

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 192**

51 Int. Cl.:
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05716535 .9**
- 96 Fecha de presentación: **05.04.2005**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1744776**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.01.2007**

54 Título: **Mezcla de mensajeros potenciadora de la cicatrización de una herida**

30 Prioridad:
06.04.2004 DE 102004018347

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:
**SCHMOLZ, DR., MANFRED (100.0%)
ALBSTRASSE 33
72810 GOMARINGEN, DE**

72 Inventor/es:
**SCHMOLZ, MANFRED;
KAUFMANN, ROLF y
UHR, GÜNTHER**

74 Agente/Representante:
TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 393 192 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

Mezcla de mensajeros potenciadora de la cicatrización de una herida

5 [0001] La invención se refiere a una mezcla de mensajeros químicos potenciadora de la cicatrización de una herida. Mediante esta mezcla de mensajeros químicos potenciadora de la cicatrización de una herida se puede favorecer específicamente la cicatrización de una herida. Además, la invención se refiere a un procedimiento para la obtención de la mezcla de mensajeros químicos que potencia la cicatrización de una herida, la utilización de esta mezcla de mensajeros químicos y un lote para la obtención de esta mezcla de mensajeros químicos que potencia la cicatrización de una herida.

15 [0002] Por herida se entiende la interrupción de la conexión de tejidos del cuerpo, con o sin pérdida de sustancia, que se causa debido a un daño celular por lesión mecánica o física. En este caso pueden aparecer diferentes formas de heridas, como por ejemplo:

Herida mecánica: estas se originan por efecto de violencia externa, sobre todo por heridas por cortes o por arma blanca (corte afilado o puntiagudo), por aplastamiento, heridas abiertas, desgarros y abrasiones (romo), heridas por mordeduras y arañazos (combinación de agudo-romo) y por heridas de bala.

20 Heridas térmicas: estas se originan por el efecto del calor (quemaduras) o del frío (congelación).

Heridas químicas: estas se originan sobre todo por abrasión con ácidos o lejías.

25 Heridas por radiación: estas están causadas por el efecto de la radiación actínica (radiación ultravioleta) y la radiación ionizante.

30 [0003] Para la regeneración de tejido destruido o para el cierre de una herida es necesaria concretamente la formación de nuevo tejido conectivo y de capilares. Los procedimientos fisiológicos que conducen a la regeneración del tejido destruido se conocen como cicatrización de una herida. En la cicatrización primaria de una herida se realiza un cierre rápido y sin complicaciones y una regeneración extensa del tejido destruido a causa de la renovación mínima del tejido conjuntivo entre los bordes de la herida bien irrigados y, dado el caso, adaptados de una herida limpia. En caso de heridas con espaciado amplio (bordes de herida aplastados o necróticos) o en caso de infección en la herida, se produce un retraso en la cicatrización secundaria de la herida. En este caso puede acompañarse de una inflamación bacteriana para rellenar el defecto tisular con tejido de granulación y seguidamente con un tejido cicatricial extenso. La epitelización desde el borde forma el cierre de la cicatrización de la herida.

40 [0004] La cicatrización de la propia herida se divide en diferentes fases. En la primera fase, llamada fase de latencia, existe a) una fase exudativa con formación de costra (en las primeras horas), y b) una fase resorptiva con autólisis catabólica (desde el primer hasta el tercer día). En la segunda fase, llamada fase de proliferación, se produce una reparación anabólica con formación de colágenos por los fibroblastos (del cuarto hasta el séptimo día). En la tercera fase, llamada fase de reparación, se produce la transformación del tejido de granulación en una cicatriz (a partir del octavo día).

45 [0005] La cicatrización de una herida puede conducir a una infección de la herida a consecuencia de una infección bacteriana de la herida con los signos clásicos de una infección local. Esto representa un fenómeno indeseado en la cicatrización de una herida, puesto que para su tratamiento es necesario una revisión frecuente de la herida, una muestra para un examen microbiológico o un desbridamiento para la eliminación de tejido necrótico, cuerpos extraños, etc. Además, a menudo se debe considerar una limpieza y drenaje de la herida (drenaje de pus y exudado), así como un cambio diario de vendaje antiséptico y, dado el caso, añadir antibióticos.

50 [0006] En la implantación, es decir, en la introducción o injerto de materiales ajenos al cuerpo en el organismo, se producen frecuentemente los llamados daños de implantación. Por implantes se conoce la denominación resumida para sustancias y partes que se introducen para el cumplimiento de una determinada función protésica para un período limitado o durante toda la vida en el cuerpo humano y/o animal. Al contrario que el injerto, los implantes están hechos de materia inerte (aloplástico). Se toman en consideración como función protésica sobre todo el soporte, el control o el recambio parcial o completo de una función orgánica (p. ej., implantación de lentes, marcapasos artificiales, válvulas cardíacas artificiales, implantes vasculares de plástico en la cirugía reconstructiva vascular, endoprótesis), el apoyo a procesos de curación (p. ej., inmovilización de una fractura por osteosíntesis), la transmisión de fuerzas (p. ej., reposición estable y exacta de fracturas mediante osteosíntesis), la regulación de deformaciones (p. ej., implantación de barras de Harrington para el enderezamiento de una escoliosis) o el relleno de plástico (p. ej., mamoplastia mediante implantes de materia plástica) o cobertura de defectos (p. ej., cierre de defectos de la bóveda craneal mediante una placa craneal de metal o de plástico). En el caso de implantes a largo plazo gana importancia el problema de la tolerancia al material. Además, los implantes son particularmente usuales en la odontología. En este campo se componen, en general, de materiales aloplásticos (particularmente metal y materiales de procedencia mineral) que sirven para reemplazar la sustancia ósea perdida, para cambiar dientes individuales (implantes individuales), para

proporcionar puentes fijos en caso de una fila de dientes reducida o interrumpida y para la estabilización de prótesis totales.

