

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 444**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/36** (2006.01)

**A61K 35/16** (2006.01)

**A61L 24/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2003 E 03796273 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 1515733**

54 Título: **Método para preparar una lámina de fibrina sólida**

30 Prioridad:

**27.06.2002 US 392669 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.12.2014**

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 2 524 444 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**

Método para preparar una lámina de fibrina sólida

**5 Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para preparar una lámina de fibrina sólida o cola de fibrina autóloga.

10 Es sabido que la cola de fibrina es un hemoderivado en gran parte que se usa como un adhesivo quirúrgico tópico o un agente hemostático. Hay disponibles en el mercado varios kits que contienen fibrinógeno concentrado de donantes, asociado a un activador proteico de origen humano o animal, tal como trombina o batroxobina, para obtener cola de fibrina heteróloga.

15 Tales kits conocidos implican el uso de material de origen humano o animal, que, debido a su origen, podría dar lugar a posible contaminación viral y a graves riesgos para el receptor de la cola de fibrina. Las autoridades se han visto obligadas en el pasado a quitar del comercio o incluso prohibir los hemoderivados obtenidos usando material de origen humano o animal. Además, se conocen en la literatura casos de rechazo resultantes de reimplantar fibrina producida usando proteínas humanas o animales en pacientes. De hecho, tales casos son debidos al origen heterólogo, con respecto al organismo receptor, de la proteína sellante reimplantada o algunos de los componentes usados para prepararla.

20 La cola de fibrina autóloga, es decir, cola de fibrina obtenida autológicamente a partir de la propia sangre del paciente, es más fiable con respecto a los riesgos de rechazo y/o infección. Ya se han descrito varios procedimientos para obtener cola de fibrina autóloga extemporánea, pero no hay disponible en el mercado kit "preparado para uso" aunque se puede hallar en la literatura de patentes algunas referencias relevantes.

25 La Patente de Estados Unidos número 5.733.545 describe un concentrado de plasma-capa leucocitaria a combinar con un activador fibrinógeno para formar un sellante de heridas de cola de plaquetas. El método descrito en esta patente permite procesar la sangre del paciente con el fin de obtener cola de fibrina autóloga, pero los métodos utilizan trombina o batroxobina como el activador fibrinógeno. Estos activadores son de naturaleza humana o animal y por lo tanto siguen implicando el riesgo de rechazo y/o infecciones virales para el paciente.

30 La Patente de Estados Unidos número 6.368.298 describe la preparación de cola de fibrina autóloga tratando plasma separado con un activador de coagulación de calcio (cloruro de calcio) en un "kit preparado para el uso". La Patente de Estados Unidos número 5.853.600 describe un método para la separación rápida, por centrifugación axial, de suero y plasma usando un tubo de muestra cilíndrico que tiene nervios internos que se extienden longitudinalmente. La publicación no patenteada de C. A. Estey, R. A. Felder, Clinical Chemistry 1996, 42(3), 402-409 se refiere a pruebas clínicas realizadas usando separación axial y describe las mejoras de la producción y la variedad de análisis sobre los métodos de separación convencionales por centrifugación.

35 La Patente de Estados Unidos número 5.555.007 describe un método y un aparato para hacer plasma concentrado a usar como un sellante de tejidos. El método consiste en separar plasma de sangre entera y extraer agua de dicho plasma poniéndolo en contacto con un concentrador para obtener plasma concentrado que a continuación puede ser coagulado con una solución conteniendo trombina y calcio. El aparato incluye un primer separador centrífugo en una primera cámara, un concentrador (por ejemplo, dextranómetro o polacrilamida) incluido en una segunda cámara que comunica con la primera cámara, y un segundo separador. El método descrito en esta referencia requiere un largo tiempo para obtener el concentrado de plasma necesario para la posterior preparación de cola de fibrina autóloga y el aparato es caro y no desechable. El método no describe el uso de un activador de coagulación de calcio, y requiere un paso de preconcentración.

40 Muchos métodos y sistemas requieren la transferencia de un fluido de un recipiente a otro. Por ejemplo, muchos dispositivos químicos y médicos requieren la transferencia de un volumen necesario de líquido a reaccionar secuencialmente con varios reactivos y alícuotas volumétricas específicas. Una práctica común es quitar cierres en dos recipientes y pipetar líquido de un recipiente al otro. Sin embargo, esta práctica expone la muestra a contaminantes medioambientales. Por ejemplo, se usa esta técnica para transferir plasma que ha sido separado de glóbulos rojos en una muestra de sangre. Sin embargo, se precisa una técnica especial para extraer el plasma en el menisco de interfaz. Con frecuencia, los glóbulos rojos de fracción inferior, de alta densidad, indeseables contaminan la muestra aspirada. Para evitar este problema, la pipeta se mantiene frecuentemente a una distancia segura del menisco (es decir, el separador entre el plasma y los glóbulos rojos), dando lugar por ello a una transferencia incompleta de la muestra. La transferencia incompleta de la fracción deseable da lugar a rendimiento de volumen inferior al óptimo y relaciones no estequiométricas de los reactivos de la muestra y los del segundo recipiente. Esta segunda condición puede ser una fuente importante de variación del rendimiento del producto. Éste es el caso de muchas reacciones enzimáticas en las que las tasas de reacción son un máximo en algunas relaciones estequiométricas y disminuyen rápidamente a relaciones más altas o más bajas.

65 El cuidado de las heridas es una de las cuestiones más importantes en medicina, especialmente con respecto a

úlceras crónicas, fístulas, etc. Esta cuestión es importante no solamente a causa del alto costo de la gestión, sino también a causa de la baja tasa de éxito. Otros problemas asociados con el cuidado de heridas y quemaduras incluyen la pérdida de líquidos y la posibilidad de que se produzcan infecciones. Se ha usado membranas sintéticas o de origen animal para separar las cavidades óseas de los tejidos blandos en el proceso de reosificación.

5 Un tratamiento para el cuidado de heridas puede incluir aplicar tejidos biológicos o esponjas (generalmente a base de proteínas) de origen animal, por ejemplo, colágeno, fibrina, albúmina al lugar de la herida. Sin embargo, las respuestas alérgicas e inmunológicas son comunes en estas aplicaciones.

10 El cincuenta por ciento de estos casos no se resuelven con una sola aplicación. Más del veinte por ciento puede no resolverse ni siquiera después de dos aplicaciones.

