

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 718**

51 Int. Cl.:

A61L 24/10 (2006.01)

A61B 17/00 (2006.01)

A61J 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2003 E 10003009 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 2204195**

54 Título: **Sistemas y métodos para preparar pegamento de fibrina autólogo**

30 Prioridad:

15.01.2002 US 53247

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.12.2013

73 Titular/es:

BERETTA, ROBERTO (50.0%)

Via Rho, 8

20125 Milano, IT y

GRIPPI, NICHOLAS A. (50.0%)

72 Inventor/es:

BERETTA, ROBERTO y

GRIPPI, NICHOLAS A.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 434 718 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

Sistemas y métodos para preparar pegamento de fibrina autólogo.

5 Remisión a solicitudes relacionadas

La presente solicitud es una continuación parcial de y reivindica prioridad a la solicitud de Estados Unidos Nº 09/446.729 presentada el 13 de julio de 2001 que se expidió como patente de Estados Unidos Nº 6.368.298 B1, que es una solicitud de 35 U.S.C. § 371 de y reivindica prioridad a la solicitud internacional Nº PCr/IT98/00173 presentada el 24 de junio 1998, que reivindica prioridad a la solicitud italiana Nº MI97A001490 presentada el 24 de junio de 1997. La presente solicitud reivindica prioridad a cada una de las solicitudes mencionadas anteriormente.

Antecedentes de la invención

15 La presente invención se refiere a sistemas, kits y métodos para preparar una red de fibrina sólida o pegamento de fibrina autólogo.

Se sabe que el pegamento de fibrina es un hemoderivado que se usa en gran medida como adhesivo quirúrgico tópico o agente hemostático. Están disponibles varios kits en el mercado que contienen fibrinógeno concentrado de donantes, asociado a un activador proteico de origen humano o animal, tal como trombina o batroxobina, para obtener pegamento de fibrina heterólogo.

Dichos kits conocidos implican el uso de material de origen humano o animal que, debido a su origen, podría provocar posible contaminación viral y graves riesgos para el destinatario del pegamento de fibrina. En el pasado las autoridades han obligado a suspender la comercialización o incluso a prohibir los hemoderivados obtenidos mediante el uso de material de origen humano o animal. Además, a partir de la bibliografía se conocen casos de rechazo resultantes del reimplante de fibrina producidos por el uso de proteínas humanas o animales en pacientes. Dichos casos de hecho se deben al origen heterólogo, con respecto al organismo receptor, de la proteína sellante que se reimplanta o algunos de los componentes usados para prepararla.

El pegamento de fibrina autólogo, es decir, pegamento de fibrina obtenido de forma autóloga de la propia sangre de un paciente, es más fiable con respecto a los riesgos de rechazo y/o infección. Ya se han descrito varios procedimientos para obtener de forma improvisada pegamento de fibrina autólogo, pero no existe un kit "listo para su uso" disponible en el mercado aunque pueden hallarse algunas referencias relevantes en la bibliografía de patentes.

La patente de Estados Unidos Nº 5.733.545 desvela una concentrado plasmático de capa leuco-plaquetaria a combinar con un activador de fibrinógeno para formar un sellante de heridas de pegamento de plaquetas. El método desvelado en esta patente permite que se procese la sangre de un paciente para obtener pegamento de fibrina autólogo, pero los métodos usan trombina o batroxobina como activador de fibrinógeno. Estos activadores son de naturaleza humana o animal y por lo tanto aún implican el riesgo de rechazo y/o infecciones viral para el paciente.

El documento WO 98/58689 representa un kit listo para su uso para preparar pegamento de fibrina autólogo. Comprende un recipiente precintado que contiene cloruro de calcio como activador de la coagulación y, posiblemente, ácido tranexámico o ácido épsilon-amino-caproico como estabilizador de fibrina. Para producir pegamento de fibrina autólogo, se extrae sangre venosa de un paciente, por ejemplo usando tubos de ensayo estériles. El tubo de ensayo después se introduce en una centrífuga adecuada. La muestra se centrifuga, separando de este modo los glóbulos rojos del plasma citrado. El tubo de ensayo que contiene el plasma separado se mantiene tapado en condiciones estériles y se coloca verticalmente en un pedestal para recuperar el propio plasma. La parte exterior de la tapa del tubo de ensayo entonces se esteriliza usando alcohol desnaturalizado y después se introduce una aguja estéril, que está conectada a una jeringa estéril, en la tapa del tubo de ensayo. La aguja se lleva hasta 3 a 4 mm del menisco que separa las dos fases, y se extraen 4 ml de plasma. Usando la misma aguja, se perfora la tapa del recipiente mencionado anteriormente, que se ha esterilizado previamente usando alcohol. El plasma citrado contenido en la jeringa se aspira completamente en el recipiente. Éste se agita suavemente y, después de aproximadamente dos minutos a 37 °C, se obtiene un coágulo de pegamento de fibrina autólogo estéril.

La patente de Estados Unidos Nº 5.555.007 desvela un método y un aparato para preparar plasma concentrado a usar como sellante tisular. El método consiste en separar el plasma de sangre completa y retirar el agua de dicho plasma poniéndolo en contacto con un concentrador para proporcionar plasma concentrado que después de ello puede coagularse con una solución que contenga trombina y calcio. El aparato comprende un primer separador de centrífuga en una primera cámara, un concentrador (por ejemplo, dextranómero o poliacrilamida) incluido en una segunda cámara que comunica con la primera cámara, y un segundo separador. El método desvelado en esta referencia requiere un largo tiempo para obtener el concentrado de plasma necesario para la posterior preparación de pegamento de fibrina autólogo y el aparato es caro y no desechable. El método no desvela el uso de un activador de la coagulación de calcio, y requiere una etapa de pre-concentración.

65

Muchos métodos y sistemas requieren la transferencia de un fluido desde un recipiente a otro. Por ejemplo, muchos dispositivos químicos y médicos requieren la transferencia de un volumen necesario de líquido a hacer reaccionar secuencialmente con diversos reactivos y alícuotas volumétricas específicas. Una práctica común es retirar los cierres en dos recipientes y pipetear el líquido de un recipiente en el otro. Esta práctica, sin embargo, expone la muestra a contaminantes ambientales. Por ejemplo, esta técnica se usa para transferir plasma que se ha separado de los glóbulos rojos en una muestra de sangre. Se requiere una técnica especial, sin embargo, para retirar el plasma en el menisco de contacto. Frecuentemente los glóbulos rojos de alta densidad, indeseables, de la fracción inferior contaminan la muestra aspirada. Para evitar este problema, la pipeta frecuentemente se mantiene a una distancia segura del menisco (es decir el separador entre el plasma y los glóbulos rojos), provocando de este modo una transferencia incompleta de la muestra. La transferencia incompleta de la fracción deseable produce una producción volumétrica inferior al óptimo y proporciones no estequiométricas de los reactivos de muestra y los del segundo recipiente. Esta segunda condición puede ser una seria fuente de variación del rendimiento del producto. Éste es el caso en muchas reacciones enzimáticas en que las velocidades de reacción son máximas en ciertas proporciones estequiométricas y disminuyen rápidamente a proporciones superiores o inferiores.

Globalmente, se desean métodos y sistemas para preparar pegamento de fibrina autólogo o fibrina sólida que sea capaz de regenerar tejido en un organismo vivo.

Descripción detallada de los dibujos

La Figura 1 es una vista en perspectiva de una primera realización de la invención.

La Figura 2 es una vista en sección transversal de un primer recipiente de la primera realización mostrada en la Fig. 1.

La Figura 3 es una vista en sección transversal de una diferente realización del primer recipiente de la Fig. 2.

La Figura 4 es una vista en sección transversal de una diferente realización del primer recipiente de la Fig. 2.

La Figura 5 es una vista parcial ampliada en sección transversal de una parte de la primera realización de la Fig. 1 que representa un primer extremo de un dispositivo de transferencia empezando a perforar un primer recipiente precintado.

Figura 6 es una vista similar a la expuesta en la Fig. 5 que representa el primer extremo del dispositivo de transferencia perforando completamente el primer recipiente precintado y un segundo extremo del dispositivo de transferencia perforando completamente un segundo recipiente precintado.

La Figura 7 es una vista similar a la Fig. 2 que muestra el primer tubo y sus contenidos invertidos.

La Figura 8 es una vista superior en planta de la primera realización mostrada en la Fig. 1.

La Figura 9 es una vista parcial en sección transversal de la Fig. 8 que muestra el primer recipiente, el segundo recipiente y el dispositivo de transferencia acoplado, y los contenidos del primer recipiente transfiriéndose al segundo recipiente.

La Figura 10 es una vista superior en planta de un kit que plasma la invención.

La Figura 11 es una vista en perspectiva de un sistema integrado.

La Figura 12 es una vista en sección transversal del sistema mostrado en la Fig. 11.

La Figura 13 es una vista en sección transversal similar a la Fig. 12 que muestra el depósito y el primer dispositivo de recogida perforando el primer dispositivo de recogida.

La Figura 14 es una vista en sección transversal similar a la Fig. 12 que muestra el depósito perforando el primer dispositivo de recogida, y vaciando sus contenidos en el dispositivo.

Figura 15 es una vista en perspectiva de otra realización.

La Figura 16 es una vista en sección transversal de la realización mostrada en la Fig. 15.

La Figura 17 es una vista en perspectiva de un dispositivo de transferencia que plasma la invención.

La Figura 18 es una vista en sección transversal tomada a lo largo de la línea 18-18 en la Figura 17.

Antes de explicar una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de componentes expuestas en la siguiente descripción o ilustradas en los dibujos. La invención tiene capacidad para otras realizaciones y para ponerse en práctica o realizarse de diversos modos. Además, debe entenderse que la fraseología y terminología usadas en el presente documento son con fines de descripción y no deben considerarse como limitantes.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un sistema para preparar una red de fibrina sólida autóloga adecuada para regenerar tejido en un organismo vivo, como se define en la reivindicación 1.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para preparar una red de fibrina sólida para regenerar el tejido corporal en un organismo vivo, como se define en la reivindicación 8.

Descripción detallada de la invención

La presente solicitud es una continuación parcial de y reivindica prioridad a la solicitud de Estados Unidos Nº 09/446.729 presentada el 13 de julio de 2001 que se expidió como patente de Estados Unidos Nº 6.368.298 B1, que

es una solicitud de 35 U.S.C. § 371 de y reivindica prioridad a la solicitud internacional N° PCT/IT98/00173 presentada el 24 de junio 1998, que reivindica prioridad a la solicitud italiana N° MI97A001490 presentada el 24 de junio de 1997.

5 El objeto de la presente invención, por lo tanto, es proporcionar un kit listo para su uso, que permita obtener rápidamente pegamento de fibrina autólogo y no provoque infecciones virales y/o casos de rechazo cuando se use en cirugía.

10 Dicho objeto se consigue usando un activador de la coagulación, que no es de origen humano ni animal, sino que es un compuesto inorgánico que por lo tanto no puede infectar y no provoca rechazo.

El kit "listo para su uso" de acuerdo con la presente invención comprende un recipiente precintado que contiene cloruro de calcio como activador de la coagulación. El cloruro de calcio activa el fibrinógeno presente en el plasma del paciente cuando éste se introduce en el recipiente precintado.