5 [0007] Para evitar daños de implantación y para el fomento general de la cicatrización de una herida existen una serie de medios o sustancias en el mercado. Se conocen en este caso particularmente los llamados ungüentos vulnerarios, así como en la implantología el revestimiento o la aplicación de soluciones sobre un implante antes de o durante su implantación. Esta(s) solución(es) se compone(n) en parte de sangre o componentes sanguíneos.

10 [0008] El documento WO 99/24044 A1 describe a modo de ejemplo un producto farmacéutico que favorece la cicatrización de una herida que contiene trombocitos o componentes de trombocitos insolubles en agua. De estos se pueden liberar, tras añadirse estímulos fisiológicos, mensajeros químicos potenciadores de la cicatrización de una herida.

15 [0009] El documento WO 02/056897 A2 muestra un producto farmacéutico, especialmente para la potenciación de la regeneración de tejido óseo, que contiene micropartículas que se liberan de células sanguíneas, entre ellas también trombocitos.

20 [0010] Del documento US 5,618,663 se conoce un procedimiento para la fabricación de factores trombocitarios. En él, los trombocitos dan lugar a la liberación de los factores mediante una solución de activación, mientras estos son retenidos por filtración.

25 [0011] El documento WO 01/38495 A2 describe un procedimiento para la elaboración de un preparado trombocitario, con el cual se bloquean los receptores trombocitarios para la trombopoyetina. Mediante un tratamiento previo de este tipo se evita una reducción in vivo del nivel de trombopoyetina después de la transfusión del preparado y se refuerza la propia hematopoyesis.

30 [0012] El documento WO 94/17904 A1 muestra una membrana para uso médico, que está modificada mediante el tratamiento con un plasma de baja presión. Este tratamiento conduce a una reducción de la activación del complemento y la trombogenicidad y con esto a un perjuicio menor de la sangre que fluye en la membrana.

35 [0013] Del documento DE 69320342 T2 (correspondiente a WO93/25215 y a EP 0643582 B1) se conoce el tratamiento de un concentrado de trombocitos sobre un filtro con activadores para inducir a los trombocitos a liberar factores trombocitarios, por lo que la solución activadora que contiene estos factores se filtra mediante la filtración de los trombocitos.

40 [0014] Sin embargo, esta forma de potenciación de la cicatrización de una herida tiene una serie de desventajas. Así se da, p. ej., en caso de aplicación de una solución durante una operación, el riesgo de una posible contaminación, particularmente cuando la sangre se debe centrifugar previamente para la obtención del concentrado trombocitario. Además, la sangre (retirada) debe ser transportada entre la sala de operaciones y la centrifugadora de un lado a otro, lo que puede conducir a una variación de los componentes sanguíneos. También se ha demostrado que la mera aplicación de sangre(componentes) en un implante solo tiene como consecuencia una potenciación marginal de la cicatrización de la herida. Esto es válido también para soluciones que contienen mensajeros químicos o factores plaquetarios que fueron obtenidos mediante tratamiento de trombocitos con activadores. Además, dichas soluciones contienen aún activadores.

45 [0015] La invención, por tanto, tiene el objeto de proporcionar una mezcla de mensajeros químicos mejorada que presenta un efecto potenciador de cicatrización de una herida. Además, se deben poner a disposición mensajeros químicos potenciadores (específicos) de la cicatrización de una herida, que pueden inducir una cicatrización acelerada de la herida. Además se deben evitar las desventajas descritas del estado de la técnica.

50 [0016] Este objetivo se consigue a través de un procedimiento para la obtención de una mezcla de mensajeros químicos que potencia la cicatrización de una herida, tal como se describe en la reivindicación 1. Las formas de realización preferentes se representan en las reivindicaciones 2 hasta 6. Las reivindicaciones 7 hasta 13 se refieren a la utilización de un filtro de membrana para la obtención de la mezcla de mensajeros químicos que potencia la cicatrización de una herida. Las reivindicaciones 14 hasta 19 se refieren a un lote para la obtención de la mezcla de mensajeros químicos que potencia la cicatrización de una herida. Con esto, el texto de todas las reivindicaciones pasa a formar parte por referencia del contenido de la descripción.

60 [0017] Sorprendentemente, se ha hallado que mediante la información trombocitaria se puede obtener el contenido trombocitario como mezcla de mensajeros químicos potenciadora de la cicatrización de una herida, cuyo efecto potenciador de cicatrización de una herida se ve mejorado después de la eliminación de componentes insolubles del líquido corporal.

65 [0018] El objeto de la invención es, por tanto, una mezcla de mensajeros químicos potenciadora de la cicatrización de una herida procedente de trombocitos, en especial de la sangre o del plasma sanguíneo. Está totalmente libre de componentes insolubles en solventes acuosos, en especial de componentes sanguíneos insolubles. La mezcla de

5 mensajeros químicos potenciadora de la cicatrización de una herida contiene esencialmente todos los mensajeros procedentes de trombocitos solubles en agua. La mezcla de mensajeros químicos potenciadora de la cicatrización de una herida según la invención puede estar también esencialmente libre, preferiblemente libre por completo, de sustancias solubles presentes en líquidos corporales a excepción de trombocitos. Además, la mezcla de mensajeros químicos puede existir en forma de una solución acuosa. Alternativamente a esto, la mezcla de mensajeros químicos potenciadora de la cicatrización de una herida puede existir en forma seca, particularmente liofilizada (secado por congelación) y/o en polvo.