15 Otro tratamiento incluye trasplante de piel, que se realiza en los casos más difíciles. Sin embargo, el trasplante de piel es caro, y puede costar alrededor de \$600-700 por aplicación. Se usa una malla de colágeno de caballo modificado para soportar el nuevo tejido autólogo. La aplicación es un proceso difícil que puede durar hasta 20 días para cultivo de tejido dérmico, con la posibilidad de contaminar la muestra, en relación con las dimensiones.

20 En general, se desean métodos y sistemas para preparar cola de fibrina autóloga o una fibrina sólida que sea capaz de regenerar tejido en un organismo vivo.

### 20 Descripción detallada de los dibujos

La figura 1 es una vista en perspectiva de una primera realización comparativa.

25 La figura 2 es una vista en sección transversal de un recipiente primario de la primera realización comparativa representada en la figura 1.

30 La figura 3 es una vista en sección transversal de una realización comparativa diferente del recipiente primario de la figura 2.

La figura 4 es una vista en sección transversal de una realización comparativa diferente del recipiente primario de la figura 2.

35 La figura 5 es una vista en sección transversal parcial ampliada de una porción de la primera realización comparativa de la figura 1 que ilustra un primer extremo de un dispositivo de transferencia comenzando a perforar un recipiente primario sellado.

40 La figura 6 es una vista similar a la expuesta en la figura 5 que ilustra el primer extremo del dispositivo de transferencia perforando completamente el recipiente primario sellado y un segundo extremo del dispositivo de transferencia perforando completamente un recipiente primario secundario sellado.

La figura 7 es una vista similar a la figura 2 que representa el tubo primario y su contenido invertido.

45 La figura 8 es una vista en planta superior de la primera realización comparativa representada en la figura 1.

La figura 9 es una vista en sección transversal parcial de la figura 8 que representa el recipiente primario, el recipiente secundario y el dispositivo de transferencia enganchados, y siendo transferido el contenido del primer recipiente al segundo recipiente.

50 La figura 10 es una vista en planta superior de un kit que realiza la realización comparativa.

La figura 11 es una vista en perspectiva de una segunda realización comparativa.

55 La figura 12 es una vista en sección transversal de la segunda realización comparativa I representada en la figura 11.

La figura 13 es una vista en sección transversal similar a la figura 12 que representa el recipiente y el dispositivo de recogida primario perforando el dispositivo de recogida primario.

60 La figura 14 es una vista en sección transversal similar a la figura 12 que representa el recipiente perforando el dispositivo de recogida primario, y vaciando su contenido al dispositivo.

La figura 15 es una vista en perspectiva de una tercera realización comparativa.

65 La figura 16 es una vista en sección transversal de una tercera realización comparativa representada en la figura 15.

La figura 17 es una vista en perspectiva de un dispositivo de transferencia.

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

5 La figura 19 es una vista en perspectiva de un cartucho que realiza un aspecto de la invención.

La figura 20 es una vista en sección transversal lateral del cartucho de la figura 19.

10 La figura 21 es una vista en perspectiva de un dispositivo que se puede emplear en un sistema de centrifugación axial según un aspecto de la invención.

La figura 22 es una vista en sección transversal del dispositivo y el contenido representado en la figura 21.

15 La figura 23 es una vista en sección transversal del dispositivo y el contenido representado en la figura 21 durante una centrifugación inicial.

La figura 24 es una vista en sección transversal del dispositivo y el contenido representado en la figura 21 después de haber parado la centrifugación inicial.

20 La figura 25 es una vista en sección transversal del dispositivo y el contenido representado en la figura 21 durante una centrifugación secundaria.

25 La figura 26 es una vista en perspectiva de una variación del dispositivo representado en la figura 21, donde el radio de la cámara de densificación secundaria es más grande que el radio de la cámara primaria de separación de células.

La figura 27 es una vista en sección transversal de una variación del sistema representado en la figura 21, en la que se emplean cámaras concéntricas.

30 La figura 28 es una vista en sección transversal del dispositivo y el contenido representado en la figura 27 durante una centrifugación inicial.

La figura 29 es una vista en sección transversal del dispositivo y el contenido representado en la figura 27 después de haber parado la centrifugación inicial.

35 La figura 30 es una vista en sección transversal del dispositivo y el contenido representado en la figura 27 durante una centrifugación secundaria.

La figura 31 es una vista en sección transversal de un sistema que emplea una membrana hidrófoba.

40 La figura 32 es una porción ampliada de la figura 31.

La figura 32 es una vista en planta inferior de una cámara de densificación que tiene uno o más nervios sólidos en la pared interior.

45 La figura 33 es una vista en sección transversal de una porción de una pared de la cámara de densificación que tiene un refuerzo de tela.

50 La figura 34 es una vista en sección transversal de una variación de la pared de la figura 33, en la que la pared está provista de abombamientos.

La figura 35 es una vista en sección transversal de una variación de la pared de la figura 33, en la que la pared está provista de ranuras.

55 La figura 36 representa una cámara de densificación recubierta con una película extraíble que tiene lengüetas, facilitando la película la extracción de la membrana.

La figura 37 representa una membrana que tiene perforaciones para facilitar el rasgado.

60 La figura 38 es una vista en perspectiva parcialmente en sección de un dispositivo médico rotor.

La figura 39 es una vista en planta inferior de una cámara de densificación que tiene uno o más nervios sólidos en la pared interior.

65 La figura 40 representa ejemplos de un molde orientado para uso en un sistema de centrifugación radial (como se representa en la figura 40(a)) y un molde orientado para uso en un sistema de centrifugación axial (como se

representa en la figura 40(b)).

La figura 41 representa una porción de un dispositivo que tiene un molde, en el que se emplea un embudo y un canal para promover el llenado de la cavidad.

5 La figura 42 representa una porción de un dispositivo que tiene un molde, en el que se emplean agujeros de ventilación para permitir el escape apropiado de gases y líquidos.

10 La figura 43 es una vista en perspectiva, representada parcialmente en sección transversal, de un dispositivo que tiene moldes, paletas que dividen dos cámaras y un agujero de ventilación.

La figura 44 es una vista en planta superior del dispositivo de la figura 43.

15 La figura 45 es una vista en planta superior de un dispositivo que tiene moldes, paletas que dividen tres cámaras desiguales y un agujero de ventilación.

20 La figura 46 es una vista en planta superior de una modificación del dispositivo de la figura 45, en la que los moldes se representan integrales, conectados y extendiéndose desde el dispositivo y las paletas dividen tres cámaras iguales.