15 Los sistemas y kits de acuerdo con la presente invención tienen la gran ventaja de permitir la preparación de pegamento de fibrina autólogo que puede usarse con riesgo de infecciones virales o casos de rechazo. Otra ventaja del kit de acuerdo con la presente invención es que permite la preparación de pegamento de fibrina autólogo a partir del plasma del paciente en un tiempo muy corto así como en la formación de coágulos o membrana o pulverización.
20 Otra ventaja más del kit listo para su uso de acuerdo con la presente invención es que permite obtener el pegamento de fibrina autólogo a costes proporcionalmente inferiores con respecto a los sistemas conocidos.

Ventajas adicionales del kit de acuerdo con la presente invención serán evidentes para los especialistas en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada de algunas realizaciones de la misma.

25 Los recipientes adecuados para el kit de acuerdo con la presente invención incluyen un recipiente de vidrio para antibióticos como se describe posteriormente en este documento en el Ejemplo 1. También pueden usarse tubos de ensayo de vidrio o plástico. El volumen preferido del recipiente es de 5 a 15 ml. Los tubos de ensayo tienen preferiblemente un diámetro que varía de 12 a 16 mm y una altura que varía de 75 a 100 mm. El recipiente debe ser
30 suficientemente grueso para soportar las tensiones resultantes de la diferencia de presión entre su espacio interior y la atmósfera cuando se evacua. Los tubos de fondo hemisférico o cónico son preferiblemente de 0,7 mm de grosor, los tubos de fondo plano son de 1 mm de grosor. Los recipientes de plástico están preferiblemente hechos de resina transparente de poliéster, de 0,2-0,8 mm de grosor, para asegurar un mantenimiento al vacío durante al menos 12 meses después de la producción. Después de la preparación, los tubos de ensayo de plástico, se introducen
35 preferiblemente en un recipiente hermético al vacío de papel de estaño que tiene una capa de polietileno interna sellada por calor para asegurar un perfecto hermetismo hasta la fecha de uso.

Debe observarse que la evacuación de recipientes o tubos de ensayo es aconsejable, sin embargo no necesaria para poner la presente invención en práctica.

40 Los recipientes o tubos de ensayo se precintan con tapas perforables de caucho o silicio, que son adecuadas para asegurar que el recipiente queda perfectamente hermético y para permitir conectarlo a un vacío después de la introducción de los componentes químicos y antes de la etapa de esterilización por vapor o radiación.

45 Después del precintado, los recipientes pueden esterilizarse en vapor a 121°C durante 30 minutos. La esterilización puede realizarse también por irradiación con rayos gamma o haz de electrones.

Aunque puede usarse un estabilizador de fibrina de ácido tranexámico, también es adecuado ácido épsilon-amino-caproico puro y cristalino. La cantidad será de aproximadamente 1 g cuando se usa un recipiente de 25 ml, adecuado para una cantidad de plasma de 20 ml. A veces no es necesario usar un estabilizador de fibrina.

50 Como activador de la coagulación, se usa $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sólido o una solución líquida que contiene calcio en el kit de acuerdo con la presente invención aunque pueden usarse otros activadores de la coagulación (enumerados a continuación). Por ejemplo, se introducirán 11,76 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en un recipiente de 5 ml, usando un dosímetro de precisión (error máximo 1-2 mg), para evitar que se introduzcan componentes foráneos contaminantes.

55 En el caso de un recipiente de 15 ml para una cantidad de plasma de 12 ml, la cantidad de cloruro de calcio deshidratado sólido a introducir será tan elevada como 35,28 mg, mientras que la cantidad de ácido tranexámico será proporcionalmente tan elevada como 300 mg de cristales.

60 En el caso de un recipiente de 25 ml para una cantidad de plasma de 20 ml, la cantidad de cloruro de calcio deshidratado a introducir será tan elevada como 58,8 mg mientras que la cantidad de ácido tranexámico será proporcionalmente tan elevada como 500 mg de cristales.

65 A parte de la forma deshidratada usada en los Ejemplos, el cloruro de calcio puede estar en cualquier otra forma adecuada disponible en el mercado, por ejemplo, como $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Además puede usarse una solución de esta

sal, como se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplos

5 Ejemplo 1 (referencia)

En un recipiente de vidrio de 5 ml para antibióticos, que se puede precintarse al vacío, hecho de vidrio blanco transparente, inerte y de 1 mm de grosor se introdujeron 100 mg de ácido tranexámico, que actúa como estabilizador de fibrina. El ácido tranexámico sintético, que es más del 98% puro, está comercializado por la empresa americana Sigma Inc. Por separado, se preparó una solución 1 M de CaCl_2 , pesando en una báscula de precisión 147,0 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (>99% puro), de la misma empresa americana Sigma Inc.

Esta sal se disolvió en exactamente 1 litro de agua destilada no pirógena ultrapura, durante unos minutos a temperatura ambiente, con agitación frecuente. Usando un dosificador de pistón de precisión, que tiene una precisión de dosificación de $\pm 5\%$ (tipo Eppendorf), se introdujeron 80 μl de la solución de activador en el recipiente de vidrio. En esta etapa, al mismo tiempo que la dosificación, se realiza un filtrado usando un filtro de esterilización de 0,22 μm Millipore, evitando al mismo tiempo cuidadosamente la posible contaminación por parte de polvos o filamentos de cualquier tipo. Finalmente, el recipiente de vidrio se tapa con una tapa de caucho que es perforable y conectable a un vacío, teniendo cuidado al mismo tiempo de no tapar completamente el recipiente, para permitir la posterior conexión a un vacío y posiblemente una esterilización adicional usando gas. El recipiente después se introduce en un dispositivo adecuado para su conexión a un vacío, evitando al mismo tiempo cualquier posible contaminación por parte de partículas sólidas en la atmósfera (filtración CTLPA o HEPA en cámara estéril). Se aplica un vacío tan elevado como 4 ml, usando una bomba de vacío de membrana y un control micrométrico, a la atmósfera interior del dispositivo. Para controlar el nivel de vacío en la atmósfera interior, se usó un medidor de vacío de precisión (precisión N° 1 mbar). Finalmente, sin descargar el dispositivo, se cierra al vacío el recipiente, para recuperarse después de ello para el uso descrito en el siguiente Ejemplo.

Ejemplo 2 (referencia)

Se extraen 10 ml de sangre venosa de un paciente de acuerdo con las disposiciones de las normas de calidad para análisis clínicos, por ejemplo usando tubos de ensayo estériles VACUTAINER® de Becton-Dickinson, con una solución 0,106 M de citrato sódico añadida. Para este fin, pueden usarse tubos de ensayo con etilendiamina-tetraacetato disódico o dipotásico añadido. La muestra se mantuvo cuidadosamente estéril durante la extracción de sangre. Finalmente, la muestra se agitó suavemente para mezclar completamente los componentes, asegurando de este modo la acción anticoagulante del citrato sódico. El tubo de ensayo entonces se introdujo en una centrífuga adecuada, equilibrando al mismo tiempo cuidadosamente el peso del rotor para evitar que se dañe la misma centrífuga. Una vez precintada la cubierta, la muestra se centrifuga a 3500 rpm durante 15 minutos, separando de este modo los glóbulos rojos (que son más espesos) del plasma citrado (sobrenadante). En este caso la producción de plasma, dependiendo principalmente de las características de la sangre donante, fue tan elevada como del 55%. El tubo de ensayo que contenía el plasma separado se mantuvo tapado en condiciones estériles y se puso verticalmente en un pedestal para recuperar el propio plasma, en esta etapa se tuvo cuidado de no agitar el tubo de ensayo, para evitar la mezcla de las dos fases separadas en la centrifugación. La parte exterior de la tapa del tubo de ensayo entonces se esterilizó usando alcohol desnaturalizado y después se introdujo una aguja estéril, que estaba conectada a una jeringa estéril, en la tapa del tubo de ensayo. La aguja se llevó hasta 3-4 mm del menisco que separa las dos fases, y se extrajeron 4 ml de plasma. Usando la misma aguja, se perforó la tapa del recipiente de acuerdo con la presente invención, que se había preparado como se ha descrito en el Ejemplo 1, que se esterilizó previamente usando alcohol. Tan pronto como la aguja perforó la tapa, el plasma citrado contenido en la jeringa se aspiró completamente en el recipiente. Éste se agitó suavemente y, después de aproximadamente 2 minutos a 37°C , se obtuvo un coágulo de pegamento de fibrina autólogo estéril, listo para usarlo inmediatamente.

50 Ejemplo 3 (referencia)

Se extrajeron aproximadamente 18 ml de sangre venosa de un paciente normotipo de 49 años de edad usando tubos de ensayo de 5 ml con citrato sódico VACUTAIIVER® de Becton-Dickinson, teniendo cuidado de agitar suavemente justo tras extraer la muestra. La sangre así recogida se sometió inmediatamente a centrifugación (15 min. a 2500 rpm) para separar el plasma. El plasma (12 ml) se transfirió cuidadosamente a dos tubos de ensayo de 10 ml, que contenían 120 μl de CaCl_2 (10 g/100 ml) cada uno, que se habían preparado como se ha descrito en el Ejemplo 1, pero sin usar ácido tranexámico. Después de mezclar el plasma con el activador, los tubos de ensayo se centrifugaron durante 30 min. a 3000 rpm, obteniendo finalmente dos muestras masivas de fibrina que se insertaron, con todas las precauciones de esterilidad, en 2-3 horas desde la preparación, en la cavidad mandibular vesicular grande provocando la extracción del colmillo izquierdo y el segundo incisivo derecho golpeados, así como la abscisión del quiste presente en el área central de los dientes incisivos. Finalmente se cerraron los bordes gingivales con ocho suturas. Una comprobación radiográfica 15 días después mostró la fibrina aún en su posición, aparentemente intacta. La histología 7 meses después demostró el completo remplazo de la fibrina con tejido óseo, con un mejor curso post-operatorio que con métodos tradicionales, que requieren más de 12 meses para conseguir el mismo resultado. Como no se había usado agente antifibrinolítico para la preparación de la fibrina autóloga, puede

decirse en este caso que dicho aditivo fue útil para el propósito específico.

Ejemplo 4 (referencia)

5 Para producir un pegamento de fibrina adhesivo, se transfirieron 12 ml de plasma, obtenido como en el Ejemplo 3, con todas las medidas para conservar la esterilidad, a un recipiente de 20 ml de acuerdo con la presente invención, preparado como se ha descrito en el Ejemplo 1.

10 Después de agitación cuidadosa, el plasma mezclado se vertió en un portaobjetos de vidrio estéril, del tipo usado en laboratorios químicos, donde el plasma se mezcló con carbonato de calcio estéril y muy puro de origen coralino (BIO-CORAL™·NOTES S.A. Francia), o con fluoruro de calcio (>98% Sigma Inc.). Estas sales de calcio son ambas bien conocidas para los especialistas en la técnica como estimuladores de fibroblastos.