10 [0019] La mezcla de mensajeros químicos potenciadora de la cicatrización de una herida, preferiblemente la mezcla de mensajeros químicos potenciadora de cicatrización de una herida presente en solución acuosa, se encuentra en una forma especialmente preferente, en forma estéril y, dado el caso, en embalaje estéril. En caso de los mensajeros químicos se puede tratar además tanto de mensajeros que produce el propio cuerpo (autólogos), es decir, mensajeros químicos que fueron tomados del propio paciente a tratar, así como también de mensajeros químicos ajenos al cuerpo. La ventaja en el uso de mensajeros químicos propios del cuerpo consiste en que se pueden evitar eventualmente reacciones inmunológicas o infecciones que se presenten. Tanto con el uso de los mensajeros químicos ajenos al cuerpo como también con el uso de los mensajeros propios del cuerpo, estos pueden volverse inocuos para evitar una reacción inmune o una infección por antígenos eventualmente existentes o partículas patógenas. Esto se puede realizar durante o después de la extracción de sangre, pero antes de la obtención de los mensajeros químicos, también se prevé principalmente una inactivación de la partícula patógena eventualmente existente tras la obtención de la mezcla de mensajeros químicos. La mezcla de mensajeros químicos potenciadora de la cicatrización de una herida según la invención puede aplicarse también sobre la superficie corporal. La mezcla de mensajeros químicos potenciadora de la cicatrización de una herida según la invención no contiene componentes sanguíneos insolubles, como p. ej., material(es) de pared celular, que presentan antígenos conocidos y pueden inducir una reacción inmunológica o una infección. Por consiguiente, si es necesario, basta con añadir concentraciones de supresores inmunológicos, antibióticos, etc. escasas a título comparativo, al utilizar la mezcla de mensajeros químicos potenciadora de la cicatrización de una herida según la invención, lo cual sirve para mejorar de forma determinante la tolerancia de la mezcla de mensajeros químicos.

30 [0020] Generalmente, en el caso de la mezcla de mensajeros químicos potenciadora de la cicatrización de una herida o en el caso de los mensajeros químicos que potencian la cicatrización de una herida, puede tratarse de aquellos que influyen en la expresión genética y/o la función de las células, en particular aquellos del tejido conectivo, del sistema inmunológico, de la piel y/o de los huesos y que estimulan su actividad reparadora de heridas. Por células del tejido conjuntivo se entienden particularmente fibroblastos y/o fibrocitos. Por células del sistema inmunológico se entiende aquellas que se comunican, directa o indirectamente con las células de la piel, de las mucosas y/o del tejido conjuntivo y, con ello, estimulan la actividad reparadora de heridas. Principalmente son aquellas células del sistema inmunológico, p. ej., leucocitos, en particular los monocitos, macrófagos, granulocitos y/o linfocitos. En el caso de las células epiteliales se trata p. ej., de queratinocitos. Por osteocitos se entiende principalmente los llamados osteoblastos y/o osteoclastos. La mezcla de mensajeros químicos según la invención puede influir y, en particular, estimular individualmente todos estos tipos de células (especialmente las células del tejido conjuntivo, las inmunológicas, las epiteliales, así como los osteocitos) o según el tipo de herida, el tipo de tejido o el lugar de aplicación de la mezcla de mensajeros químicos.

45 [0021] En el caso de los mensajeros químicos que potencian la cicatrización de una herida, una forma de realización especialmente preferente son los mediadores, particularmente mediadores como TGF β (*transforming growth factor β* , factor de crecimiento transformante β) PDGF (*platelet derived growth factor*, factor de crecimiento derivado de plaquetas), VEGF (*vascular endothelial growth factor*, factor de crecimiento vascular endotelial) und/oder IGF (*insulin-like growth factor*, factor de crecimiento similar a la insulina).

50 [0022] El objeto de la invención es un procedimiento para la obtención de la mezcla de mensajeros químicos potenciadora de la cicatrización de una herida según la invención, en el cual se obtienen los mensajeros químicos presentes en los fluidos corporales extraído, particularmente sangre o plasma sanguíneo, tras la separación de los fluidos corporales en sobrante y sedimento del sobrante separado. La obtención de los mensajeros químicos tiene lugar gracias a la liberación del contenido total de trombocitos por su afloramiento. Esta es una diferencia esencial para la liberación únicamente de los mensajeros químicos contenidos en las vesículas de los trombocitos tras la adición de activadores, como es el caso en el procedimiento que describe el documento DE 693 20 342 T2. La sangre puede relacionarse con, por lo menos, un inhibidor de coagulación de la sangre antes de la separación en sobrante y sedimento. El experto conoce una serie entera de sustancias como inhibidores de coagulación de la sangre utilizables. Así se puede inhibir, p. ej., la coagulación de la sangre de forma fisiológica mediante endotelio vascular intacto, antitrombina III, productos de degradación de fibrina, heparina, etc. y de forma farmacológica, mediante los anticoagulantes y fibrinolíticos. El experto conoce otros inhibidores de coagulación de la sangre y la invención los abarca del mismo modo.

60 [0023] En otra forma de realización preferente se realiza la separación o sedimentación en presencia de, al menos, un acelerador de sedimentación, preferiblemente un polisacárido y/o un polisacárido sustituido, en especial el dextrano, el sulfato de dextrano y/o el almidón de hidroxietilo. Particularmente en el uso de aceleradores de sedimentación puede tener lugar la sedimentación sin centrifugación (previa). En este caso en particular puede tener lugar la sedimentación exclusivamente a través de la influencia de fuerza de gravedad natural. Así puede tener lugar, p. ej., con el uso de la

