coagulación en la etapa b) se activa exponiendo la sangre íntegra (5) a un objeto (7), tal como una perla de vidrio.

15. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-14, donde el primer material de la superficie interna (3) del medio recipiente (1) se elige de un grupo que comprende poli(propileno), poli(etileno), policarbonato, poliamida, acrilonitrilo butadieno estireno, estireno, estireno modificado, poliuretano y otros materiales poliméricos.

16. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, donde la superficie interna (3) del medio recipiente (1) es superficie tratada, por ejemplo revestida, con el fin de reducir la fricción entre el producto sanguíneo (10) y la superficie interna (3) del primer material.

17. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-16, donde la fuerza centrífuga (6) es mayor que una fuerza adhesiva que actúa entre la superficie interna (3) y el producto sanguíneo (10).

18. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-17, donde el producto sanguíneo (10) que se adhiere a la superficie interna (3) se separa de la superficie interna (3), al menos una vez, durante la etapa c).

19. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-17, donde el método comprende además una etapa de compactación, en la que el producto sanguíneo (10) se compacta por un medio compactador (8), tal como un filtro, colocado en el medio recipiente (1).

20. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-18, donde el método comprende además una etapa de aislamiento, en la que los eritrocitos (11) se aíslan del producto sanguíneo (10) durante la etapa c).

21. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-19, donde el método comprende además una etapa de lavado en la que el producto sanguíneo (10) se lava, por tanto se separan sustancialmente todos los eritrocitos (11) y/o suero (9) unidos al producto sanguíneo (10).

22. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-21, donde la etapa b) precede a la etapa a).

23. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-22, donde la etapa b) sucede al menos 1 minuto antes de la etapa a).

24. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-21, donde la etapa b) sucede simultáneamente a la etapa c).

25. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-12, donde se añade a la sangre íntegra una primera sustancia elegida de un grupo que comprende fibroblastos, células queratinocíticas y ácido hialurónico.

26. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-25, donde el medio compactador (8), tal como un filtro, tiene una primera posición fija y una segunda posición.

27. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-26, donde el medio compactador (8), tal como un filtro, se fija en la primera posición fijada por una deformación en la pared del medio recipiente (1).