15 Mezclando una parte del plasma con una parte de carbonato de calcio, (por ejemplo; 2 ml con 500 mg), se obtuvo una pasta maleable, estéril y adhesiva y se usó como relleno para espacios subgingivales o diferentes cavidades tras la abscisión de sacos mucosos infectados. La pasta, posicionada para rellenar los espacios vacíos, formó en unos pocos minutos una red de fibrina sólida actuando como taponamiento hemostático y creó un sustrato biológico autólogo que daba soporte a los bordes mucosos en posición y donde comenzó la posterior migración de células conectivas.

20 Ejemplo 5 (referencia)

Para obtener una membrana de pegamento de fibrina, se pusieron 20 ml de plasma, obtenido como en el Ejemplo 3, en un recipiente de fondo plano de 25 ml de acuerdo con la presente invención preparado como en el Ejemplo 1. Después de la cuidadosa agitación habitual, el recipiente se centrifugó durante 40 min. a 4000 rpm con un rotor oscilante. Al final de la operación de centrifugación, desde el fondo del tubo de ensayo se recuperó una membrana de color blanco, muy compacta y resistente a tracción, que tenía el mismo tamaño que el fondo del tubo de ensayo (24 mm de diámetro) y un grosor de 3 mm. Esta membrana autóloga, debido a su compacidad y resistencia, se usó como membrana de sujeción y separación en cirugía dental y general, como sustituta de las membranas sintéticas porosas. La membrana obtenida puede almacenarse estéril durante varios días a 4°C.

Ejemplo 6 (referencia)

35 Para obtener membranas de gran tamaño de pegamento de fibrina, se extrajeron aproximadamente 200 ml de plasma citrado de un paciente, se recogió y se separó en una bolsa de transfusión doble. El plasma se sometió a crioprecipitación por congelación a -80°C durante 12 horas, realizando la descongelación durante una noche a 4°C (este procedimiento es bien conocido para los especialistas en la técnica). La misma mañana, el plasma obtenido mediante este procedimiento se sometió a centrifugación durante 15 min. a 5000 rpm a 4°C para obtener aproximadamente 20 ml de crioprecipitado. Después de la cuidadosa retirada del sobrenadante usando un dispositivo de prensado (por ejemplo, XP100 de la empresa Jouan S.A. Francia) se recogió el crioprecipitado con 20 ml de plasma completo del mismo paciente. Los 40 ml resultantes se pusieron en un recipiente de polipropileno estéril de 35 mm de diámetro, de fondo plano de acuerdo con la presente invención, que contenía la cantidad adecuada de activador, como en el Ejemplo 1. Después de una cuidadosa agitación, el recipiente se centrifugó durante 40 min. a 5000 rpm para obtener una membrana como en el Ejemplo 5, pero más compacta y resistente a tracción debido al mayor contenido de fibrina. Dicha membrana también puede almacenarse en forma estéril durante varios días a 4°C.

50 La membrana obtenida mediante el método descrito en el Ejemplo 5, además de la utilización descrita en el Ejemplo 4, puede usarse como sustrato para el cultivo in vitro de células dérmicas del mismo paciente, para obtener injertos a transplantar en caso de escaldaduras muy graves.

55 Pueden obtenerse membranas de buena calidad útiles para los fines mencionados anteriormente también a partir de plasma separado completo transferido directamente al recipiente de acuerdo con la presente invención. La membrana obtenida será más delgada de que descrita anteriormente, pero aún útil para usos quirúrgicos y como sustrato para el crecimiento celular.

Ejemplo 7 (referencia)

60 Para obtener fibrina para pulverizar a partir de un crioprecipitado, como en el Ejemplo 5, se recogieron 20 ml de crioprecipitado con 10 ml de plasma completo a temperatura ambiente y se agitaron suavemente hasta su completa disolución. El plasma resultante se transfirió cuidadosamente a un recipiente de 50 ml de acuerdo con la presente invención preparado como en el Ejemplo 1, se agitó suavemente para mezclar perfectamente los componentes. Después de 120 s, a temperatura ambiente, el tubo de ensayo se conectó a un compresor de aire estéril de tipo Venturi, conocido por los expertos en la técnica, para distribuir uniformemente sobre la superficie de un órgano sangrante sometido a cirugía (pulmón, corazón, bazo, anastomosis arterial). El plasma concentrado, que contenía fibrinógeno, trombina, iones calcio y otras enzimas de coagulación, se distribuyó sobre el órgano, se coaguló a los

pocos segundos, debido también a las enzimas tisulares activadoras de la coagulación que están presentes en el endotelio del paciente, creando una película de fibrina que tiene una función hemostática protectora. La operación quirúrgica concluyó por lo tanto con la reducción de hemorragias internas e impidiendo de esta manera transfusiones sanguíneas o complicaciones posteriores.

5 La presente invención también proporciona sistemas y métodos para formar una red de fibrina sólida o pegamento autólogo que puede regenerar tejido en un organismo vivo. En estos métodos y sistemas, se obtiene plasma anticoagulado por centrifugación de una muestra de sangre. Los dispositivos de transferencia descritos en el presente documento permiten transferir el plasma a un segundo recipiente que contiene agentes de coagulación de calcio, y después, centrifugar inmediatamente para obtener un red autóloga, estable y densa de fibrina y plaquetas. Los dispositivos de transferencia descritos en el presente documento también pueden usarse para transferir otros líquidos en otras aplicaciones. En otras palabras, los dispositivos de transferencia y los sistemas descritos en el presente documento permiten realizar la centrifugación y la coagulación de manera simultánea. Usando estos sistemas y métodos pueden conseguirse diversas ventajas: 1) la muestra se manipula de manera que se conserva estéril; 2) el volumen de plasma total se transfiere para maximizar un rendimiento completo de un coágulo; 3) la relación estequiométrica de anticoagulante y agente coagulante de calcio se mantiene en un estrecho intervalo para minimizar el tiempo de coagulación; 4) la transferencia se completa rápidamente; 5) los profesionales sanitarios que normalmente no realizan estas operaciones (por ejemplo dentistas) pueden realizar estos métodos y manejar los sistemas fácilmente; y 6) los dispositivos son desechables para impedir su reutilización y la posible contaminación por patógenos transmitidos por la sangre.

En términos generales, la invención proporciona sistemas y métodos integrados para preparar una red de fibrina sólida o pegamento autólogo que puede usarse para regenerar tejido en un organismo vivo. En una realización (mostrada en la Figura 1), el sistema comprende un primer recipiente 10, un segundo recipiente 14 y un dispositivo de transferencia 18. Preferentemente, el primer y segundo recipiente 10, 14 son tubos, y más particularmente, tubos de ensayo, aunque cualquier recipiente que pueda contener un fluido o un líquido y que pueda centrifugarse es adecuado para su uso en la invención. Preferentemente, los recipientes 10, 14 son de vidrio o plástico.

Utilizando técnicas de venopunción, el primer recipiente 10 debe poder extraer sangre en su interior. Preferentemente, para impedir la contaminación, el primer recipiente 10 está precintado con un precinto 22 mientras se está extrayendo la sangre, aunque inmediatamente después de esto, el recipiente 10 puede precintarse. Para precintarse el primer recipiente 10 pueden utilizarse diversos precintos 22, por ejemplo, un tapón de goma, una tapa, una espuma, un elastómero u otro compuesto. El precinto 22 debe poder perforarse o puncionarse, y por lo tanto son materiales preferidos la goma y la silicona a partir de los cuales se fabrica el precinto, aunque puede usarse cualquier material que proporcione un precinto y que pueda perforarse. El primer recipiente 10 puede contener una solución anticoagulante 25. El anticoagulante 25 en la solución comprende preferentemente un agente de unión a calcio. Más particularmente, el anticoagulante 25 puede comprender citrato de sodio, sal disódica, dipotásica y tripotásica del ácido etilendiaminotetraacético y sus combinaciones. Preferentemente, el primer recipiente 10 contiene una solución de citrato de sodio. El anticoagulante 25 tiende a reducir la sangre recogida en el primer recipiente 10 para ponerla en condiciones de centrifugación. Además, el primer recipiente incluye un medio de separación por gradiente de densidad 26, aire 27 así como un fluido de alta viscosidad, baja densidad 28 (véase la Fig. 10 que adicionalmente muestra un kit descrito más adelante).

El medio de separación por gradiente de densidad 26 debe poder separar diferentes fracciones de un líquido o fluido particular en el primer recipiente 10 que tiene diferentes densidades. El medio de separación 26 permite, por densidad, separar por centrifugación fracciones no deseadas del líquido, y posteriormente su eliminación. Por ejemplo, el medio de separación 26 puede separar glóbulos rojos 30 de plasma rico en plaquetas 34 durante la centrifugación de una muestra sanguínea. En un ejemplo, el medio de separación 26 puede encontrarse en el fondo del primer recipiente 10. En otros ejemplos, el medio de separación 26 puede aplicarse en forma de anillo alrededor del interior del primer recipiente 10, o en cualquier otra posición interior adecuada. Aunque cualquier medio de separación por gradiente de densidad 26 que sea capaz de separar líquidos que tengan diferentes densidades durante la centrifugación, es adecuado para su uso en la invención, preferentemente el medio 26 es un gel, y más preferentemente, un gel tixotrópico. La Figura 2 ilustra el primer recipiente 10 después de haberse realizado la centrifugación de una muestra sanguínea, y también muestra el medio de separación de gel 26. Preferentemente, el gel tixotrópico tiene un punto de rendimiento suficiente de tal manera que no fluye en, o se desplaza sobre, el primer recipiente 10 en condiciones ambientales normales, pero fluye a fuerzas centrífugas más altas producidas durante la centrifugación. Más preferentemente, se prefiere un gel que tenga una densidad que sea menor que la densidad alta de la fracción de glóbulos rojos 30 no deseada, pero mayor que la densidad de la fracción de plasma 34 deseada. En otras palabras, se prefiere más un gel u otro medio que pueda separar glóbulos rojos 30 de plasma 34 después de centrifugar una muestra sanguínea. Dicho medio 26 se desplazará o fluirá dentro del recipiente durante la centrifugación, pero no fluirá después de esto, creando por tanto una barrera semipermanente entre fracciones separadas cuando se completa la centrifugación.

Como se muestra en la Figura 3, otro medio de separación por gradiente de densidad 26 que puede emplearse en el primer recipiente 10 es una pluralidad de perlas de plástico 26 que poseen la densidad deseada para la separación de fracciones. Las perlas pueden suspenderse en el fluido de alta viscosidad, baja densidad, necesario para

precintar después el dispositivo de transferencia 38. Durante la centrifugación, las perlas 26 migran a la interfaz entre las dos fracciones 30, 34 y se compactan, de manera similar a la sinterización, para formar una barrera estable entre las fracciones que tienen diferentes densidades (es decir, glóbulos rojos 30 y el plasma 34). El fluido de alta viscosidad, baja densidad, residual, que cubre los sedimentos contribuye a la estabilidad de la capa compactada.

5 Otro medio de separación por gradiente de densidad adecuado incluye dispositivos flotadores poliméricos tales como los descritos en las Patentes de Estados Unidos Nos 5.560.830 y 5.736.033, expedidas por Coleman. La Figura 4 muestra un dispositivo flotador polimérico 26.