La figura 47 es una vista en sección transversal lateral de una porción de cualquiera de los dispositivos representados en las figuras 43-46 después de haber introducido plasma rico en plaquetas en al menos una cámara, pero antes de que el dispositivo haya sido centrifugado.

25 La figura 48 es una vista en sección transversal lateral de una porción del dispositivo representado en la figura 47 justo después de que el dispositivo ha sido centrifugado.

30 La figura 49 es una vista en sección transversal lateral de una porción del dispositivo representado en la figura 47 en centrifugación plena, en la que el plasma rico en plaquetas ha entrado en al menos uno de los moldes.

La figura 50 es una vista en sección transversal que representa una alternativa de plástico, por ejemplo, vidrio fijado a la parte inferior.

35 La figura 51 es una vista en sección transversal que representa una alternativa de plástico, por ejemplo, esferas de vidrio encoladas o apiladas en caliente en la parte inferior.

La figura 52a es una vista en perspectiva de un recipiente primario envuelto en una película estéril y alojado por un soporte.

40 La figura 52b es una vista despiezada de la figura 54a que representa un aro en el tubo primario.

La figura 53 es una vista en sección transversal parcial de un sistema de dispensación/bombeo que puede ser empleado con algunas realizaciones de la invención.

45 La figura 54a es una vista en sección transversal de una copa que tiene una parte inferior perforada, estando alojada la copa en un recipiente secundario.

50 La figura 54b es una vista en sección transversal de una realización alternativa de la copa representada en la figura 54a.

La figura 54c es una vista en sección transversal tomada a lo largo de la línea 54c-54c de la figura 54b.

55 La figura 54d es una vista en sección transversal de una realización alternativa de la copa representada en la figura 54b, teniendo la copa perforaciones a lo largo de su longitud.

La figura 54e es una vista en sección transversal parcial que representa un sistema dispensador operado por desplazamiento positivo en unión con la copa de cualquiera de las figuras 54a-54d.

60 La figura 54f es una vista en sección transversal parcial que representa un sistema dispensador similar a la figura 54e, en el que se utiliza un mecanismo de pistola de calafateo.

La figura 55 es una secuencia en sección transversal parcial que representa un sistema dispensador, en el que el tubo secundario tiene dos tapones.

65 La figura 56 es una vista en perspectiva de un inserto moldeable.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a un método para preparar una lámina de fibrina sólida, incluyendo el método:

- 5 extraer sangre de un paciente;
- separar plasma de la sangre; y
- 10 simultáneamente coagular y centrifugar axialmente el plasma para formar la lámina de fibrina sólida, siendo adecuada la lámina de fibrina sólida para regenerar tejido corporal en un organismo vivo; así como un dispositivo para llevar a cabo el método anterior, incluyendo
- una cámara primaria,
- 15 Una cámara secundaria conteniendo un coagulador; y
- Un medio que separa la cámara primaria de la cámara secundaria, usándose el dispositivo en centrifugación axial.
- 20 En el método de la presente invención, se usa un kit preparado para el uso, que permite obtener rápidamente cola de fibrina autóloga, aliviando al menos parcialmente las infecciones virales y/o los casos de rechazo cuando se usa en cirugía.
- 25 Esto se puede lograr usando un activador de coagulación, que no es de origen humano ni animal, sino más bien un compuesto inorgánico que, por lo tanto, no puede ser infectado y no da lugar a rechazo.
- El kit "preparado para uso" usado en el método de la presente invención puede incluir un recipiente sellado conteniendo cloruro de calcio como activador de coagulación. El cloruro de calcio activa el fibrinógeno presente en el plasma del paciente cuando éste es introducido al recipiente sellado.
- 30 Los sistemas y los kits tienen la gran ventaja de permitir la preparación de cola de fibrina autóloga que puede ser usada sin riesgo de infecciones virales o casos de rechazo. El kit también puede permitir la preparación de cola de fibrina autóloga a partir de plasma del paciente en un tiempo muy corto así como en la formación de coágulos o membrana o pulverización. El kit preparado para uso también puede permitir obtener la cola de fibrina autóloga a costos proporcionalmente más bajos con respecto a los sistemas conocidos. Además, el kit preparado para uso
- 35 también puede proporcionar plaquetas y sus factores de crecimiento asociados para regeneración rápida de tejido.
- Otras ventajas del kit serán evidentes a los expertos en la técnica a partir de la descripción detallada siguiente de algunas de sus realizaciones.
- 40 Los recipientes adecuados para el kit incluyen un recipiente de vidrio para antibióticos como el descrito a continuación en el ejemplo 1. También se puede usar tubos de prueba de vidrio o plástico. El volumen preferido del recipiente es de 5 a 15 ml. Los tubos de prueba tienen preferiblemente un diámetro del orden de 12 a 16 mm y una altura del orden de 75 a 100 mm. El recipiente deberá ser adecuadamente grueso de manera que resista los esfuerzos resultantes de la diferencia de presión entre su espacio interior y la atmósfera cuando se rarifique. Los
- 45 tubos inferiores semiesféricos o cónicos son preferiblemente de 0,7 mm de grueso, los tubos inferiores planos 1 mm de grueso. Los recipientes de plástico se hacen preferiblemente de resina de poliéster transparente, de 0,2-0,8 mm de grueso, con el fin de asegurar que el vacío se mantenga durante al menos 12 meses después de la producción. Después de la preparación, los tubos de prueba de plástico se introducen preferiblemente en un recipiente de hojalata estanco al vacío que tiene una capa interior de polietileno termosellada con el fin de asegurar una perfecta
- 50 estanqueidad hasta la fecha de uso.
- Se deberá indicar que la rarificación de recipientes o tubos de prueba es aconsejable; sin embargo, no es necesaria para poner en práctica la presente invención.
- 55 Los recipientes o tubos de prueba pueden estar sellados con tapones de caucho o silicona perforables, que sean adecuados para asegurar que el recipiente sea perfectamente estanco y para permitir la obturación por vacío después de la introducción de los componentes químicos y antes del paso de esterilización por vapor o radiación.
- 60 Después del sellado, los recipientes pueden ser esterilizados bajo vapor a 121°C durante 30 minutos. La esterilización se puede llevar a cabo también por irradiación con rayos gamma o haz de electrones.
- Aunque se puede usar un ácido tranexámico estabilizador de fibrina, también es adecuado ácido epsilon-amino-caproico puro y cristalino. La cantidad será aproximadamente 1 g al usar un recipiente de 25 ml, adecuado para una cantidad de plasma de 20 ml. A veces no hay que usar un estabilizador de fibrina. Se puede añadir otros agentes terapéuticos mejoradores del rendimiento al segundo recipiente para inclusión en la red de fibrina y plaquetas. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, injerto de hueso y tejido blando y materiales de andamios, antibióticos,
- 65

analgésicos, células madre, agentes quimiotóxicos para terapia contra el cáncer, inmunosupresores, células diseñadas para expresión de moléculas deseadas, y sus combinaciones.