fuerza de gravedad natural, la separación en sobran­te y sedimento mediante el reposo natural de la sangre extraída previamente. El sobran­te puede con­ter­ner esencialmente trombocitos, mientras que el sedimento representa esencialmente la fracción de eritrocitos del sangre. La separación de la fracción de trombocitos de la de eritrocitos puede tener lugar, p. ej., esencialmente justo después de la extracción de sangre. La rápida separación de la fracción de trombocitos y la de eritrocitos tiene la ventaja de que pueden eliminarse rápidamente de la prueba los factores que actúan de forma inhibitoria sobre la mezcla de mensajeros químicos. De esta forma, los mensajeros químicos que potencian la cicatrización de una herida poseen la mejor actividad biológica posible. Además, la actividad de la mezcla de mensajeros químicos, es decir, su efecto estimulante/potenciador de cicatrización de una herida, puede ser independiente de la "frescura" del análisis de sangre. Una alternativa a la separación de la fracción de trombocitos y de eritrocitos directamente posterior a la extracción de sangre también puede ser un almacenamiento del análisis de sangre, p. ej., mediante refrigeración o conservación. Cuando más tarde se necesite la prueba almacenada o su contenido (es decir la mezcla de mensajeros químicos potenciadora de la cicatrización de herida obtenida previamente, que puede ser almacenada igualmente), se puede llevar a cabo la obtención de la mezcla de mensajeros químicos que potencia la cicatrización de una herida, o también puede entrar en acción una mezcla de mensajeros químicos que potencia la cicatrización de una herida obtenida anteriormente (y almacenada hasta el momento). Un procedimiento para la "conservación" de una mezcla de mensajeros químicos potenciadora de cicatrización de una herida obtenida anteriormente es p. ej., la liofilización (secado por congelación). El experto conoce otros métodos de conservación. La ventaja de un almacenamiento o conservación del material inicial y/o la mezcla de mensajeros químicos previamente obtenida consiste en que, en caso de necesidad previsible, como p. ej., en caso de una operación pendiente, se puede empezar antes con la obtención de la mezcla de mensajeros químicos. Con esta forma de proceder es posible obtener cantidades más grandes de material inicial o mezcla(s) de mensajeros químicos potenciadora(s) de cicatrización de una herida a través de múltiples extracciones en cantidades de sangre más pequeñas y almacenarlas para casos de necesidad, sin cargar mucho el organismo (si este fuera el caso p. ej., por la extracción de cantidades mayores de sangre), lo cual es conveniente para la regeneración. Independientemente de la actividad de los mensajeros químicos, se puede almacenar o bien el material inicial o bien la mezcla de mensajeros químicos. El plasma que contiene trombocitos obtenido como sobran­te se depura con una solución tampón. En ella se depuran en particular los trombocitos. El experto conoce una serie de soluciones tampón que se pueden utilizar para dicha depuración.

[0024] De esta manera, el contenido en trombocitos mismo puede ser liberado, de modo que incuben los trombocitos obtenidos previamente con un líquido acuoso, agua o solución, con lo cual la incubación con un líquido de este tipo lleva a una liberación de los mediadores. En este caso, el contenido de los trombocitos se libera a través de la disgregación, particularmente la lisis, de los trombocitos (p. ej., al añadir agua destilada o una solución hipotónica, al aplicar un vacío, un ultrasonido, la digestión enzimática, etc.). Es preferible que el líquido acuoso posea una presión osmótica más baja que el contenido de trombocitos. Un líquido acuoso de este tipo puede ser, p. ej., agua destilada. Los trombocitos pueden liberarse esencialmente de los restos de la solución, compuesta de plasma, del acelerador de sedimentación y del inhibidor de coagulación antes de la liberación de los mediadores a través de la depuración previa con una solución tampón fisiológica.

[0025] En otra forma de realización preferente, se recoge el contenido de trombocitos en el líquido de liberación y la solución obtenida, en particular la solución acuosa, del contenido de trombocitos se filtra, en particular se filtra de forma estéril. Como líquido de liberación puede servir particularmente agua destilada. La incubación de los trombocitos en la solución de liberación, así como la liberación de los mediadores y en particular también la depuración de los trombocitos se efectúa en otra forma de realización preferente en un filtro, en particular un filtro estéril. La depuración puede llevarse a cabo, p. ej., con la solución tampón (fisiológica), la incubación de los trombocitos con agua destilada. La cantidad de líquido o solución, particularmente de agua destilada se mide de modo que se provoque el estallido osmótico de los trombocitos, dado el caso, de los trombocitos situados particularmente sobre el filtro (estéril). Además, la cantidad de agua destilada o, generalmente, la cantidad de una solución de liberación pueden ser de tales dimensiones, que después de la liberación del contenido de trombocitos, p. ej., a través de estallido osmótico, se produce una solución isotónica del contenido de trombocitos en la solución de liberación, p. ej., en agua destilada. Esto tiene la ventaja de que la mezcla de mensajeros químicos obtenida de este modo puede aplicarse directamente sobre una herida o sobre un implante. Mientras no exista ninguna solución isotónica, los mensajeros químicos liberados se pueden aplicar no obstante directamente sobre un implante o una herida. Se puede equilibrar la pequeña diferencia eventual del valor osmótico para el valor fisiológico del tejido. El estallido osmótico de los trombocitos tiene la ventaja de que puede realizarse con poco esfuerzo preparatorio. La realización del procedimiento según la invención puede llevarse a cabo directamente en el quirófano o en una consulta médica. Así, se puede llevar a cabo directamente in situ la extracción de sangre, la liberación del contenido de trombocitos y/o también la utilización del contenido de trombocitos, p. ej., la aplicación sobre una herida o sobre un implante. De este modo se puede ganar tiempo y evitar una posible disminución de la actividad de los mensajeros químicos o una contaminación de la prueba.

[0026] Además, la mezcla de mensajeros químicos potenciadora de la cicatrización de una herida de fluidos corporales que contienen trombocitos, particularmente sangre o plasma sanguíneo, se usa conforme a una forma de realización preferente, para el revestimiento de materiales de soporte, particularmente materiales para implantes. Se conocen como materiales para implantes, p. ej., los implantes utilizados en la odontología, así como implantes vasculares o implantes de órganos. En relación a otros posibles implantes se hace referencia a la descripción del texto precedente. Además, se usa al menos un mensajero químico de fluidos corporales que contiene trombocitos, particularmente sangre o plasma sanguíneo, para la potenciación, particularmente estimulación, de la cicatrización de una herida en la piel, la mucosa, el

tejido y/o los huesos conforme a la forma de realización preferente. En este caso, el mensajero químico o la mezcla de mensajeros químicos puede aplicarse tanto sola como en combinación con un implante. Se prefiere especialmente la utilización de unos mensajeros químicos de fluidos corporales que contienen trombocitos, particularmente sangre o plasma sanguíneo, para la fabricación de un medicamento o una composición farmacéutica para potenciar, y particularmente estimular, la cicatrización de una herida. De este modo se pueden emplear, p. ej., uno o varios mensajeros químicos en forma de ungüento, que se pueda aplicar sobre las heridas.