10 El fluido inmiscible de baja densidad, alta viscosidad ("fluido BDAV") 28 en el primer recipiente generalmente comprende un aceite inerte. Más preferentemente, el fluido BDAV es poliéster, silicona u otro fluido inerte, y se aplica al primer recipiente en una posición por encima del gel por bombas de desplazamiento o de presión. El fluido BDAV debe poder bloquear o eliminar el flujo a través de la cánula 38 del dispositivo de transferencia 18 después de la entrada en su interior como se describe adicionalmente más adelante.

15 El segundo recipiente 14 (mostrado, entre otras, en las Figuras 1 y 10) contienen los reactivos químicos necesarios para reacciones particulares. El segundo recipiente 14 está precintado con un precinto 24, de manera similar a la del primer recipiente 10, es decir, por un tapón de goma, tapa, espuma, elastómero u otro compuesto. En una aplicación de la invención, como se describe más adelante, el segundo tubo puede contener un activador de coagulación de calcio 36. Como ejemplos de activadores de coagulación de calcio adecuados se incluyen, pero sin limitación, cloruro de calcio, fluoruro de calcio, carbonato de calcio y combinaciones de los mismos, sin embargo, cualquier sal que contenga calcio será adecuada como un activador de coagulación de calcio. Además, otros activadores incluyen gluconato cálcico, fumarato cálcico, piruvato cálcico y otras sales de calcio orgánicas que son solubles en agua y compatibles con la vida humana. El activador de coagulación coagula el plasma cuando se pone en contacto con el mismo. El segundo recipiente 14 puede vaciarse completamente a una presión interna con un valor sustancialmente de cero. El vaciado del segundo recipiente 14 facilita la transferencia de fluido del primer recipiente 10 al segundo recipiente 14 a través del dispositivo de transferencia 18. Dado que no hay moléculas de gas a medida que el segundo recipiente 14 se llena durante la transferencia, no hay compresión del gas residual con aumento de presión resultante. Como resultado, el caudal se maximiza, se facilita la transferencia completa, se conserva la esterilidad eliminando la necesidad de purgar y se conserva la proporción estequiométrica deseada para la reacción deseada.

25 En otra realización, el segundo recipiente también puede contener uno o más de un antibiótico, un analgésico, un agente terapéutico contra el cáncer, un factor de crecimiento plaquetario y una proteína morfogénica ósea. También pueden incluirse otros agentes terapéuticos que pueden administrarse por vía tópica. Como ejemplos de antibióticos se incluyen, pero sin limitación, ampicilina, eritromicina y tobramicina. Como analgésicos se incluyen, pero sin limitación, aspirina y codeína. Como un agente terapéutico contra el cáncer se incluye, pero sin limitación, 5-fluorouracilo.

30 El dispositivo de transferencia 18 puede comprender dos piezas, como se muestra, por ejemplo, en la Figura 1 o, como alternativa, puede ser de una pieza, como se muestra, por ejemplo, en las Figuras 17-18. Se prefiere un dispositivo de transferencia 18 de una sola pieza, de un solo molde. Como se observa mejor en las Figuras 5-6 y 17-18, el dispositivo de transferencia 18 comprende una cánula 38 que tiene un primer extremo 42 que tiene una primera abertura 46 y un segundo extremo 50 que tiene una segunda abertura 54. Los extremos 42, 50 de la cánula 38 son afilados o puntiagudos (o incluso tienen una arista biselada sobre los mismos) para poder punccionar o perforar los precintos 22, 24 del primer y segundo recipiente 10, 14. La cánula 18 es hueca y está coaxialmente instalada dentro de la carcasa 58 para impedir pinchazos accidentales en los dedos durante la manipulación de los recipientes. La carcasa 58 tiene dos guías cilíndricas opuestas 62, 64 orientadas central y axialmente con la cánula 38. Las guías 62, 64 sirven para guiar el primer y segundo recipiente 10, 14 sobre el primer y segundo extremo 42, 50 del dispositivo de transferencia 18. Las Figuras 5 y 6 muestran las guías 62, 64 guiando los recipientes 10, 14 sobre el primer y segundo extremo 42, 50.

35 Los extremos 42, 50 de la cánula 38 pueden estar encerrados o cubiertos por válvulas, envolturas de seguridad, o fundas elastoméricas 68, 72, que forman un precinto hermético. Las envolturas de seguridad 68, 72 también cubren la primera y segunda abertura 46, 54. Cuando el primer y segundo extremo 42, 50 perfora las fundas elastoméricas 68, 72, las fundas 68, 72 se retraen en consecuencia. La Figura 5 muestra el primer extremo 42 comenzando a perforar el precinto 22 del primer recipiente 10 y como consecuencia de ello la funda 68 se retrae, mientras que la funda 72 aún cubre completamente el segundo extremo 50. Los extremos 42, 50 se extienden suficientemente lejos como para perforar completamente los precintos 22, 24, pero no llegan a extenderse al interior de los recipientes 10, 14 (como se muestra en la Figura 6). Esto permite la transferencia del volumen máximo del volumen líquido del primer recipiente 10 invertido al segundo recipiente 14. La Figura 6 también muestra el primer y segundo extremo 42, 50, con los precintos 22, 24 del primer y segundo recipiente 10, 14 completamente perforados, y las dos fundas 68, 72 totalmente retraídas. Las fundas elastoméricas 68, 72 impiden el flujo de gas o de líquido cuando no están perforadas. Como materiales adecuados para las fundas 68, 72 se incluyen, pero sin limitación, variedades de goma y elastómeros termoplásticos.

65

Volviendo ahora al funcionamiento de la primera realización, una vez que la sangre se ha extraído al interior del primer recipiente 10 usando técnicas de venopunción convencionales, el anticoagulante 25, que se encuentra en su interior, anticoagula la sangre. Típicamente, el primer recipiente 10 está precintado mientras se extrae la sangre, sin embargo, después de esto, puede precintarse. El precintado del primer recipiente 10 impide la contaminación del contenido en su interior. Después de esto, el primer recipiente 10 y su contenido (es decir, sangre, anticoagulante 25, medio de separación 26 y fluido BDAV 28) se centrifugan. Puede realizarse una centrifugación aceptable a una fuerza gravitacional en el intervalo de 900 a 3.500 xG durante 5 a 15 minutos. En una realización preferida, el primer recipiente se centrifuga a una fuerza gravitacional de aproximadamente 1.000 xG durante diez minutos aproximadamente. Esta centrifugación inicial separa el contenido o las fracciones del primer recipiente en una pluralidad de capas como se muestra, por ejemplo, en la Figura 2. Las capas incluyen (en orden desde la parte inferior del primer recipiente 10 a la parte superior del recipiente después de centrifugación): la capa de glóbulos rojos 30, el medio de separación 26, la capa de plasma rico en plaquetas 34, la capa de fluido BDAV 28 y finalmente un volumen de gas residual 27 a una presión igual a la atmosférica. Las proporciones de estas capas pueden variar de aplicación a aplicación, y en el presente documento se muestran estas proporciones solo con fines ilustrativos. Después de la centrifugación, el primer soporte precintado 10 se invierte antes de que el dispositivo de transferencia 18 se use para perforar el precinto 22. En otras palabras, el primer recipiente 10 se invierte de tal manera que la abertura precintada está en la posición vertical más baja como se muestra en la Figura 7. Al invertir el primer recipiente cambia el orden en el que se disponen las capas. Por encima del precinto 22 están las siguientes capas en secuencia desde la parte inferior a la superior: plasma rico en plaquetas 34, el fluido inmiscible de alta viscosidad, baja densidad 28, el gas residual 27, el medio de separación 26 y los glóbulos rojos 30.

A continuación, el segundo recipiente 14 se coloca en una posición vertical con su abertura 24 precintada en la posición más alta, como se muestra mejor en la Figura 8. Esto pone en posición al segundo recipiente 14 para la transferencia del contenido del primer soporte en su interior. La Figura 8 ilustra el primer recipiente 10 centrifugado en la posición invertida por encima del dispositivo de transferencia 18, que está por encima del segundo recipiente 14 en la posición correcta para la transferencia. Después, la guía 64 del dispositivo de transferencia se coloca encima y las guías del segundo recipiente 14 en su interior, mientras que el primer recipiente 10 invertido se coloca después en la otra guía 62 (o viceversa). En otras palabras, cualquier extremo 42, 50 de la cánula 38 puede usarse para perforar cualquier precinto 22, 24. Dado que el dispositivo de transferencia 18 es simétrico en cualquier extremo, al usuario se le proporciona un grado de funcionamiento infalible. Después, con cada extremo 42, 50 de cánula respectivo, el usuario ejerce una presión simultánea sobre los recipientes para perforar los dos precintos 22, 24. Las dos fundas de válvula 68, 72 que cubren los extremos 42, 50 mejoran mucho más el funcionamiento infalible. En primer lugar, si el primer extremo 42 perfora el primer precinto 22 (de nuevo, puede usarse cualquier extremo para perforar cualquier precinto), la funda 72 no perforada que cubre el otro extremo 50 contendrá el fluido, impidiendo de esta manera que el fluido se derrame. Por otro lado, si el otro extremo 50 perfora el otro primer precinto 24 (y por consiguiente la funda 72), la funda 68 que cubre el primer extremo 42 hace que se mantenga el vacío.

Una vez que los extremos 42, 50 perforan las dos fundas 68, 72 y los precintos 22, 24 como se muestra en las Figuras 6 y 9, el fluido deseado se transfiere desde el primer recipiente 10 al segundo recipiente 14 por presión diferencial. En otras palabras, dado que en el segundo recipiente 14 se ha liberado la presión, el contenido (más particularmente, el plasma 34) del primer recipiente 10 fluye al interior del segundo recipiente. La presión en el primer recipiente 10, originalmente atmosférica, desciende a media que disminuye el nivel del líquido y el volumen de gas se expande. Sin embargo, en ningún momento, la presión es igual a cero. Dado que el segundo recipiente 14 está completamente vacío a una presión igual a cero, la presión en su interior no aumenta a medida que el tubo se llena dado que no hay gas para comprimir. Por consiguiente, el aparato 18 puede usarse para transferir una amplia diversidad de líquidos y soluciones de un tubo a otro, y no debe interpretarse que solo se limita a la transferencia de sangre.

Debido a la disposición secuencial particular de las capas en el primer recipiente 10, el plasma rico en plaquetas 34 se transfiere fácilmente. Además, como el primer recipiente 10 también está preestablecido a un nivel de evacuación, el recipiente solo se llena después de recoger la sangre. Esto permite que el gas en el "espacio del cabezal" permanezca significativamente por encima de cero durante la transferencia cuando su volumen se expande, permitiendo de este modo la transferencia rápida y completa al segundo recipiente 14. Esto está estipulado por la ley del gas ideal y la ecuación de Poiseuille-Hagen.

La transferencia del contenido o fragmentos del primer recipiente (es decir, el plasma rico en plaqueta) continúa hasta que el fluido BDAV 28 entra en la cánula 38. La alta viscosidad del fluido BDAV taponan el estrecho lumen de la cánula 38, produciéndose por tanto la interrupción del flujo. Esto impide reutilizar el dispositivo de transferencia 18, lo que es particularmente importante intentando eliminar dispositivos de transferencia de sangre contaminada y también impide la contaminación accidental por patógenos transmitidos por la sangre por uso anterior o por otro paciente.