5 Como un activador de coagulación, se puede usar  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  sólido o una solución líquida conteniendo calcio en el kit según la presente invención, aunque se puede usar otros activadores de coagulación (enumerados más adelante). Por ejemplo, se puede introducir 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), con el fin de evitar la introducción de componentes extraños contaminantes. Alternativamente, se puede usar otra especie catiónica, tal como iones magnesio, manganeso o zinc, que tienen una afinidad más alta al anticoagulante que el calcio endógeno, en lugar de cationes de calcio divalente. Después de la adición al plasma rico en plaquetas (PRP) anticoagulado, los iones de calcio endógeno son desplazados del anticoagulante por la especie catiónica de afinidad más alta y los iones de calcio endógeno original están disponibles para activación de coágulos.

15 En 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 de hasta 35,28 mg, mientras que la cantidad de ácido tranexámico será proporcionalmente de hasta 300 mg de cristales.

20 En 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 de hasta 58,8 mg mientras que la cantidad de ácido tranexámico será proporcionalmente de hasta 500 mg de cristales.

25 Además 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  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . También se puede usar una solución de esta sal, como se describe en el ejemplo 1 siguiente.

30 La presente invención proporciona métodos para formar una lámina de fibrina sólida o cola autóloga capaz de regenerar tejido en un organismo vivo. En estos métodos, se obtiene plasma anticoagulado por centrifugación de una muestra de sangre. Los dispositivos de transferencia aquí descritos permiten que el plasma sea transferido a un segundo recipiente conteniendo agentes de coagulación de calcio y después inmediatamente centrifugado con el fin de obtener una red de fibrina y plaquetas autóloga, densa, estable. Los dispositivos de transferencia aquí descritos también se pueden usar para transferir otros líquidos en otras aplicaciones. En otros términos, los métodos, los dispositivos de transferencia y los sistemas aquí descritos permiten la centrifugación y coagulación concomitantes. Usando estos sistemas y métodos, se puede lograr al menos uno de los siguientes: 1) la muestra es manipulada de manera que se mantenga la esterilidad; 2) se transfiere el volumen total de plasma para maximizar el pleno rendimiento de un coágulo; 3) la relación estequiométrica de anticoagulante y agente de coagulación de calcio se mantiene en un rango estrecho para minimizar el tiempo de coagulación; 4) la transferencia se completa rápidamente y puede ser realizada de forma interoperativa dentro de la duración media de los factores de crecimiento derivados de plaquetas; 5) los proveedores de atención sanitaria que no realizan normalmente estas operaciones (por ejemplo, los dentistas) pueden realizar fácilmente estos métodos y operar los sistemas; y 6) los dispositivos son de un solo uso con el fin de evitar la reutilización y la posible contaminación por patógenos transportados en la sangre.

45 En términos generales, la invención proporciona métodos para preparar una lámina de fibrina sólida o cola autóloga que puede ser usada para regenerar tejido en un organismo vivo. A efectos de ilustración, la presente invención se describirá en primer lugar con ayuda de métodos comparativos usando centrifugación radial. En una realización comparativa (representada en la figura 1), el sistema incluye un recipiente primario 10, un recipiente secundario 14 y un dispositivo de transferencia 18. Preferiblemente, los recipientes primario y secundario 10, 14 son tubos, y más en concreto, tubos de prueba, aunque cualquier recipiente que sea capaz de contener un fluido o líquido y ser centrifugado es adecuado para el uso. Los recipientes 10, 14 se hacen preferiblemente de vidrio o plástico.

50 El recipiente primario 10 deberá ser capaz de extraer sangre de él usando técnicas de venipuntura estándar. Preferiblemente, el recipiente primario 10 está sellado con un cierre hermético 22 mientras se extrae la sangre para evitar la contaminación, aunque el recipiente 10 se puede sellar poco después. Se puede usar una variedad de cierres herméticos 22 para sellar el recipiente primario 10, por ejemplo, un tapón de caucho, tapón, espuma, elastómero u otro compuesto. El cierre hermético 22 deberá ser capaz de ser perforado o pinchado, y por lo tanto el caucho y la silicona son materiales preferidos a partir de los que se fabrica el cierre hermético, aunque se puede usar cualquier material que proporcione un cierre hermético y que sea capaz de ser perforado. El recipiente primario 10 puede contener una solución anticoagulante 25. El anticoagulante 25 de la solución incluye preferiblemente un agente de unión de calcio. Más en concreto, el anticoagulante 25 puede incluir citrato de sodio, sal disódica del ácido etilendiamintetraacético, sal dipotásica del ácido etilendiamintetraacético y tripotasio y sus combinaciones. Preferiblemente, el recipiente primario 10 contiene una solución de citrato de sodio. El anticoagulante 25 tiende a aclarar la sangre recogida en el recipiente primario 10 con el fin de colocarla en condiciones de centrifugación. Además, el recipiente primario incluye un medio de separación por gradiente de densidad 26, aire 27 así como un fluido de alta viscosidad y baja densidad 28 (véase la figura 10 que representa un kit mejor descrito más adelante).