[0027] En otra forma de realización preferente un filtro, particularmente un filtro estéril, se utiliza como recipiente para la liberación de mediadores de trombocitos y para la obtención de una mezcla de mensajeros químicos que potencia la cicatrización de una herida en forma de un filtrado acuoso estéril. En este caso, se puede usar como filtro un filtro de uso comercial. Según el volumen de la suspensión de trombocitos modificada, también se puede utilizar un diámetro de filtro diferente. De este modo, p. ej., los filtros para volúmenes pequeños de plasma rico en plaquetas poseen un pequeño volumen muerto, de modo que en la obtención de la solución de mediadores se pueden obtener igualmente pequeñas cantidades necesarias de solución de irrigación para la depuración. Para volúmenes grandes de plasma adecuados los filtros de un tamaño correspondiente, es decir, filtros con una mayor superficie filtrante. Los filtros adecuados se venden, p. ej., en la empresa Millipore Corp. Estos filtros poseen tamaños diferentes para el mismo material de filtro o membrana (polietersulfona) por una parte y carcasa (fibra acrílica), por otra. Un filtro según la invención, en particular un filtro estéril, posee preferiblemente un enlace de muestras pequeño, es decir, un enlace de proteínas, para que la pérdida de material sea lo más pequeña posible. En el lado interior del filtro (carcasa y membrana) puede haber por lo tanto, p. ej., un revestimiento que impida una coagulación, así como una adhesión de trombocitos o que, al menos, la reduzca. Preferiblemente se piensa en un acoplamiento covalente de inhibidores de coagulación de la sangre, p. ej., heparina o materiales similares, como estos se utilizan, p. ej., con catéteres venosos centrales o también endoprótesis. Sin un revestimiento así se pueden perder algunos mediadores, porque los trombocitos se pueden activar al entrar en contacto con el material de filtro. Los mediadores liberados ya a causa de esto se lavan entonces durante el proceso de lavado. El filtro, particularmente un filtro estéril, tiene, según otra forma de realización preferente, un tamaño de poros de 0,1 hasta 0,5 μm , preferiblemente de aprox. 0,2 μm , especialmente preferiblemente de aprox. 0,22 μm . Generalmente, en la elección del filtro adecuado, es preferible un filtro que retenga cantidades de trombocitos lo más grandes posibles. Los mismos trombocitos (plaquetas sanguíneas) son componentes sanguíneos corpusculares sin núcleo formado, con forma de disco, con un diámetro de 2 hasta 3,5 μm y de un espesor de 0,5 hasta 0,75 μm que se encuentran en el médula ósea. Por lo tanto, para que los trombocitos queden retenidos en el filtro, el tamaño de los poros del filtro no debería ser mayor de 0,5 μm . Algunos de los filtros adecuados son, p. ej., el filtro ya mencionado más arriba de la compañía Millipore Corp., así los filtros Millex® GP, que están hechos de polietersulfona y se venden con un diámetro de 25 mm o 50 mm y poseen membranas de polietersulfona hidrofílica. Dichos filtros tienen una permeabilidad alta y un volumen muerto pequeño, de manera que se puede trabajar con volúmenes pequeños.

[0028] Además, se reivindica un lote según la invención para la obtención de mezclas de mensajeros químicos que potencian la cicatrización de una herida de fluidos corporales que contienen trombocitos con un filtro, particularmente un filtro estéril, con lo cual el a) filtro, particularmente el filtro estéril, presenta un tamaño de poros de 0,1 μm hasta 0,5 μm , preferiblemente de aprox. 0,2 μm , especialmente preferible de aprox. 0,22 μm . Este lote se utiliza para la aplicación o realización del procedimiento para la obtención de mezclas de mensajeros químicos. Además, el lote puede contener un b) instrumental de extracción de sangre con c) sistema de extracción de sangre, particularmente un tubo de extracción de sangre, particularmente uno con un acelerador de sedimentación, preferiblemente un tubo de extracción de sangre llenado previamente con un polisacárido y/o un polisacárido sustituido, particularmente dextrano, sulfato de dextrano y/o almidón de hidroxietilo (HES) o un cilindro de jeringa para la extracción de sangre, d) inhibidor de coagulación de la sangre. Para las otras características del acelerador de sedimentación, el inhibidor de coagulación de la sangre o la sustancia para la estimulación de la liberación y/o generación de mensajeros químicos de trombocitos se hará referencia al texto de la descripción precedente correspondiente. El lote puede contener también e) una jeringa de vacío, particularmente una jeringa de vacío con una cánula adecuada para la incorporación de la fracción rica en trombocitos del sobrante, f) un recipiente de recolección, particularmente un recipiente de recolección estéril, preferiblemente una jeringa de vacío estéril para la incorporación de mensajeros químicos que potencian la cicatrización de una herida por filtración, particularmente por filtración estéril, g) así como, en su caso, una o dos llaves de tres vías. El lote también puede contener h) otra jeringa, particularmente una jeringa llenada previamente con una solución tampón fisiológica, así como i) otra jeringa, particularmente una jeringa llenada previamente con una solución de liberación. El inhibidor de coagulación de la sangre y/o la sustancia para la estimulación de la liberación y/o generación de mensajeros químicos que potencian la cicatrización de una herida se encuentra, según otra forma de realización preferente, en forma de líquido en el sistema de extracción de sangre, particularmente en el tubo sanguíneo o cilindro de jeringa. Como alternativa a esto, en otra forma de realización preferente, finalmente el inhibidor de coagulación de la sangre puede estar contenido de forma preferiblemente seca, particularmente liofilizada, en el sistema de extracción de sangre, particularmente en el tubo sanguíneo o cilindro de jeringa.

[0029] Las características existentes y otras características de la invención resultan de la descripción siguiente de las formas de realización preferentes junto con las reivindicaciones secundarias. Aquí pueden llevarse a cabo las características individuales respectivamente para sí mismas o para varios combinadas entre sí.

[0030] En las figuras se muestra:

Fig. 1: una posible forma de realización según la invención para la obtención de una mezcla de mensajeros químicos potenciadora de la cicatrización de una herida.