La transferencia de la fracción de plasma 34 al segundo recipiente 14 es completa, permitiendo de este modo un rendimiento máximo y mantenimiento de la relación estequiométrica apropiada de los reactivos. Después el plasma 34 se pone en contacto con el activador de coagulación 36 en el segundo recipiente 14, creando de este modo una

mezcla 60 que puede centrifugarse inmediatamente para formar una red de fibrina sólida. El diferencial de presión entre los recipientes primero y segundo 10, 14 se mantiene sustancialmente durante toda la transferencia, permitiendo una transferencia rápida. El dispositivo de transferencia 18 no se ve afectado por el orden de unión de los tubos, haciendo al sistema prácticamente infalible. Finalmente, se produce transferencia sin purga, manteniendo la esterilidad y ausencia de contaminación de la muestra.

En general, el dispositivo de transferencia 18 proporciona una manera rápida y eficaz de poner en contacto el plasma 34 con el activador de coagulación de calcio 36, inmediatamente después de lo cual puede tener lugar la coagulación y centrifugación simultáneas del plasma para formar la red de fibrina sólida. La red de fibrina sólida es adecuada para regenerar tejido corporal en un organismo vivo. Dicho método alivia la necesidad de preconcentrar en primer lugar el plasma retirando agua del mismo antes de que el plasma se ponga en contacto con el activador de coagulación de calcio 36. Además, el dispositivo de transferencia 18 puede usarse para transferir sangre u otros fluidos en una amplia diversidad de aplicaciones.

La invención también proporciona un kit listo para usar como se muestra en la Figura 10. El kit comprende el primer recipiente 10, el segundo recipiente 14 y el dispositivo de transferencia 18. En una realización del kit, el kit puede tener dos bandejas 70, 74 que se elevan de un envase. La primera bandeja 70 tiene todos los componentes necesarios para la Etapa 1 y la segunda bandeja 74 tiene todos los componentes requeridos para la Etapa 2. Por supuesto, los componentes pueden disponerse de una amplia diversidad de maneras.

La Etapa 1 comprende recoger sangre en el primer recipiente 10, seguido de centrifugación para obtener plasma rico en plaquetas. Los componentes de la primera bandeja 70 comprenden un hisopo de alcohol 78 para limpiar el sitio de venopunción, una aguja de recogida de sangre de múltiples muestras 82 (calibre 21 x 2,54 cm), un soporte de seguridad 86, el primer recipiente 10 que contiene el anticoagulante (por ejemplo, citrato), gel, fluido BDAV y una venda 90 para cubrir el sitio de venopunción. El sitio de venopunción se limpia con el hisopo de alcohol estéril 78. El cartucho de aguja 84 se abre y se enrosca en el soporte de seguridad 86. La aguja 82 se inserta después en la vena del paciente y el recipiente 10 se conecta en el soporte 86. Después el recipiente se llena de sangre y la aguja 82 se retira y se retrae al soporte 86. El extremo del soporte se cierra con la solapa con bisagra. La vena se cierra con la venda 90. El recipiente 10 se centrifuga a aproximadamente 1000 x G durante aproximadamente 10 minutos y el plasma se separa de los glóbulos rojos.

Los componentes de la segunda bandeja son los componentes usados para la etapa 2 e incluyen un tubo AF (Tubo de Fibrina Autóloga) o segundo recipiente 14 y un dispositivo de transferencia 18. La etapa 2 comprende colocar el primer recipiente 10 en una posición invertida y en el dispositivo de transferencia 18. El segundo recipiente 14 contiene el coagulador y se perfora por el otro extremo del dispositivo de transferencia. Los recipientes 10, 14 se unen y el plasma rico en plaquetas fluye del primer recipiente 10 al segundo recipiente 14. Después el segundo recipiente se centrifuga inmediatamente a 2300 xG durante aproximadamente 30 minutos para obtener fibrina densa con plaquetas o una red de fibrina sólida.

Se proporciona otro sistema integrado para preparar una red de fibrina sólida como se muestra en las Figuras 11-14. El sistema comprende un primer dispositivo de recogida 10, que es muy similar al primer recipiente 10 de la primera realización. El dispositivo de recogida 10 puede contener un medio separador de células por gradiente de densidad 26 (como se ha descrito anteriormente) y un anticoagulante (no mostrado) así como un depósito 94 que puede conectarse al primer dispositivo de recogida 10 o estar integrado en el mismo. El análisis anterior con respecto a la primera realización de la invención, y más particularmente, el medio de separación 26, se aplica al sistema integrado. En otras palabras, pueden usarse los mismos materiales para el medio de separación 26 y se prefieren los mismos materiales. Por ejemplo, más preferentemente el medio de separación 26 comprende un gel tixotrópico, cuyo límite de fluencia evita que fluya a condiciones ambientales ordinarias, pero permite que fluya a las fuerzas centrífugas mayores experimentadas durante la centrifugación. El medio de separación 26 puede localizarse en el fondo como se muestra en la Figura 11 (es decir, el extremo opuesto a la apertura) del primer dispositivo de recogida. Como alternativa, el medio de separación puede formar un anillo alrededor del interior del primer dispositivo de recogida. El primer dispositivo de recogida 10 es esencialmente el mismo que el primer recipiente 10 descrito anteriormente, excepto que el primer dispositivo de recogida puede no contener un líquido de alta densidad, baja viscosidad. Preferentemente, el primer dispositivo de recogida 10 tiene un precinto 22 tal como un tapón de goma o tapa (como se ha analizado anteriormente).

El depósito 94 comprende una cámara 96 y una cánula 100 en comunicación fluida con la misma. La cámara 96 contiene un reactivo líquido 104, más preferentemente un activador de coagulación de calcio. Preferentemente, el activador de coagulación de calcio es cloruro cálcico, fluoruro cálcico, carbonato cálcico, gluconato cálcico, fumarato cálcico, piruvato cálcico o una combinación de los mismos. La cánula 96 debe ser capaz de perforar el precinto 22 del primer dispositivo de recogida 10. En una realización preferida, la cánula contiene un medio de bloqueo 108 tal como un gel de límite de fluencia que evita que los reactivos 104 en la cámara 96 fluyan fuera de la cánula 100 en condiciones ambientales. Otros medios de bloqueo adecuados incluyen, pero sin limitación, sistemas mecánicos accionados por fuerza, tales como bolas sobre muelles, válvulas, válvulas cargadas por muelle, membranas perforables y ampollas (es decir membranas huecas cargadas con fluidos o polvos). El límite de fluencia del gel 108 es tal que tras la centrifugación a una fuerza gravitacional particularmente alta, el gel 108 se mueve para permitir la

comunicación entre la cámara 96 y el primer dispositivo de recogida 10 cuando los dos están unidos. El depósito 94 también puede tener un alojamiento guía 110 usado para guiar el depósito al dispositivo de recogida 10. La cánula 100 puede estar incluida o cubierta por un manguito elastomérico 112 para mantener la esterilidad de la cánula 100. El manguito 112 se ha analizado anteriormente con respecto a la primera realización.

5 En otra realización, la cámara 96 puede contener también uno o más de un antibiótico, un analgésico, un producto terapéutico de cáncer, un factor de crecimiento de plaquetas y una proteína morfogénica del hueso. También pueden incluirse otros agentes terapéuticos que pueden administrarse por vía tópica. Los ejemplos de antibióticos incluyen, pero sin limitación, ampicilina, eritromicina y tobramicina. Los analgésicos incluyen, pero sin limitación, aspirina y codeína. Los productos terapéuticos de cáncer incluyen, pero sin limitación, 5-fluorouracilo.

15 En funcionamiento, la sangre de un paciente 116 se recoge en el primer dispositivo de recogida 10 mediante técnica de venopunción convencional como se ha descrito anteriormente. El anticoagulante en el primer dispositivo de recogida 10 diluye la sangre antes de la centrifugación. Posteriormente, el depósito 94 se une después al primer dispositivo de recogida 10 perforando la cánula 100 del depósito 94 a través del precinto 22 del primer dispositivo de recogida 10 como se muestra en las Figuras 13 y 14. El manguito 112 se retrae cuando la cánula 100 perfora el precinto 22. La longitud de la cánula 100 es suficiente para perforar el precinto 22, pero la cánula preferentemente no se extiende mucho más lejos en el dispositivo de recogida 10, aunque pudiera.

20 Después el dispositivo de recogida 10 y el depósito 94 se centrifugan. La fuerza centrífuga ejercida sobre el tubo se describe por la ecuación $F=\omega mr^2$; en la que F =fuerza, m =masa del sistema, r =distancia radial desde el centro del rotor y ω =la velocidad de rotación angular. Puesto que el depósito está a una r más pequeña que el gel del primer tubo, el gel en la cánula del depósito no puede moverse puesto que se generan tensiones de corte insuficientes. El primer tubo 10 gira a la fuerza gravitacional baja hasta que las células se separan y el gel 26 se mueve a la interfase célula/plasma como se muestra en la Figura 13. En otras palabras, de forma similar a la primera realización, el medio de separación 26 separa los glóbulos rojos 30 del plasma rico en plaquetas 34 después de una centrifugación inicial a aproximadamente 1000 xG durante aproximadamente 10 minutos. La centrifugación a una fuerza centrífuga de aproximadamente 900-1500 xG durante aproximadamente 5 a 15 minutos también es aceptable para la centrifugación inicial.

30 Posteriormente, la velocidad centrífuga aumenta y el depósito experimenta fuerza gravitacional suficientemente alta de modo que el medio de bloqueo 108 en la cánula 100 se vacíe al primer dispositivo de recogida 10 y el reactivo líquido 108 (por ejemplo, el activador de coagulación de calcio) se vacíe del depósito como se muestra en la Figura 14. Los contenidos pueden centrifugarse posteriormente a aproximadamente 2300-6000 xG durante aproximadamente 15-40 minutos. A medida que el activador de coagulación de calcio entre en contacto con el plasma en el primer dispositivo de recogida, se produce coagulación y centrifugación inmediatas y simultáneas porque la muestra aún se está centrifugando. Esto da como resultado la formación de una red de fibrina sólida adecuada para la regeneración de tejidos. La operación de la separación celular de primer tubo y adición posterior de agente de coagulación líquido a la relación estequiométrica correcta se realiza en un tubo sin transferencia. Programando la centrifuga con respecto a velocidad y duración, la invención proporciona un proceso sencillo e infalible.

45 En una realización alternativa, el dispositivo de recogida individual 10 tiene un compartimento interior 119 y un depósito 94 como se muestra en las Figuras 15-16. El depósito 94 es integral de o está conectado con el primer dispositivo de recogida 10 y en comunicación fluida con el compartimento. Un tubo, conducto o apertura 120 proporciona la comunicación fluida entre el compartimento 119 y el depósito 94, y se precinta con el medio de bloqueo 108. De nuevo, el medio de bloqueo 108 tiene un límite de fluencia que se activa y se mueve cuando se expone a una fuerza gravitacional particularmente alta para permitir la comunicación entre el depósito 94 y el primer dispositivo de recogida 10 como se ha descrito anteriormente. El límite de fluencia del gel o del medio es tal que no se mueve durante la centrifugación inicial para separar células de la sangre del plasma. En esta tercera realización, cada extremo del dispositivo tiene una apertura y cada extremo se precinta por un precinto desmontable o no desmontable 22, 122 tal como un tapón de goma, tapa, espuma, elastómero u otro compuesto. El dispositivo 94 con tapón 122 se localiza en el extremo opuesto del precinto del dispositivo de recogida 22 y su apertura.