65 El medio de separación por gradiente de densidad 26 debe ser capaz de separar diferentes fracciones de un líquido

o fluido concreto en el recipiente primario 10 que tengan diferentes densidades. El medio de separación 26 permite separar por centrifugación fracciones densas indeseadas del líquido, y posteriormente quitarlas. Por ejemplo, el medio de separación 26 puede separar glóbulos rojos 30 de plasma rico en plaquetas 34 durante la centrifugación de una muestra de sangre. En un ejemplo, el medio de separación 26 puede encontrarse en el fondo del recipiente primario 10. En otros ejemplos, el medio de separación 26 se puede aplicar como un aro alrededor del interior del recipiente primario 10, o en cualquier otra posición interior adecuada. Aunque es adecuado cualquier medio de separación por gradiente de densidad 26 capaz de separar líquidos que tengan diferentes densidades durante la centrifugación, preferiblemente el medio 26 es un gel, y más preferiblemente, un gel tixotrópico. La figura 2 ilustra el recipiente primario 10 después de que la centrifugación de una muestra de sangre ha tenido lugar, y también representa el medio de separación de gel 26. Preferiblemente, el gel tixotrópico tiene un límite de fluencia suficiente tal que no fluya en o se mueva por el recipiente primario 10 en condiciones ambientales ordinarias, pero que fluya a las fuerzas centrífugas más altas que experimente durante la centrifugación. Muy preferiblemente, se prefiere un gel que tenga una densidad menor que la alta densidad de la fracción indeseada de glóbulos rojos 30, pero mayor que la densidad de la fracción de plasma deseada 34. En otros términos, es muy preferible un gel u otro medio que sea capaz de separar glóbulos rojos 30 de plasma 34 después de centrifugar una muestra de sangre. Tal medio 26 se moverá o fluirá dentro del recipiente durante la centrifugación, pero no fluirá a continuación, creando por ello una barrera semipermanente entre las fracciones separadas cuando se complete la centrifugación.

Como se representa en la figura 3, otro medio adecuado de separación por gradiente de densidad 26 que puede ser empleado en el recipiente primario 10 es una pluralidad de perlas de plástico 26 que posean la deseada densidad para separación de fracciones. Las perlas pueden estar suspendidas en el fluido de alta viscosidad y baja densidad requerido para el sellado posterior del dispositivo de transferencia 38. Durante la centrifugación, las perlas 26 migran a la interfaz entre las dos fracciones 30, 34 y son compactadas, en forma muy parecida a sinterización, formando una barrera estable entre las fracciones que tienen diferentes densidades (es decir, los glóbulos rojos 30 y el plasma 34). El fluido de alta viscosidad y baja densidad residual que recubre los pellets contribuye a la estabilidad de la capa compactada.

Otro medio adecuado de separación por gradiente de densidad incluye dispositivos poliméricos flotantes como los descritos en las Patentes de Estados Unidos números 5.560.830 y 5.736.033 concedidas a Coleman. La figura 4 representa un dispositivo polimérico flotante 26.

El fluido inmisible de baja densidad y alta viscosidad 28 ("fluido LDHV") en el recipiente primario incluye generalmente un aceite inerte. Muy preferiblemente, el fluido LDHV incluye poliéster, silicona u otro fluido inerte, y se aplica al recipiente primario en una posición encima del gel mediante bombas de desplazamiento o presión. El fluido LDHV debe ser capaz de bloquear o eliminar el flujo a través de la cánula 38 del dispositivo de transferencia 18 a la entrada en él, como se describe mejor más adelante.

El recipiente secundario 14 (representado, entre otros, en las figuras 1 y 10) contiene los reactivos químicos necesarios para reacciones concretas. El segundo recipiente 14 está sellado con un cierre hermético 24 de manera similar al primer recipiente 10, es decir, con un tapón de caucho, tapón, espuma, elastómero u otro compuesto. En una aplicación de la invención explicada a continuación, el tubo secundario puede contener un activador de coagulación de calcio 36. Los ejemplos de activadores de coagulación de calcio adecuados incluyen, aunque sin limitación, cloruro de calcio, fluoruro de calcio, carbonato de calcio y sus combinaciones, sin embargo, cualquier sal conteniendo calcio será suficiente como un activador de coagulación de calcio. Además, otros activadores incluyen gluconato de calcio, fumarato de calcio, piruvato de calcio y otras sales de calcio orgánico que sean solubles en agua y que sean compatibles con la vida humana. El activador de coagulación coagula el plasma cuando entra en contacto con él. El recipiente secundario 14 puede ser rarificado completamente a una presión interna que sea sustancialmente cero. La rarificación del recipiente secundario 14 facilita la transferencia de fluido desde el recipiente primario 10 al recipiente secundario 14 a través del dispositivo de transferencia 18. Dado que no hay moléculas de gas cuando el recipiente secundario 14 se llena durante la transferencia, no hay compresión del gas residual con aumento de presión resultante. Como resultado, la tasa de flujo se maximiza, se facilita la transferencia completa, se mantiene la esterilidad eliminando la necesidad de ventilación y se mantiene la relación estequiométrica deseada para la reacción deseada.

El recipiente secundario también puede contener uno o varios agentes mejoradores terapéuticos tales como antibióticos, analgésico, agentes terapéuticos contra el cáncer, factores de crecimiento de plaquetas, proteínas morfogénicas óseas, células madre, materiales de injerto óseo, injerto de tejido blando y materiales de cultivo de células, inmunosupresores y sus combinaciones. También se puede incluir otros agentes terapéuticos que puedan ser administrados de forma tópica. Los ejemplos de antibióticos incluyen, aunque sin limitación, ampicilina, eritromicina, tobramicina y sus combinaciones. Los analgésicos incluyen, aunque sin limitación, aspirina, codeína y sus combinaciones. Los agentes terapéuticos contra el cáncer incluyen, aunque sin limitación, 5-fluoruracilo. Los materiales de injerto óseo incluyen, aunque sin limitación, hueso autólogo, aloinjerto o homoinjerto de cadáveres, hueso de origen animal (xenoinjertos o heteroinjertos; por ejemplo, ovino, bovino, porcino, equino), injertos de hueso sintético (fosfato tricálcico, hidroxiapatita, cerámica de sulfato de calcio), compuestos ortobiológicos (factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF)), proteína morfogénica ósea (BMP), proteína morfogénica ósea humana recombinante (rhBMP), y sus combinaciones. Los materiales de injerto de tejido blando y cultivo de células incluyen,

aunque sin limitación, piel, materiales de injerto cutáneo (Apligraf comercializado por Organogenesis), injerto gingival (por ejemplo, de paleta blanda), colágeno, injertos bioabsorbibles, injertos vasculares, PDGF, Factor 4 de plaquetas (PF4), tromboglobulina, trombospondina, TEFLON™ y DACRON™ de DuPont y sus combinaciones. Los inmunosupresores incluyen, aunque sin limitación, inmunosupresores para trasplantes de órganos (por ejemplo, corticoesteroides, bloqueadores de calcineurina (ciclosporina, tacrolimus, SK506), micofenolato mofetil, rapamicina) e inmunosupresores cutáneos (serolimus, receptor agonista espingosina 1-fosfato (STY720)). También se puede incluir células vivas para expresión de moléculas deseadas y terapia génica.