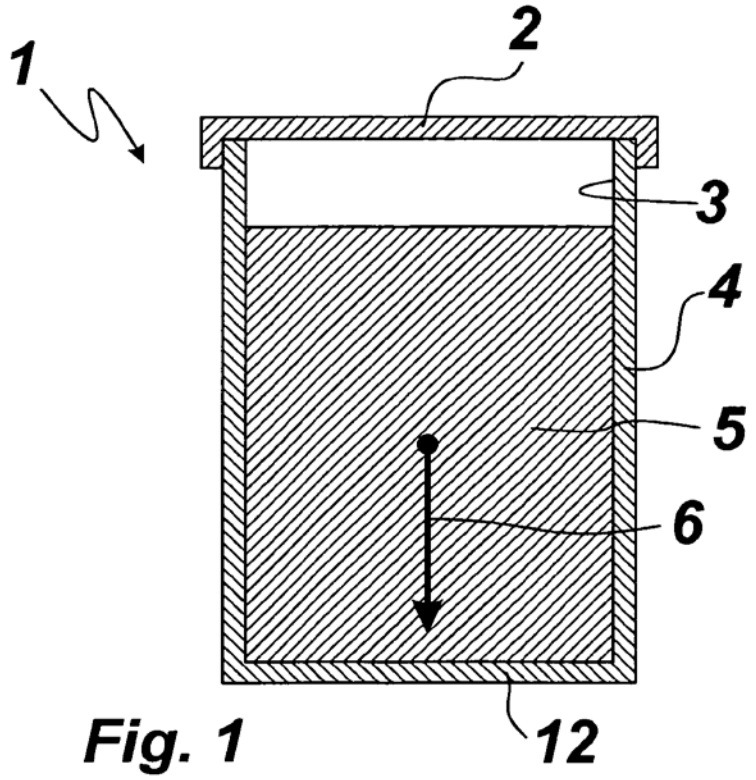

Fig. 1

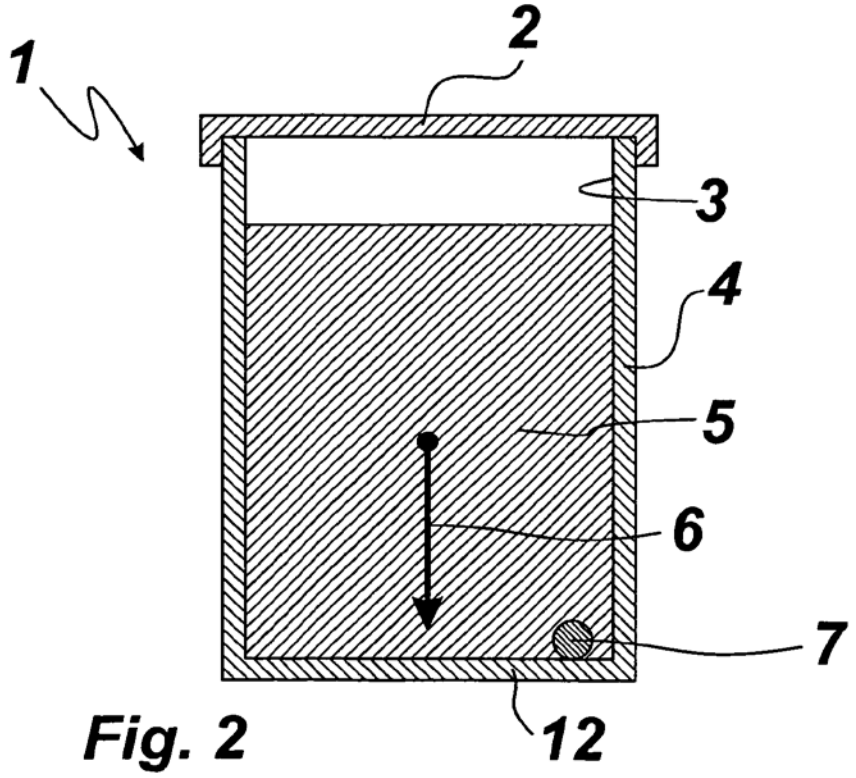

Fig. 2

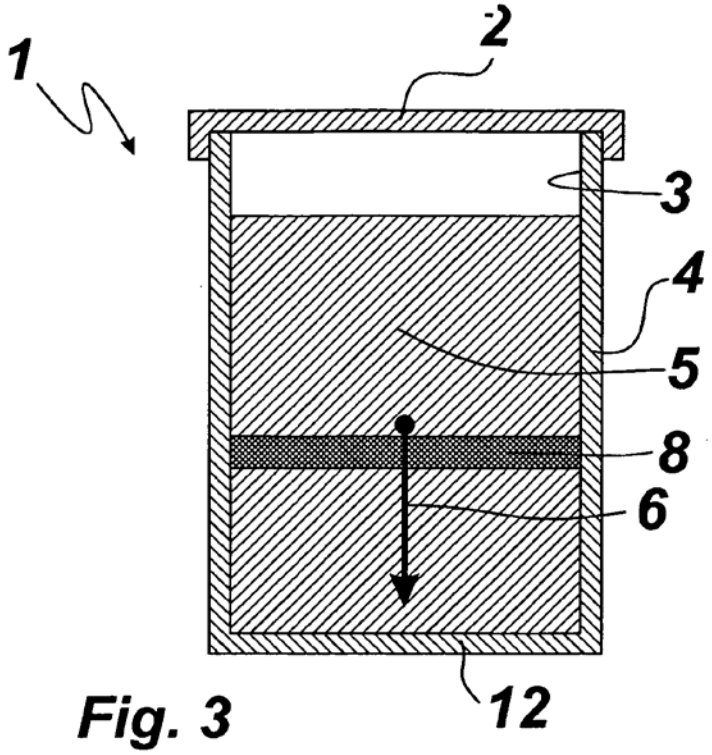