55 En otra realización, el depósito 94 puede contener también uno o más de un antibiótico, un analgésico, un producto terapéutico de cáncer, un factor de crecimiento de plaquetas y una proteína morfogénica del hueso. También pueden incluirse otros agentes terapéuticos que pueden administrarse por vía tópica. Los ejemplos de antibióticos incluyen, pero sin limitación, ampicilina, eritromicina y tobramicina. Los analgésicos incluyen, pero sin limitación, aspirina y codeína. Los productos terapéuticos de cáncer incluyen, pero sin limitación, 5-fluorouracilo.

60 La realización alternativa se usa de la misma manera que se ha descrito anteriormente con respecto al sistema integrado, es decir, la centrifuga se controla a dos fuerzas centrífugas diferentes: 1) siendo la primera una fuerza suficiente para separar el plasma de los glóbulos rojos; y 2) siendo la segunda una fuerza suficiente para mover el medio de bloqueo 108 en el tubo, conducto o apertura 120 entre el depósito y el interior del dispositivo y al cuerpo principal. Como resultado se permite que el activador de coagulación de calcio entre en el interior del dispositivo. Esto a su vez permite la centrifugación y coagulación simultáneas del plasma para formar la red de fibrina sólida a

65

ES 2 434 718 T3

medida que avanza la centrifugación a la segunda fuerza, de mayor gravitación. El precinto 122 puede retirarse para obtener la red de fibrina sólida o el pegamento autólogo. En una realización preferida, el precinto 122 está enroscado y puede desenroscarse del dispositivo 10 como se muestra en la Figura 16.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema para preparar una red de fibrina sólida adecuada para regenerar tejido en un organismo vivo, comprendiendo el sistema:
- 5 un primer recipiente precintado (10) que incluye un medio de separación (26), pudiendo extraerse sangre al primer recipiente, siendo capaz el medio de separación (26) de separar plasma (34) de glóbulos rojos (30) cuando el primer recipiente contiene sangre y se centrifuga;
- 10 un segundo recipiente (14);
- un dispositivo de transferencia (18) capaz de transferir al menos el plasma (34) del primer recipiente (10) al segundo recipiente (14) mediante diferenciación de presión mientras al menos los glóbulos rojos (30) permanecen en el primer recipiente (10) incluyendo el primer recipiente (10) un fluido de baja densidad y alta viscosidad (28) capaz de bloquear o eliminar el flujo a través del dispositivo de transferencia (18) tras su entrada en el mismo; y
- 15 un activador de coagulación de calcio (36) capaz de coagular el plasma (34) cuando entra en contacto con el mismo.
2. El sistema de la reivindicación 1, donde el activador de coagulación de calcio (36) es al menos uno de cloruro cálcico, fluoruro cálcico, carbonato cálcico, gluconato cálcico, fumarato cálcico, piruvato cálcico y combinaciones de los mismos.
- 20 3. El sistema de la reivindicación 1 o 2, donde el medio de separación (26) es al menos uno de un gel, perlas de plástico y un dispositivo flotante polimérico.
- 25 4. El sistema de una de las reivindicaciones 1 a 3, donde el segundo recipiente (14) se evacúa.
5. El sistema de una de las reivindicaciones 1 a 4, donde el primer recipiente (10) incluye un anticoagulante (25).
6. El sistema de una de las reivindicaciones 1 a 5, donde el activador de coagulación de calcio (36) entra en contacto con el plasma (34) en el segundo recipiente (14).
- 30 7. El sistema de una de las reivindicaciones 1 a 6 donde el primer recipiente (10) incluye una primera presión y el segundo recipiente (14) incluye una segunda presión, y donde la segunda presión es menor que la primera presión.
- 35 8. Un método para preparar una red de fibrina sólida capaz de regenerar tejido en un organismo vivo, comprendiendo el método:
- extraer sangre de un paciente en un primer recipiente (10) que tiene un medio de separación (26) capaz de separar plasma (34) y glóbulos rojos (30);
- 40 centrifugar el primer recipiente (10) a una velocidad suficiente para separar el plasma (34) de los glóbulos rojos (30);
- conectar un montaje de aguja (18, 28) con el primer recipiente (10) y con un segundo recipiente (14) de modo que el montaje de aguja proporcione comunicación fluida entre el primer recipiente y el segundo recipiente;
- 45 transferir al menos el plasma (34) del primer recipiente (10) al segundo recipiente (14) a través del montaje de aguja mediante diferenciación de presión mientras al menos los glóbulos rojos (30) permanecen en el primer recipiente (10) bloqueando o eliminando el flujo a través del dispositivo de transferencia tras su entrada en el mismo por un fluido de baja densidad y alta viscosidad (28) en dicho primer recipiente; y
- poner en contacto el plasma (34) con un activador de coagulación de calcio (36) para activar el fibrinógeno en el plasma.
- 50 9. El método polimérico de la reivindicación 8, donde el medio de separación (26) es al menos uno de un gel, perlas de plástico y un dispositivo flotante polimérico.
10. El método de la reivindicación 8 o 9, donde el segundo recipiente (14) se evacúa.
- 55 11. El método como en las reivindicaciones 8 a 10, donde el activador de coagulación de calcio (36) se selecciona de cloruro cálcico, fluoruro cálcico, carbonato cálcico, gluconato cálcico, fumarato cálcico, piruvato cálcico y combinaciones de los mismos.
- 60 12. El método de una de las reivindicaciones 8 a 11, donde poner en contacto el plasma (34) con el activador de coagulación de calcio (36) incluye añadir el activador de coagulación de calcio (36) al segundo recipiente (14).
13. El método de una de las reivindicaciones 8 a 12, donde el primer recipiente (10) incluye una primera presión y el segundo recipiente (14) incluye una segunda presión, y donde la segunda presión es menor que la primera presión.
- 65

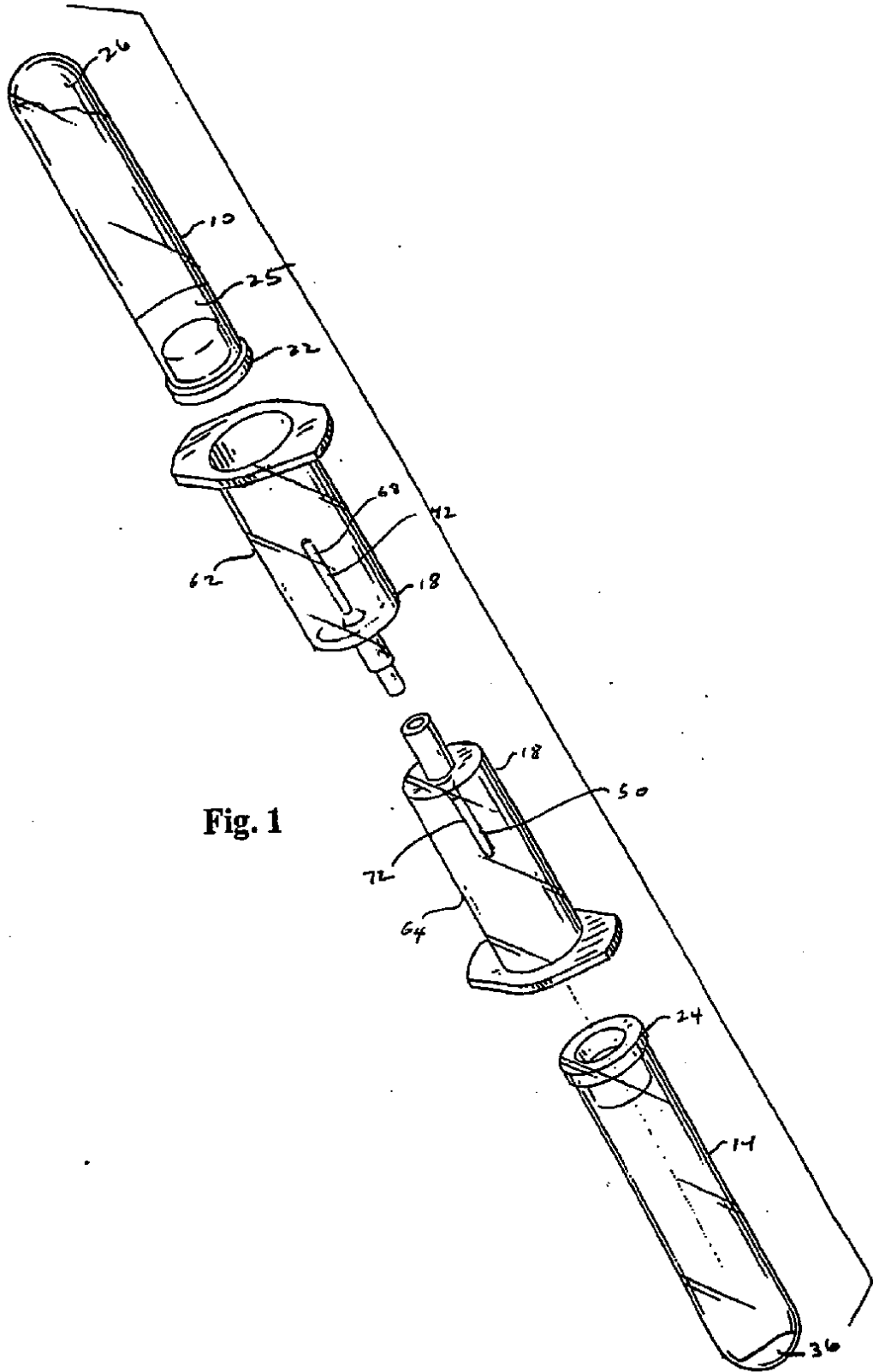


Fig. 1

Fig. 2

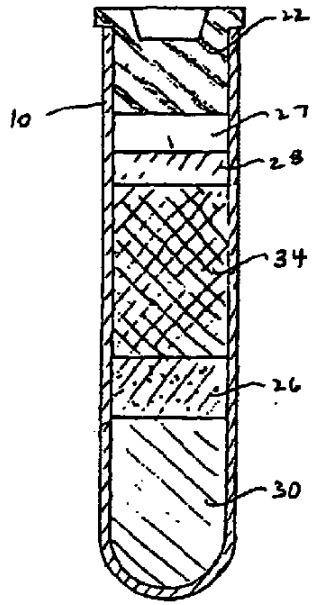


Fig. 3

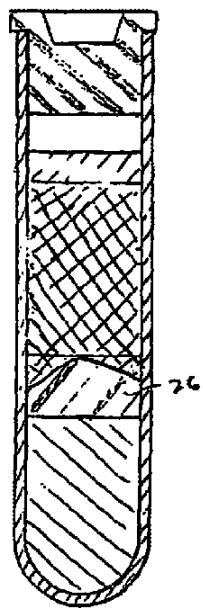
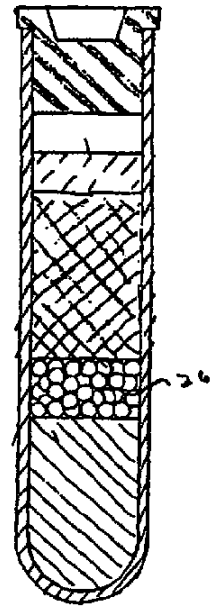