El dispositivo de transferencia 18 puede incluir dos piezas, como se representa, por ejemplo, en la figura 1 o, alternativamente, puede ser de una pieza, como se representa, por ejemplo, en las figuras 17-18. Como se representa mejor en las figuras 5-6 y 17-18, el dispositivo de transferencia 18 incluye 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 están afilados o son puntiagudos (o incluso tienen un bisel rectificado) de manera que sean capaces de perforar o penetrar los cierres herméticos 22, 24 de los recipientes primario y secundario 10, 14. La cánula 38 está rebajada y montada coaxialmente dentro del alojamiento 58 con el fin de evitar la adherencia accidental de los dedos durante la manipulación de los recipientes. El alojamiento 58 tiene dos guías cilíndricas opuestas 62, 64 que están en el centro y orientadas axialmente con la cánula 38. Las guías 62, 64 sirven para guiar los recipientes primario y secundario 10, 14 sobre los extremos primero y segundo 42, 50 del dispositivo de transferencia 18. Las figuras 5 y 6 muestran las guías 62, 64 guiando los recipientes 10, 14 sobre los extremos primero y segundo 42, 50.

Los extremos 42, 50 de la cánula 38 pueden estar rodeados o cubiertos con válvulas de seguridad, vainas o manguitos elastoméricos 68, 72, que forman un cierre hermético. Las vainas de seguridad 68, 72 también cubren las aberturas primera y segunda 46, 54. Cuando los extremos primero y segundo 42, 50 perforan los manguitos elastoméricos 68, 72, los manguitos 68, 72 se retiran consiguientemente. La figura 5 representa el primer extremo 42 comenzando a perforar el cierre hermético 22 del recipiente primario 10 y retirándose consiguientemente el manguito 68, mientras que el manguito 72 todavía cubre completamente el segundo extremo 50. Los extremos 42, 50 se extienden suficientemente lejos para perforar completamente los cierres herméticos 22, 24, pero no se extienden mucho más a los recipientes 10, 14 (como se representa en la figura 6). Esto permite la máxima transferencia de volumen líquido del recipiente primario invertido 10 al recipiente secundario 14. La figura 6 también representa los extremos primero y segundo 42, 50 con los cierres herméticos 22, 24 de los recipientes primero y segundo 10, 14 completamente perforados, y ambos manguitos 68, 72 completamente retirados. Los manguitos elastoméricos 68, 72 evitan el flujo de gas o líquido cuando no están perforados. Los materiales adecuados para los manguitos 68, 72 incluyen, aunque sin limitación, variedades de caucho y elastómeros termoplásticos.

Pasando ahora a la operación de la primera realización comparativa, una vez que se ha aspirado sangre al recipiente primario 10 usando técnicas de venipuntura estándar, la sangre es anticoagulada por el anticoagulante 25 que contiene. Típicamente, el recipiente primario 10 está sellado mientras la sangre es aspirada; sin embargo, se puede sellar a continuación. El sellado del recipiente primario 10 evita la contaminación de su contenido. A continuación, el recipiente primario y su contenido 10 (es decir, sangre, anticoagulante 25, medio de separación 26 y fluido LDHV 28) son centrifugados. Puede tener lugar centrifugación aceptable a una fuerza gravitacional en el rango de 900 a 3.500 xG durante 5 a 15 minutos. En una realización preferida, el recipiente primario es centrifugado a una fuerza gravitacional de aproximadamente 1.000 xG durante diez minutos aproximadamente. Esta centrifugación inicial separa el contenido o fracciones del recipiente primario en una pluralidad de capas, como se representa, por ejemplo, en la figura 2. Las capas incluyen (en orden desde el fondo del recipiente primario 10 a la parte superior del recipiente después de la centrifugación): la capa de glóbulos rojos 30, el medio de separación 26, la capa de plasma rico en plaquetas 34, la capa de fluido LDHV 28, y finalmente un volumen de gas residual 27 a una presión igual a la atmosférica. Las proporciones de estas capas pueden variar de una aplicación a otra, y se representan aquí en dichas proporciones a efectos ilustrativos solamente. Después de la centrifugación, el recipiente primario sellado 10 se invierte antes de usar el dispositivo de transferencia 18 para perforar el cierre hermético 22. En otros términos, el recipiente primario 10 se invierte de tal manera que la abertura sellada esté en la posición vertical más baja representada en la figura 7. La inversión del recipiente primario cambia el orden en el que las capas están colocadas. Encima del cierre hermético 22 están las capas siguientes en secuencia de abajo arriba: el plasma rico en plaquetas 34, el fluido inmiscible de alta viscosidad y baja densidad 28, el gas residual 27, el medio de separación 26 y los glóbulos rojos 30.

A continuación, se coloca el recipiente secundario 14 en una posición vertical con su abertura sellada 24 en la posición superior mejor representada en la figura 8. Esto pone el recipiente secundario 14 para la transferencia del contenido del recipiente primario. La figura 8 ilustra el recipiente primario centrifugado 10 en la posición invertida encima del dispositivo de transferencia 18, que está encima del recipiente secundario 14 en la posición apropiada para la transferencia. La guía 64 del dispositivo de transferencia se coloca entonces sobre el recipiente secundario 14 y lo guía, mientras que el recipiente primario invertido 10 se coloca entonces en la otra guía 62 (o viceversa). En otros términos, se puede usar cualquier extremo 42, 50 de la cánula 38 para perforar cualquier cierre hermético 22, 24. Dado que el dispositivo de transferencia 18 es simétrico en ambos extremos, al usuario se le da un grado de operación a prueba de impericia. El usuario junta entonces los recipientes con el fin de perforar ambos cierres herméticos 22, 24 con cada extremo de cánula respectivo 42, 50. Los dos manguitos de válvula 68, 72 que cubren

los extremos 42, 50 mejoran más la operación a prueba de impericia. En primer lugar, si el primer extremo 42 perfora el cierre hermético primario 22 (de nuevo, se puede usar cualquier extremo para perforar cualquier cierre hermético), el manguito no perforado 72 que cubre el otro extremo 50 contendrá el fluido, evitando por ello que el fluido se derrame. Por otra parte, si el otro extremo 50 perfora el otro cierre hermético 24 (y el manguito 72 consiguientemente) en primer lugar, el vacío es mantenido por el manguito 68 que cubre el primer extremo 42.