Fig. 2: otra posible forma de realización según la invención para la obtención de una mezcla de mensajeros químicos potenciadora de la cicatrización de una herida.

5

[0031] La fig. 1 muestra una representación esquemática de una posible forma de realización para la obtención de la mezcla de mensajeros químicos potenciadora de cicatrización de una herida según la invención. En este caso, hay tres jeringas [1, 4, 5] conectadas a dos llaves de tres vías [2]. Las dos llaves de tres vías [2] están abridadas por su parte a un filtro estéril [3]. La dirección de flujo para cada jeringa [1, 4, 5] se puede ajustar de manera separada. En este caso, las llaves de de tres vías se pueden posicionar de tal manera que se cierre la dirección de flujo para la jeringa a ajustar o se abra en la dirección del filtro estéril [3].

10

[0032] La jeringa [1] (p. ej., una jeringa de 20 ml) contiene plasma rico en trombocitos obtenido previamente. La jeringa [1] está unida al filtro estéril [3] mediante la primera llave de tres vías [2]. La segunda jeringa [4] está unida igualmente al filtro estéril [3] mediante la primera llave de tres vías [2]. La dirección de flujo en dirección al filtro estéril [3] se encuentra cerrada para la jeringa [4], cuando la llave de tres vías está posicionada de tal manera que la dirección de flujo se abre para la jeringa [1], y viceversa. La suspensión de plaquetas, contenida en la jeringa [1], se monta sobre el filtro estéril y la proporción líquida de la suspensión de plaqueta se filtra. Luego se puede retirar la jeringa [1] de la llave de tres vías [2] y sustituirla por otra jeringa (no representado), que contenga una solución tampón, para lavar así en su caso el filtro estéril [3] mediante esta solución tampón.

15

20

[0033] A continuación, se gira la llave de tres vías [2] de tal manera que se cierra la dirección de flujo de la jeringa con la suspensión de plaquetas [1] o solución de lavado/de tampón y se abre la dirección de flujo de la jeringa con la solución de lisis (p. ej., agua destilado) [4] hacia el filtro estéril [3]. Una vez haya actuado la solución de lisis (p. ej., agua destilada), se liberan los mediadores contenidos en las plaquetas que quedan recogidos mediante la segunda llave de tres vías [2] que conecta el filtro estéril [3] a un recipiente de recolección (p. ej., tubo de vacío con septo de caucho) [5], en el recipiente de recolección [5]. Estos representan la solución de mediadores lista para el uso. Si la solución de mediadores recogida en el recipiente de recolección debe ser modificado, la jeringa que contiene la solución de lisis [4] puede ser extraída y sustituida por otra jeringa [no representada], que contiene los modificadores deseados (p. ej., vitaminas, oligoelementos, solución tampón, etc.).

25

30

[0034] La fig. 2 muestra otra representación esquemática de una forma de realización posible para la obtención de la mezcla de mensajeros químicos que potencian la cicatrización de una herida según la invención. Están representadas dos jeringas [1, 4] que están conectadas a una llave de tres vías [2]. El filtro estéril [3] está abridado a la llave de tres vías [2]. El recipiente de recolección [6] está fijado directamente a la salida del filtro estéril [3]. La dirección de flujo para ambas jeringas [1, 4] puede igualmente, como se describe en la fig. 1, se puede ajustar por separado mediante la llave de tres vías [2] de tal manera que se cierre la dirección de flujo para la jeringa a ajustar o se abra en dirección al filtro estéril [3], con lo cual solo una de las dos jeringas [1, 4] siempre presenta una dirección de flujo abierta. La concentración de la suspensión de plaquetas el lavado de la suspensión, en su caso, sobre el filtro estéril y la lisis de las plaquetas se realiza esencialmente como se describe en la fig. 1. La conexión entre el filtro estéril [3] y el recipiente de recolección [6] puede realizarse, p. ej., a través de una conexión Luer, de modo que la obtención estéril de la solución de mediadores es posible en el sistema cerrado.

35

40

45

Ejemplo

Realización:

[0035] En primer lugar, se extrae sangre considerando las medidas de precaución (10 hasta 50 ml). En este caso, se piensa particularmente en material autólogo, es decir material que se obtendrá de aquella persona que también deba recibir la mezcla de mensajeros químicos. De esta manera, se pueden evitar problemas relacionados con la existencia de infecciones no reconocidas como VIH, VHB, VHC, CMV, etc. Sin perjuicio de la esterilidad para evitar la contaminación de una herida se toma la prueba de sangre con ayuda de un tubo de extracción de sangre. Este tubo de extracción de sangre se trata de un tubo con función doble (Monovetten o Kabevetten), el cual presenta jeringa y tubo de ensayo en uno. Durante la extracción se mezcla la sangre que entra en el tubo con la mezcla ya introducida compuesta de inhibidor de coagulación y HES en el tampón fisiológico. La mezcla queda mejorada debido a que justo después de la extracción de sangre se retira el tubo de la cánula de extracción, se cierra el capuchón de pistón de la jeringa y el tubo se inclina ligeramente varias veces ("end-overend"). Inmediatamente después, el tubo coloca en posición vertical en la gradilla correspondiente. Allí permanece de 60 hasta 120 minutos. A continuación, el plasma rico en trombocitos que se forma sobre el sedimento de eritrocitos se absorbe mediante una jeringa de vacío y una cánula extralarga, sin arrastrar glóbulos rojos del sedimento. Esto tiene lugar mediante la punción del septo de caucho previamente desinfectado en la tapa del tubo o también directamente sobre el tubo (una vez retirada la tapa). A continuación, se retira la cánula de la jeringa y se aplica la suspensión de trombocitos (mediante la jeringa) sobre un filtro estéril. A tal objeto, se abre la jeringa a una llave de tres vías (frente a una jeringa con agua destilada). Un filtro de 25 mm se puede alimentar con aprox. 4 ml de suspensión de trombocitos y un filtro de 50 mm, con aprox. 15 ml hasta 20 ml de suspensión de trombocitos. Tras el filtrado del porcentaje líquido de la suspensión, se retira la jeringa

50

55

60

65

5 utilizada para la aplicación de la suspensión de trombocitos de la llave de tres vías y se coloca en su lugar la jeringa con la solución tampón. El filtro estéril se limpia ahora con esta solución tampón (volúmenes de aprox. 1 ml hasta 20 ml). A tal objeto, la solución tampón se presiona igualmente a través del filtro. Si la jeringa está vacía, puede permanecer unida a la llave de tres vías. Finalmente, el recipiente de recolección se cambia a la salida del filtro estéril (si se realiza la fijación del recipiente de recolección con una conexión Luer, es posible la obtención estéril de la solución de mediadores en el sistema cerrado).