Fig. 3

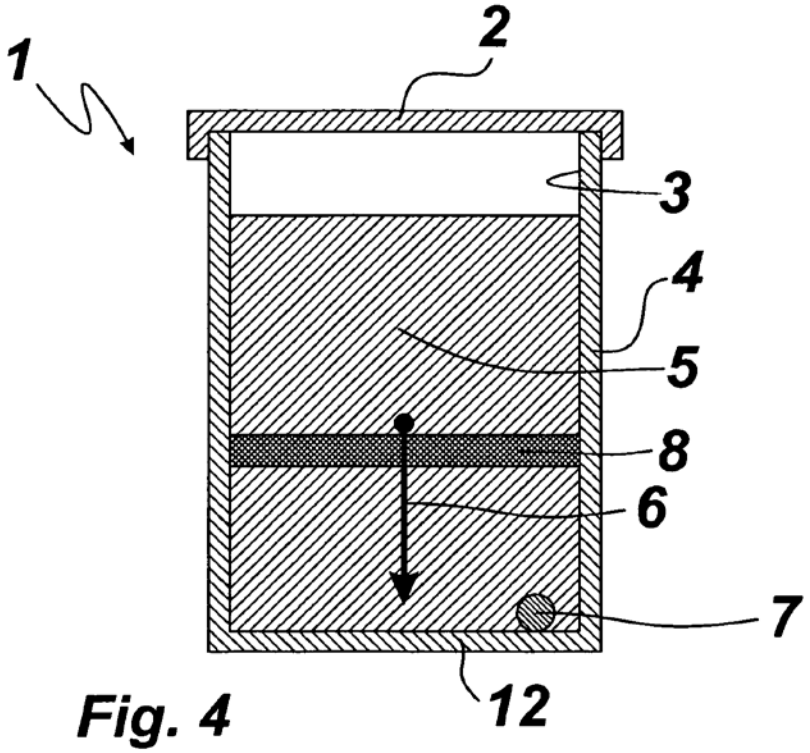

Fig. 4

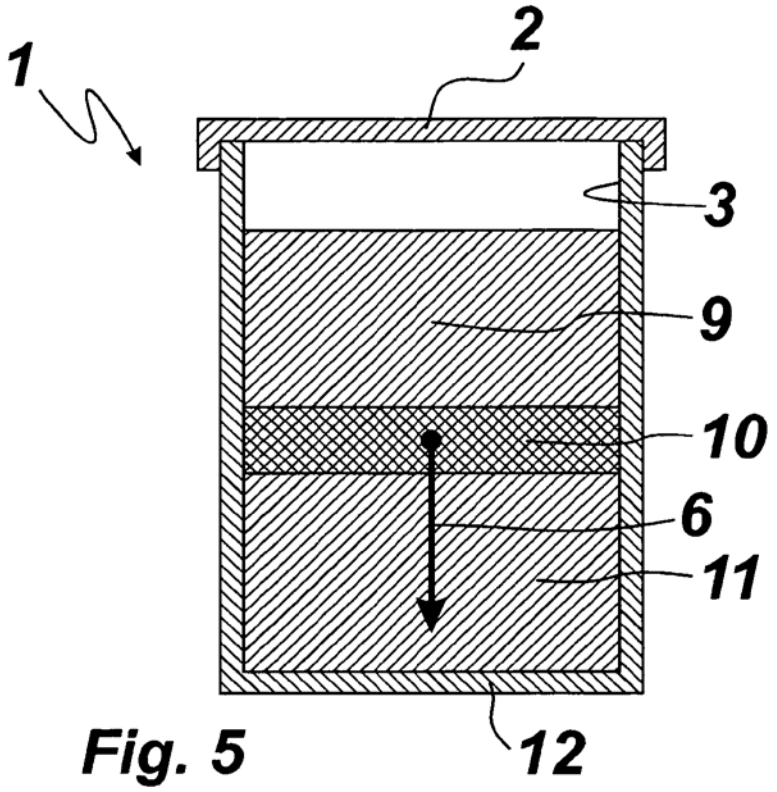

Fig. 5