Fig. 4

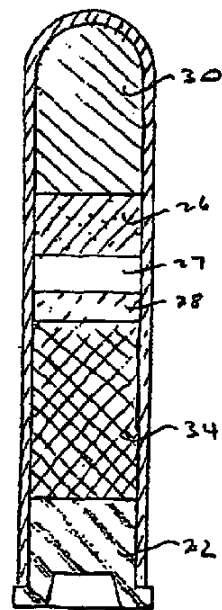


Fig. 7

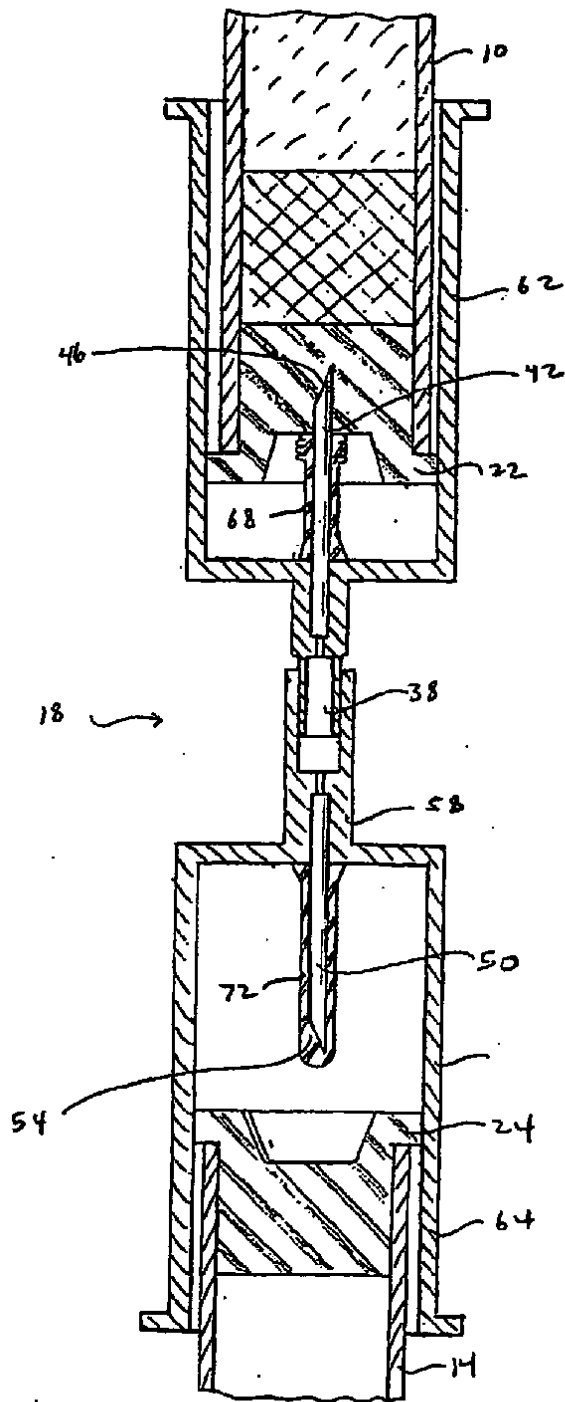


Fig. 5

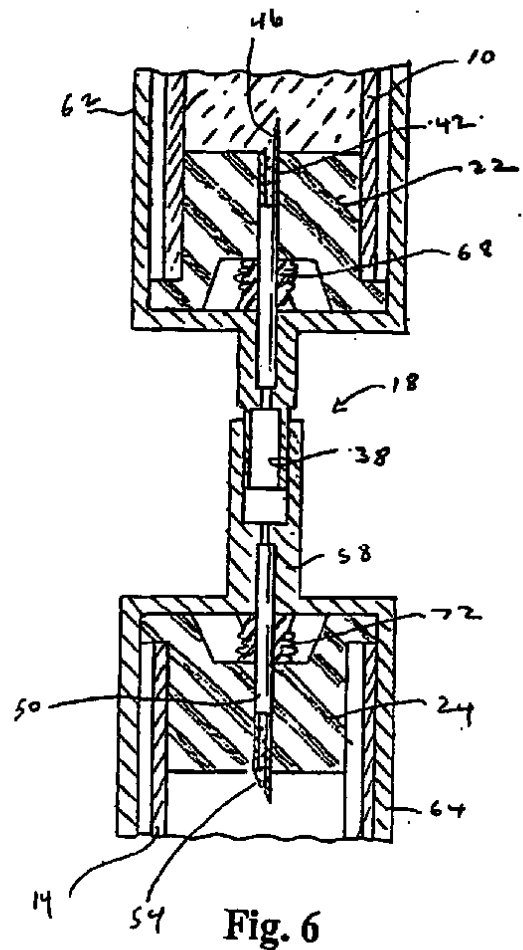


Fig. 6

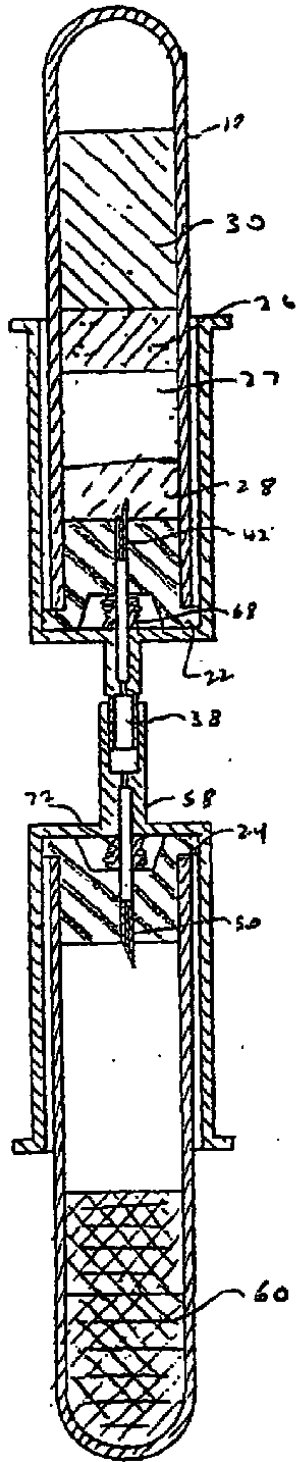


Fig. 9

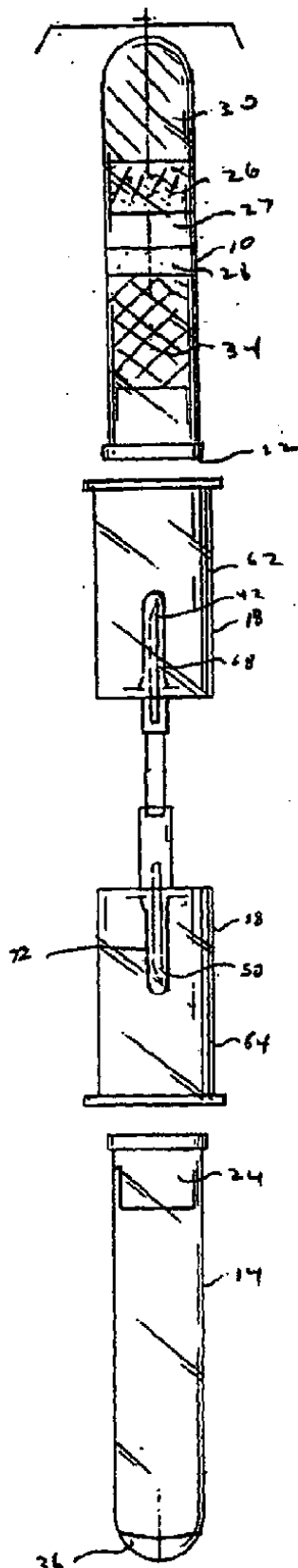


Fig. 8

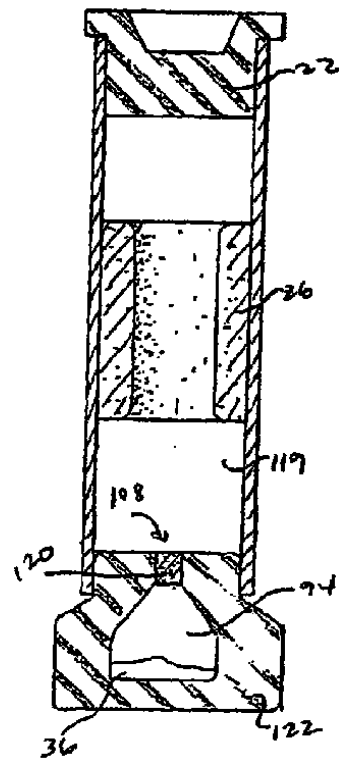


Fig. 16

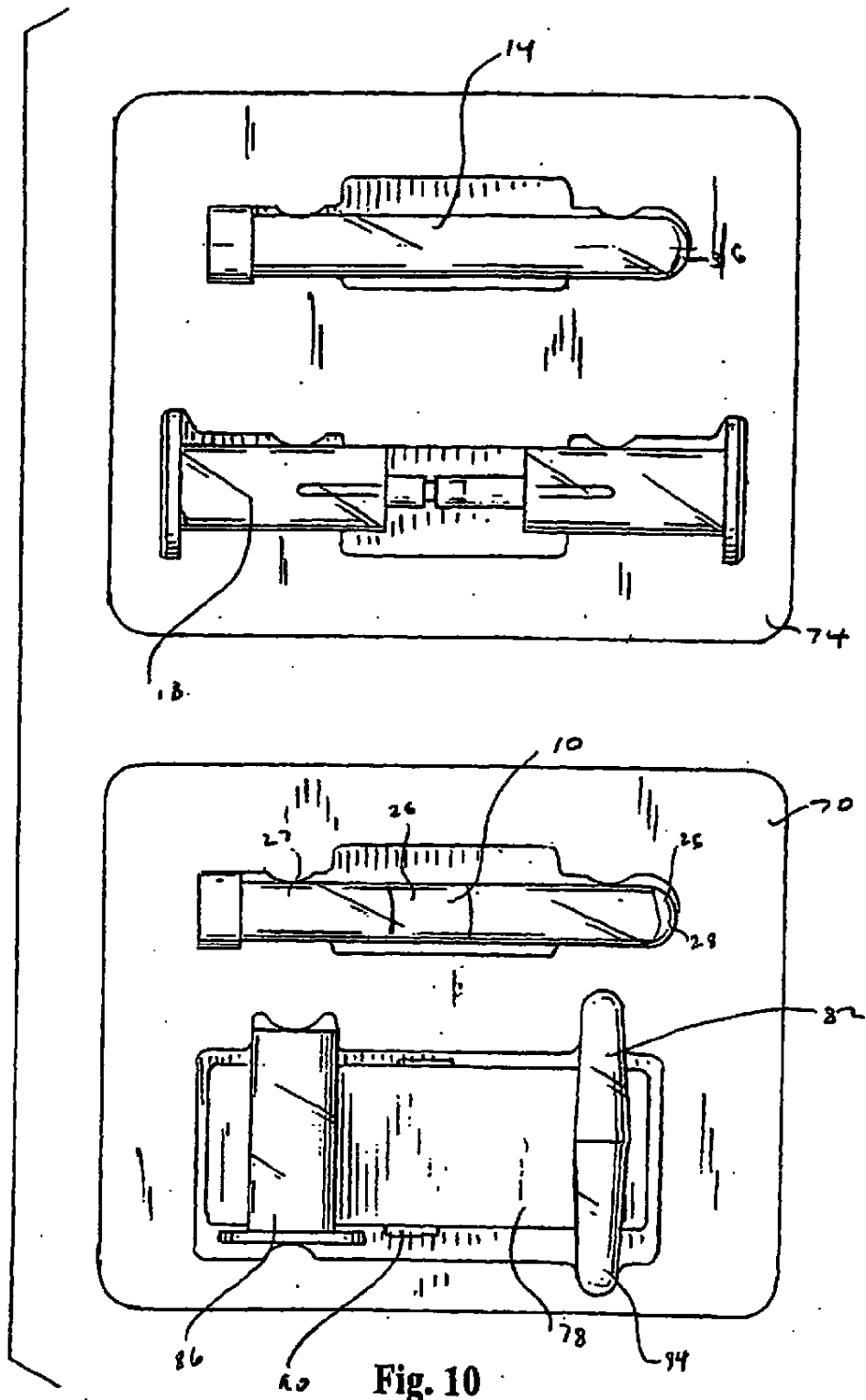


Fig. 10

Fig. 15