10 [0036] Como alternativa se pueden utilizar como recipiente de recolección tubos de vacío con septo de caucho, de modo que se añada una cánula a la salida del filtro estéril, la cual se pinchará más adelante a través del tapón de caucho de un tubo de vacío. En este caso, se aspira solución tampón por el vacío del tubo de recolección, lo cual se puede apoyar mediante una suave presión sobre el émbolo de la jeringa.

15 [0037] A continuación, la llave de tres vías se posiciona de modo que la dirección de flujo de la jeringa con agua destilada esté abierta para el filtro. Después se impulsa la mitad del agua destilada hacia el filtro. En este caso, la jeringa puede contener un tope que detenga la cantidad de líquido restante tras haber suministrado la mitad de agua destilada. Ahora el filtro se incubaba (siempre con la jeringa puesta) durante 5 minutos en posición vertical. Esto se realiza a temperatura ambiente, que no debe situarse sobre los 40 °C o bajo los 4 °C en el lugar de la incubación. A continuación, se impulsa el resto de agua destilada a través del filtro. A través de la influencia del agua destilada, no se estimula a las plaquetas como siempre con una activación dependiente de receptores para la liberación de los mediadores como es el caso del procedimiento según el documento DE 693 20 342 T2 mencionado arriba, sino que se conduce al estallido a través de presión osmótica, lo que lleva a una más completa y rápida liberación. La solución obtenida de este modo en el recipiente de recolección forma una solución de mediadores lista para el uso, con la cual puede realizarse el tratamiento de heridas o el revestimiento de implantes. Dado que no se necesitan activadores que induzcan a los trombocitos a la liberación de los mensajeros químicos, sino que la liberación tiene lugar a través de la destrucción de los trombocitos, la solución de mediadores tampoco contiene activadores. La cantidad de líquido de liberación, particularmente agua destilada, se calcula de modo que se pueda obtener una solución principalmente fisiológica (contenido de proteína, valor osmótico) además de los contenidos celulares receptivos, liberados particularmente por el estallido de los trombocitos. De 4 ml de suspensión de trombocitos se obtiene aproximadamente 0,4 ml de solución de mensajeros químicos y de 20 ml de suspensión, aprox. 2 ml de solución de mensajeros químicos. Por consiguiente, el rendimiento está referido aprox. un 10% al volumen de la suspensión de trombocitos.

30 [0038] Finalmente, mediante el examen de la solución de mediadores para los propósitos de control de calidad, se realizan pruebas mediante un método adecuado. Se consideran métodos de prueba adecuados, p. ej., análisis de la concentración de los mediadores individuales con ELISA y/o mediciones de la actividad biológica de mediadores individuales en bioensayos celulares.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la obtención de una mezcla de mensajeros químicos potenciadora de cicatrización de una herida
compuesta de fluidos corporales que contienen trombocitos, particularmente sangre o plasma sanguíneo, que está libre
de componentes insolubles en solventes acuosos, particularmente componentes sanguíneos insolubles, conteniendo el
contenido de trombocitos soluble en agua con principalmente todos los mensajeros químicos solubles de los
10 trombocitos, siendo obtenidos los mensajeros químicos presentes en los fluidos corporales extraídos, particularmente
sangre o plasma sanguíneo, tras la separación de los fluidos corporales en sobrante y sedimento del sobrante
separado, lavando los trombocitos con la solución tampón, liberando los mensajeros químicos de los trombocitos y
filtrando la solución obtenida, siendo el contenido de trombocitos liberado con todos los mensajeros químicos de los
trombocitos mediante la disgregación de los trombocitos, **caracterizado por que** la disgregación de los trombocitos
tiene lugar mediante lisis.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado por que** la sedimentación es realizada en presencia de al
menos un acelerador de sedimentación, preferiblemente un polisacárido y/o polisacárido sustituido, particularmente
dextrano, sulfato de dextrano y/o almidón de hidroxietilo (HES).
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** se lleva a cabo una sedimentación sin
centrifugación.
- 25 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 3, **caracterizado por que** el contenido de trombocitos se
libera de modo que se incuban los trombocitos con un líquido acuoso, particularmente una solución acuosa, que lleva a
una liberación de los mensajeros químicos a través de estallido osmótico de los trombocitos.
- 30 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 4, **caracterizado por que** se recoge el contenido
trombocitos en un líquido de liberación, particularmente agua destilada, y se filtra la solución obtenida del contenido de
trombocitos, se filtra particularmente de forma estéril.
- 35 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 5, **caracterizado por que** tiene lugar la disgregación de los
trombocitos con un líquido de liberación, así como la liberación de los mensajeros químicos y particularmente también el
lavado previo de los trombocitos sobre un filtro de membrana, particularmente un filtro estéril.
- 40 7. Aplicación de un filtro de membrana, particularmente un filtro estéril, con una membrana de polietersulfona como
recipiente para la disgregación de los trombocitos y para la obtención de una mezcla de mensajeros químicos
potenciadora de cicatrización de una herida compuesta por fluidos corporales que contienen trombocitos,
particularmente sangre o plasma sanguíneo, que están libres de componentes insolubles en solventes acuosos,
particularmente componentes sanguíneos insolubles, conteniendo el contenido soluble en agua de los trombocitos con
principalmente todos los mensajeros químicos solubles de los trombocitos, en forma de un filtrado acuoso estéril.
- 45 8. Aplicación según la reivindicación 7, **caracterizada por que** existe en forma de solución acuosa.
9. Aplicación según la reivindicación 7, **caracterizada por que** existe en forma liofilizada y/o en forma de polvo.
- 50 10. Aplicación según una de las reivindicaciones 7 hasta 9, **caracterizada por que** la mezcla de mensajeros químicos,
preferiblemente la solución acuosa, existe en forma estéril y, dado el caso, en embalaje estéril.
11. Aplicación según una de las reivindicaciones 7 hasta 10, **caracterizada por que** está libre de mensajeros químicos
compuestos por activadores liberadores de trombocitos.
- 55 12. Aplicación según una de las reivindicaciones 7 hasta 11, **caracterizada por que** la mezcla de mensajeros químicos
con contenido celular soluble en agua es una solución esencialmente fisiológica en estado disuelto.
13. Aplicación según la reivindicación 7, **caracterizada por que** la membrana tiene un tamaño de poros de 0,1 hasta
60 0,5 μm , preferiblemente de aprox. 0,2 μm , especialmente preferible de aprox. 0,22 μm .
14. Lote para la obtención de mezclas de mensajeros químicos potenciadoras de cicatrización de una herida
compuestas de fluidos corporales que contienen trombocitos, particularmente para la aplicación o realización del
procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 6 con un
- 60 a) filtro, particularmente un filtro estéril, con lo cual el filtro, particularmente un filtro estéril, que tenga un tamaño de
poros de 0,1 μm hasta 0,5 μm , preferiblemente de aprox. 0,2 μm , especialmente preferible de aprox. 0,22 μm ,
b) instrumental de extracción de sangre con
c) sistema de extracción de sangre, particularmente un tubo de extracción de sangre, particularmente uno con un
65 acelerador de sedimentación, preferiblemente un polisacárido y/o un polisacárido sustituido, particularmente dextrano,