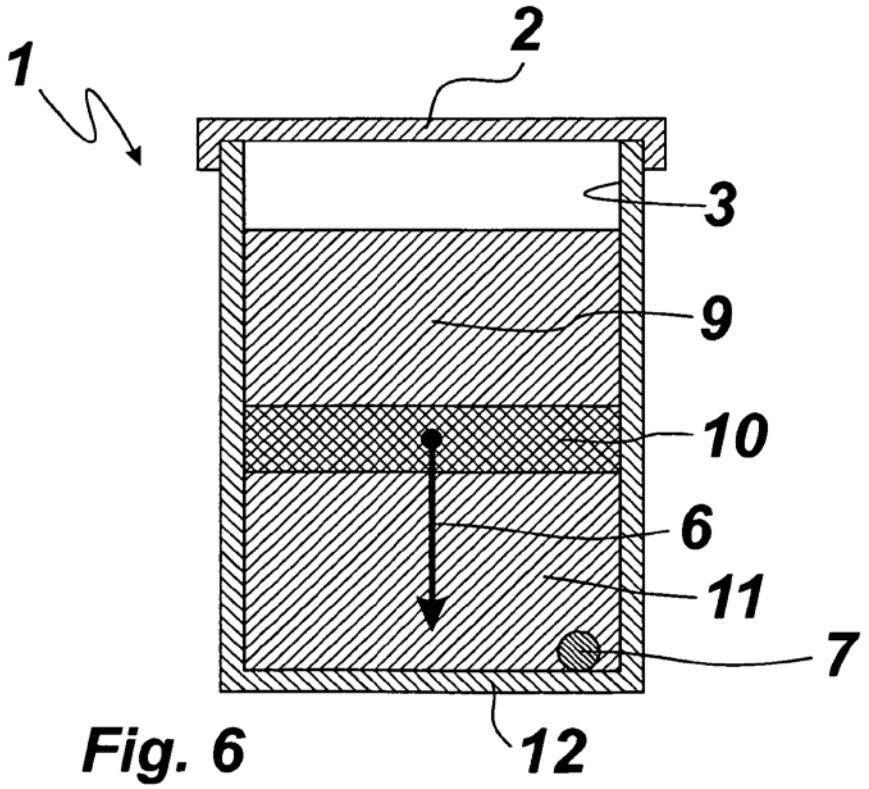

Fig. 6

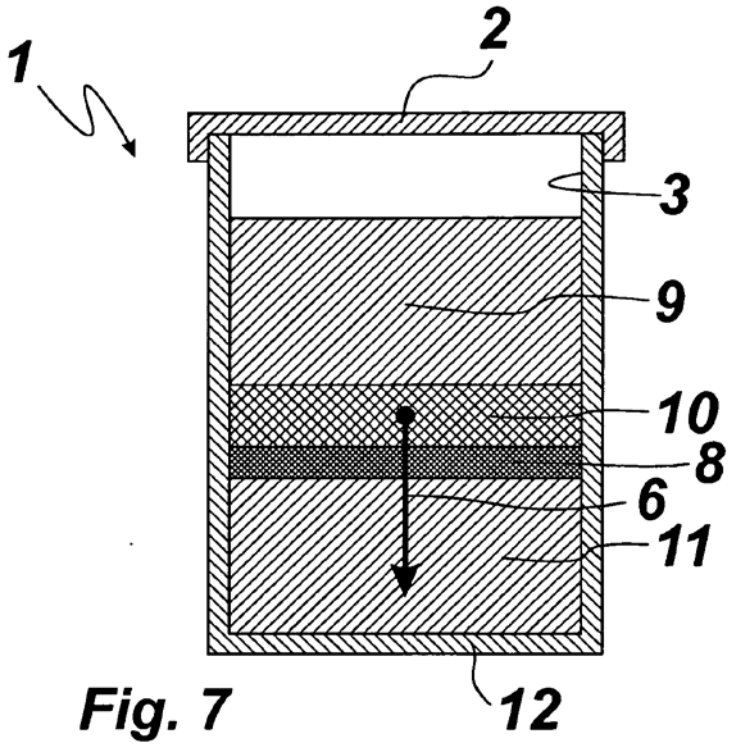

Fig. 7

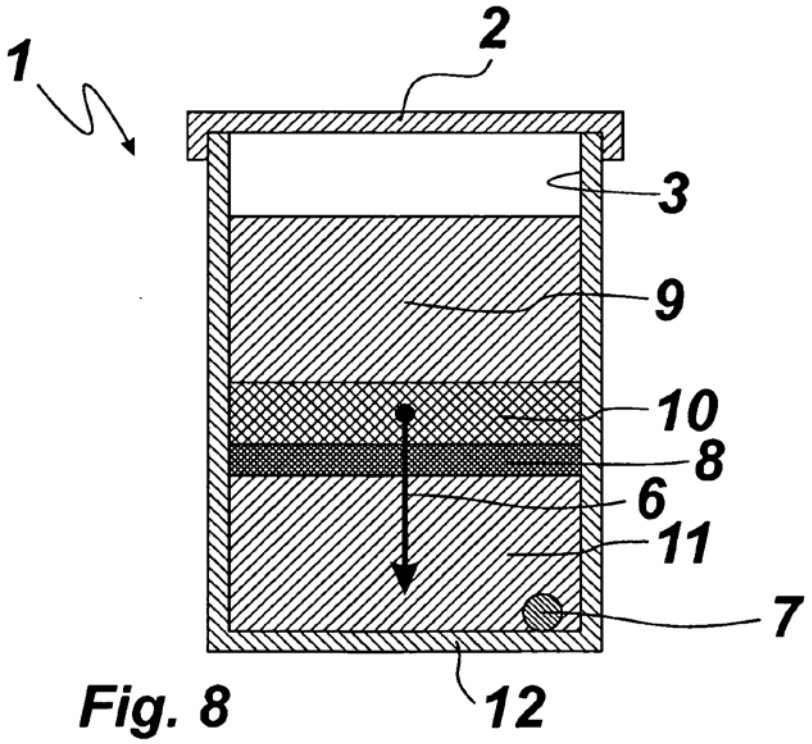