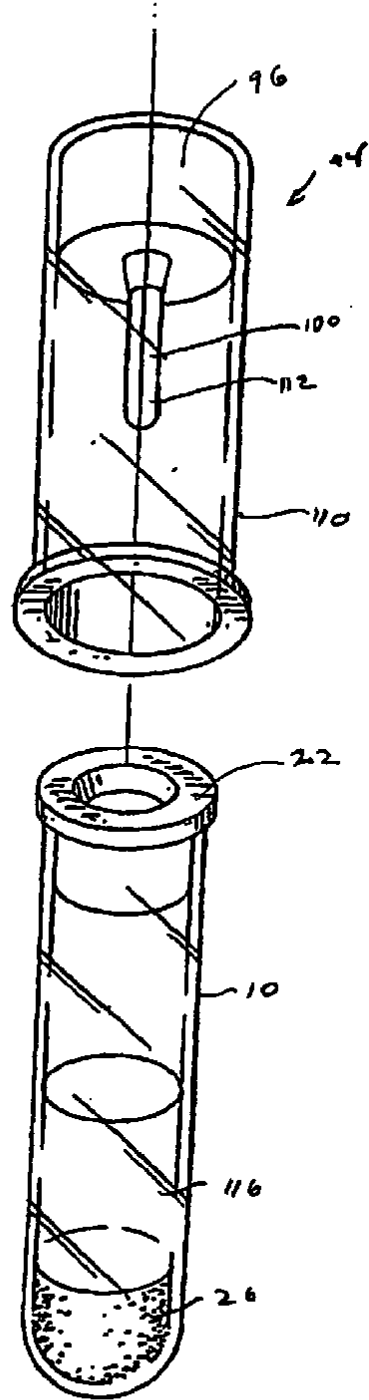
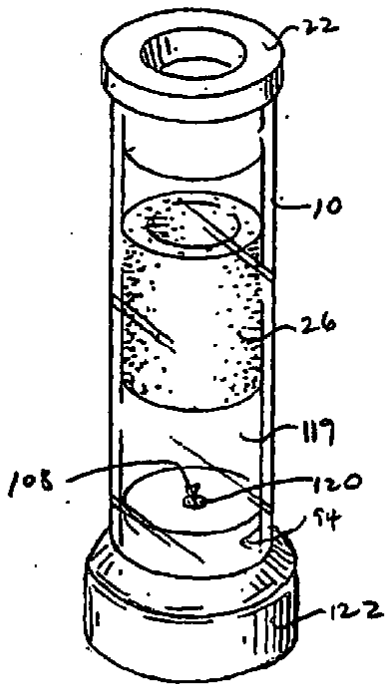


Fig. 11

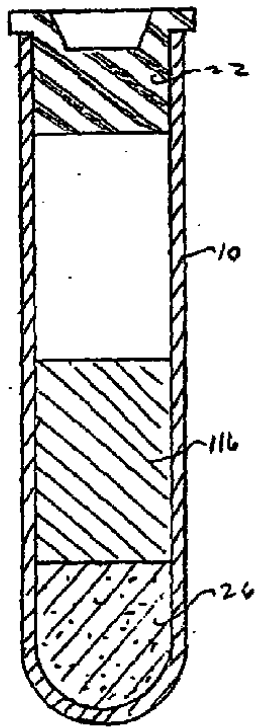
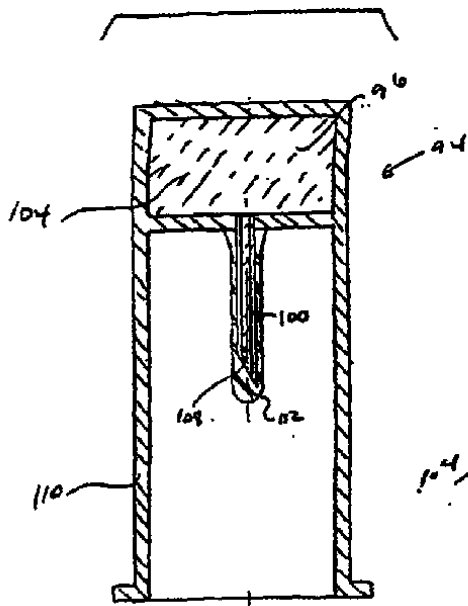


Fig. 12

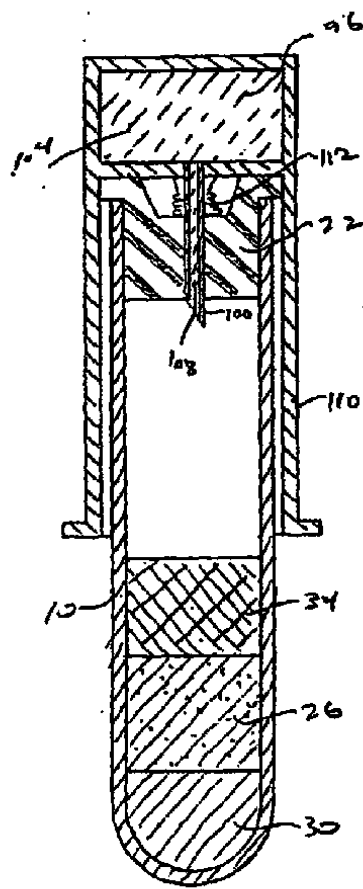


Fig. 13

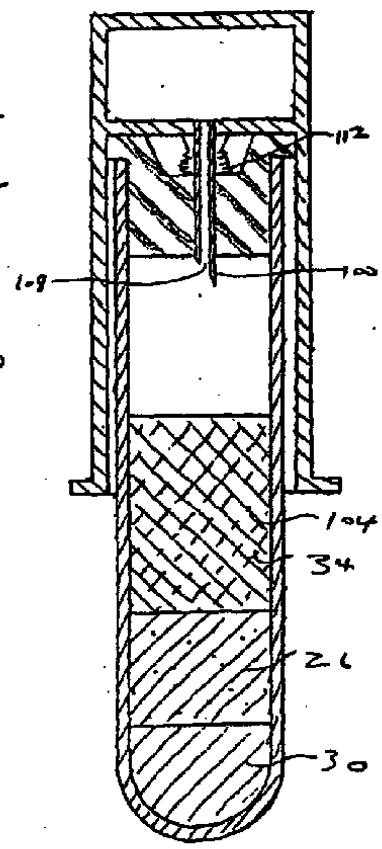


Fig. 14

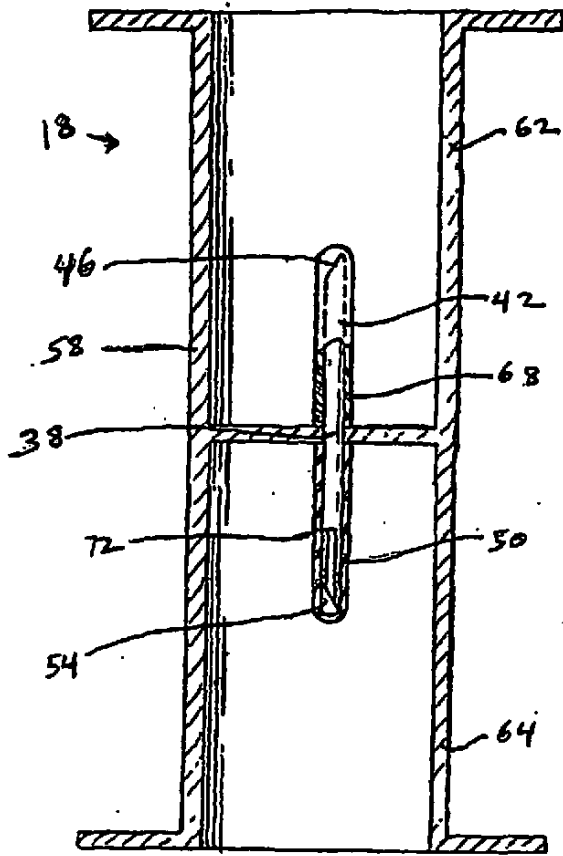


Fig. 18

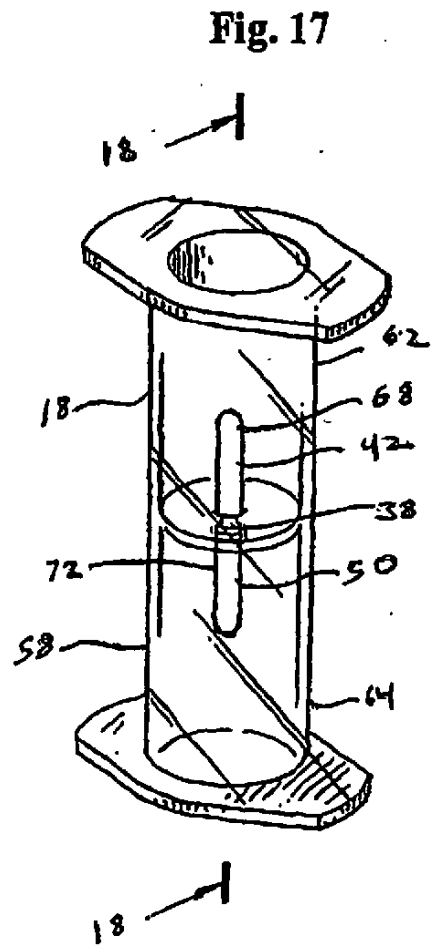


Fig. 17