sulfato de dextrano y/o almidón de hidroxietilo (HES), tubo de extracción de sangre llenado previamente o un cilindro de jeringa para el almacenamiento de sangre,
d) inhibidor de coagulación de la sangre,

- 5 15. Lote según reivindicación 14 con
e) una jeringa de vacío, particularmente una jeringa de vacío con una cánula adecuada para almacenar la fracción rica en trombocitos del sobrante,
f) un recipiente de recolección, particularmente un recipiente de recolección estéril, preferentemente una jeringa de
10 vacío estéril, para el almacenamiento de los mensajeros químicos que potencian la cicatrización de una herida tras la filtración, particularmente tras la filtración estéril.
g) eventualmente una o dos llaves de tres vías.
16. Lote según la reivindicación 14 o 15 con
h) otra jeringa, particularmente una jeringa llenada previamente con una solución tampón fisiológica.
15
17. Lote según una de las reivindicaciones 14 hasta 16 con
i) otra jeringa, particularmente una jeringa llenada previamente con una solución de liberación.
18. Lote según una de las reivindicaciones 14 hasta 17, **caracterizado por que** contiene el inhibidor de coagulación de
20 la sangre en forma preferiblemente líquida en el sistema de extracción de sangre, particularmente en el tubo sanguíneo o los cilindros de jeringa.
19. Lote según una de las reivindicaciones 14 hasta 18, **caracterizado por que** el inhibidor de coagulación de la
25 sangre está contenido en el sistema de extracción de sangre preferiblemente de forma seca, particularmente liofilizada, particularmente en el tubo sanguíneo o los cilindros de jeringa.

Fig. 1

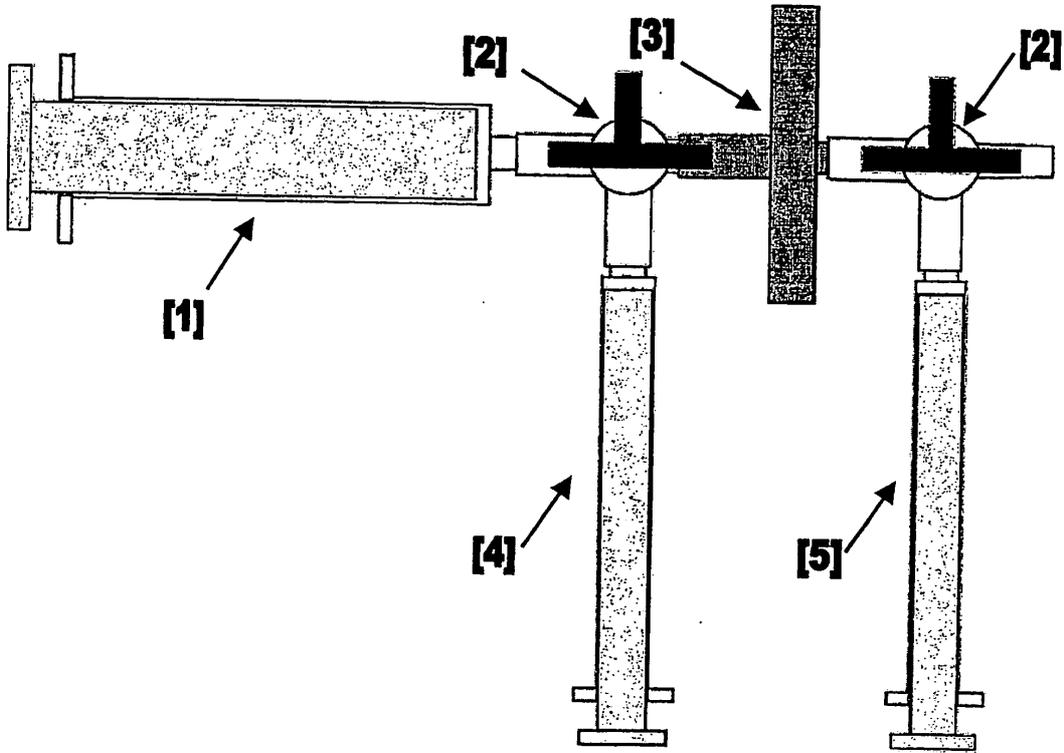


Fig. 2