Fig. 8

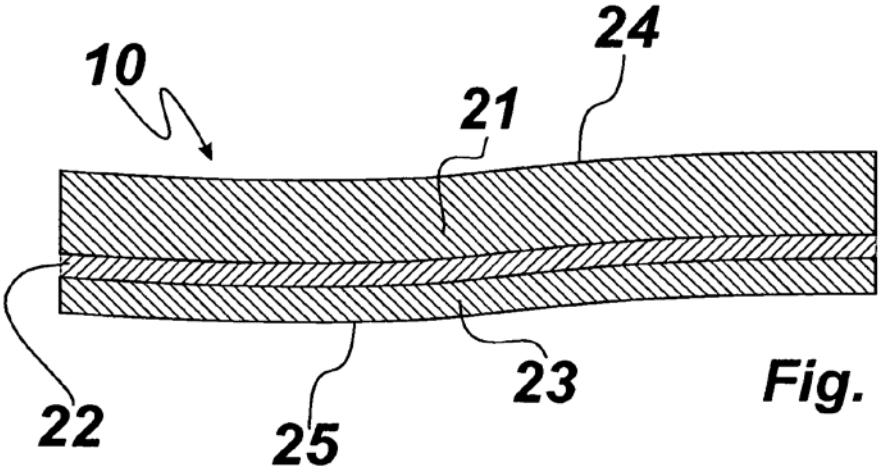

Fig. 9

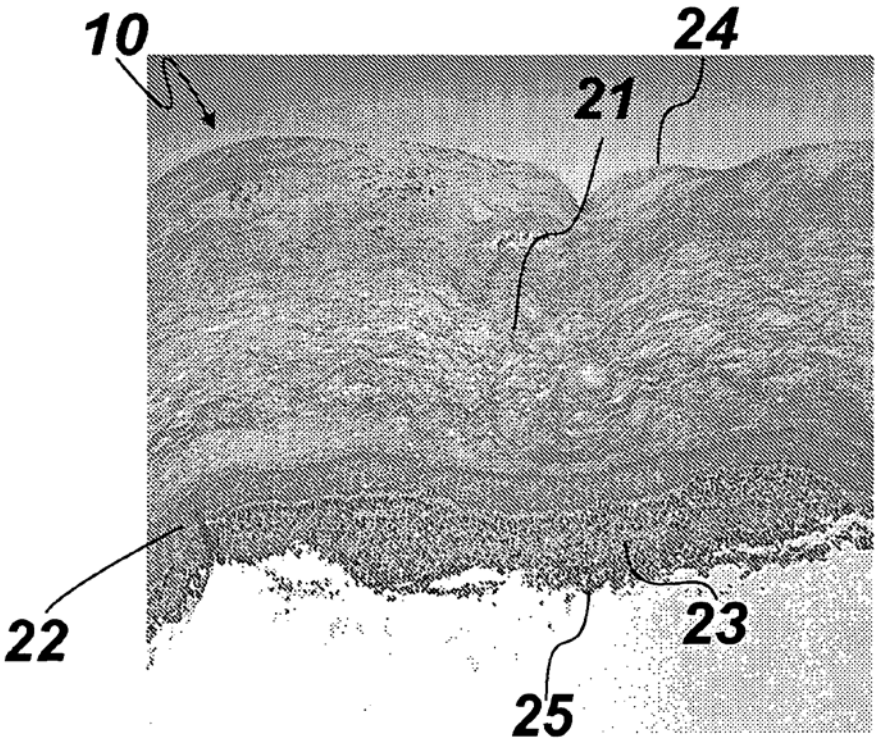

Fig. 10