Una vez que los extremos 42, 50 perforan ambos manguitos 68, 72 y los cierres herméticos 22, 24 como se representa en las figuras 6 y 9, el fluido deseado es transferido desde el recipiente primario 10 al recipiente secundario 14 por presión diferencial. En otros términos, dado que la presión en el recipiente secundario 14 ha sido rarificada, el contenido (más en concreto, el plasma 34) del recipiente primario 10 fluye al recipiente secundario 14. La presión en el recipiente primario 10, originalmente atmosférica, disminuye cuando el nivel de líquido disminuye y el volumen de gas se expande. Sin embargo, la presión nunca es igual a cero. Dado que el recipiente secundario 14 está completamente rarificado a una presión igual o ligeramente superior a cero, la presión en él no aumenta cuando se llena el tubo dado que hay poco o nada de gas a comprimir. Consiguientemente, el aparato 18 puede ser usado para transferir una amplia variedad de líquidos y soluciones de un tubo a otro, y no se deberá interpretar limitado solamente a la transferencia de sangre.

A causa de la disposición secuencial concreta de las capas en el recipiente primario 10, el plasma rico en plaquetas 34 se transfiere fácilmente. Además, dado que el recipiente primario 10 también está preestablecido a un nivel de rarificación, el recipiente sólo se llena parcialmente después de la recogida de sangre. Esto permite que el gas en el "espacio superior" permanezca de forma significativa por encima de cero durante la transferencia cuando su volumen se expanda, permitiendo por ello la transferencia rápida y completa al recipiente secundario 14. Esto viene dictado por la ley de los gases ideales y la ecuación de Poiseuille-Hagen.

La transferencia del contenido o los fragmentos del recipiente primario (es decir, el plasma rico en plaquetas) continúa hasta que el fluido LDHV 28 entra en la cánula 38. La alta viscosidad del fluido LDHV tapa el lumen estrecho de la cánula 38, dando lugar por ello a interrupción del flujo. Esto evita la reutilización del dispositivo de transferencia 18, lo que es especialmente importante al intentar eliminar dispositivos de transferencia de sangre contaminados, y también evita la contaminación accidental por patógenos transportados en la sangre por el uso anterior en o por otro paciente.

La transferencia de la fracción de plasma 34 al recipiente secundario 14 se completa, permitiendo por ello el máximo rendimiento y mantenimiento de la relación estequiométrica apropiada de reactivos. El plasma 34 contacta entonces el activador de coagulación 36 en el segundo recipiente 14, creando por ello una mezcla 60 que puede ser centrifugada inmediatamente para formar una lámina de fibrina sólida. La presión diferencial entre los recipientes primario y secundario 10, 14 se mantiene sustancialmente durante toda la transferencia, permitiendo una transferencia rápida. El dispositivo de transferencia 18 no queda afectado por orden del enganche de tubos, haciendo que el sistema sea virtualmente a prueba de impericia. Finalmente, la transferencia tiene lugar sin ventilación, manteniendo la esterilidad y la no contaminación de la muestra.

En general, el dispositivo de transferencia 18 proporciona una forma rápida y eficiente de poner el plasma 34 en contacto con el activador de coagulación de calcio 36, inmediatamente después de lo cual tiene lugar la coagulación y centrifugación concomitantes del plasma con el fin de formar la lámina de fibrina sólida. La lámina de fibrina sólida es adecuada para regenerar tejido corporal en un organismo vivo. Tal método alivia la necesidad de preconcentrar primero el plasma extrayendo agua de él antes de poner el plasma en contacto con el activador de coagulación de calcio 36. Además, el dispositivo de transferencia 18 puede ser usado para transferir sangre u otros fluidos en una amplia variedad de aplicaciones.

Un kit preparado para el uso como el empleado en la presente invención se representa en la figura 10. El kit incluye el recipiente primario 10, el recipiente secundario 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 paquete. La primera bandeja 70 tiene todos los componentes necesarios para el paso 1 y la segunda bandeja 74 tiene todos los componentes requeridos para el paso 2. Naturalmente, los componentes se pueden disponer en una amplia variedad de formas.

El paso 1 incluye recoger sangre en el recipiente primario 10, seguido de la centrifugación para obtener plasma rico en plaquetas. Los componentes de la primera bandeja 70 incluyen un escobillón de alcohol 78 para limpiar el lugar de venipuntura, una aguja de recogida de muestra de sangre múltiple 82 (calibre 21 x 1"), un soporte de seguridad 86, el recipiente primario 10 conteniendo el anticoagulante (por ejemplo, citrato), gel, fluido LDHV y una venda 90 para cubrir el lugar de venipuntura. El lugar de venipuntura se limpia con el escobillón de alcohol estéril 78. El cartucho de aguja 84 se abre y enrosca en el soporte de seguridad 86. A continuación se introduce la aguja 82 en la vena del paciente y se conecta el recipiente 10 al soporte 86. Entonces, la sangre llena el recipiente, y la aguja 82 se retira y retrae al soporte 86. El extremo del soporte se cierra con la aleta articulada. La vena se cierra con la venda 90. El recipiente 10 se centrifuga a 1000 xG durante 10 minutos aproximadamente y el plasma se separa de los glóbulos rojos.

Los componentes de la segunda bandeja son los componentes usados para el paso 2. Incluyen un tubo AFT (tubo

de fibrina autóloga) o recipiente secundario 14 y un dispositivo de transferencia 18. El paso 2 incluye colocar el recipiente primario 10 en una posición invertida y en el dispositivo de transferencia 18. El recipiente secundario 14 contiene el coagulador y se perfora con el otro extremo del dispositivo de transferencia. Se unen los recipientes 10, 14 y el plasma rico en plaquetas fluye desde el recipiente primario 10 al recipiente secundario 14. El recipiente secundario se centrifuga entonces inmediatamente a 2300 xG durante 30 minutos para obtener fibrina densa con plaquetas o una lámina de fibrina sólida.

En una segunda realización comparativa se facilita otro sistema integrado para preparar una lámina de fibrina sólida, como se representa en las figuras 11-14. El sistema incluye un dispositivo de recogida primario 10, que es muy similar al recipiente primario 10 de la primera realización. El dispositivo de recogida 10 puede contener un medio de separación de células por gradiente de densidad 26 (como se ha descrito anteriormente) y un anticoagulante (no representado) así como un depósito 94 que se puede conectar al dispositivo de recogida primario 10 o ser integral con él. La explicación anterior relativa a la primera realización de la invención, y más en concreto, al medio de separación 26 se aplica a la segunda realización de la invención. En otros términos, se puede usar los mismos materiales para el medio de separación 26, y se prefieren los mismos materiales. Por ejemplo, el medio de separación 26 incluye muy preferiblemente un gel tixotrópico, cuyo límite de fluencia evita que fluya en condiciones ambientales ordinarias, pero permite que fluya a las fuerzas centrífugas más altas experimentadas durante la centrifugación. El medio de separación 26 puede estar situado en el fondo como se representa en la figura 11 (es decir, el extremo opuesto de la abertura) del dispositivo de recogida primario. Alternativamente, el medio de separación puede formar un aro alrededor del interior del dispositivo de recogida primario. El dispositivo de recogida primario 10 es esencialmente el mismo que el recipiente primario 10 descrito anteriormente, a excepción de que el dispositivo de recogida primario puede no contener un fluido de alta densidad y baja viscosidad. Preferiblemente, el dispositivo de recogida primario 10 tiene un cierre hermético 22 tal como un tapón de caucho o tapón (como se ha explicado anteriormente).

El depósito 94 incluye una cámara 96 y una cánula 100 en comunicación de fluido con ella. La cámara 96 contiene un reactivo líquido 104, muy preferiblemente un activador de coagulación de calcio. Preferiblemente, el activador de coagulación de calcio es cloruro de calcio, fluoruro de calcio, carbonato de calcio, gluconato de calcio, fumarato de calcio, piruvato de calcio o una combinación de los mismos. La cánula 96 debe ser capaz de perforar el cierre hermético 22 del dispositivo de recogida primario 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 salgan de la cánula 100 en condiciones ambientales. Otros medios de bloqueo adecuados incluyen, aunque sin limitación, sistemas mecánicos accionados por fuerza tales como bolas en muelles, válvulas, válvulas empujadas por muelle, membranas perforables y ampollas (es decir, membranas huecas llenas de fluidos o polvos). El límite de fluencia del gel 108 es tal que a la centrifugación a una fuerza gravitacional especialmente alta, el gel 108 se mueva con el fin de permitir la comunicación entre la cámara 96 y el dispositivo de recogida primario 10 cuando los dos estén enganchados. El depósito 94 también puede tener un alojamiento de guía 110 que se usa para guiar el recipiente sobre el dispositivo de recogida 10. La cánula 100 puede estar rodeada o cubierta con un manguito elastomérico 112 para mantener la esterilidad de la cánula 100. El manguito 112 se ha explicado anteriormente con respecto a la primera realización.

En otra realización, la cámara 96 también puede contener uno o más de un antibiótico, un analgésico, un terapéutico contra el cáncer, un factor de crecimiento de plaquetas, una proteína morfogénica ósea, células para terapia génica, células madre para usos adicionales, y otras hormonas. También se puede incluir otros agentes terapéuticos que puedan ser administrados. Los ejemplos de antibióticos incluyen, aunque sin limitación, ampicilina, eritromicina y tobramicina. Los analgésicos incluyen, aunque sin limitación, aspirina y codeína. Los agentes terapéuticos contra el cáncer incluyen, aunque sin limitación, 5-fluorouracilo.

En la operación, se recoge sangre del paciente 116 en el dispositivo de recogida primario 10 mediante una técnica de venipuntura convencional, como se ha descrito anteriormente. El anticoagulante en el dispositivo de recogida primario 10 aclara la sangre antes de la centrifugación. Posteriormente, el depósito 94 se une al dispositivo de recogida primario 10 perforando la cánula 100 del depósito 94 a través del cierre hermético 22 del dispositivo de recogida primario 10, como se representa en las figuras 13 y 14. El manguito 112 se retrae cuando la cánula 100 perfora el cierre hermético 22. La longitud de la cánula 100 es suficiente para perforar el cierre hermético 22, pero la cánula no se extiende preferiblemente mucho más al dispositivo de recogida 10, aunque podría hacerlo.

Entonces se centrifugan el dispositivo de recogida 10 y el depósito 94. La fuerza centrífuga ejercida en el tubo se describe por la ecuación  $F = m\omega^2 r$ ; donde  $F$  = fuerza,  $m$  = masa del sistema,  $r$  = distancia radial del centro del rotor, y  $\omega$  = es la tasa de rotación angular. Dado que el recipiente está a un  $r$  menor que el gel del tubo primario, el gel en la cánula del depósito no se puede mover dado que se generan esfuerzos de cizalladura insuficientes. El tubo primario 10 gira a una fuerza gravitacional baja hasta que las células se separan y el gel 26 se mueve a la interfaz célula/plasma, como se representa en la figura 13. En otros términos, 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 10 minutos aproximadamente. También es aceptable para la centrifugación inicial una centrifugación a una fuerza centrífuga de aproximadamente 900-1500 xG durante 5 a 15 minutos aproximadamente.

Posteriormente, la velocidad de centrifugación se incrementa y el recipiente experimenta una fuerza gravitacional suficientemente alta tal que el medio de bloqueo 108 en la cánula 100 se vacíe al dispositivo de recogida primario 10 y el reactivo líquido 108 (por ejemplo, el activador de coagulación de calcio) se vacíe del depósito, como se representa en la figura 14. El contenido puede ser centrifugado posteriormente a aproximadamente 2300-6000 xG durante 15-40 minutos. Cuando el activador de coagulación de calcio contacta el plasma en el dispositivo de recogida primario, tienen lugar la coagulación y la centrifugación inmediatas y simultáneas porque la muestra todavía está siendo centrifugada. Esto da lugar a la formación de una lámina de fibrina sólida adecuada para la regeneración de tejido. La operación de separación de células del tubo primario y la posterior adición del agente de coagulación líquido a la relación estequiométrica correcta se realiza en un tubo sin transferir. Programando la velocidad y la duración de la centrifuga, la invención proporciona un proceso simple y a prueba de impericia.

En una realización alternativa, el único dispositivo de recogida 10 tiene un compartimiento interior 119 y un depósito 94, como se representa en las figuras 15-16. El depósito 94 es integral con o está conectado al dispositivo de recogida primario 10 y en comunicación de fluido con el compartimiento. Un tubo, conducto o abertura 120 realiza la comunicación de fluido entre el compartimiento 119 y el depósito 94, y está sellado con el medio de bloqueo 108. De nuevo, el medio de bloqueo 108 tiene un límite de fluencia que es activado y se mueve cuando se expone a una fuerza gravitacional especialmente alta con el fin de permitir la comunicación entre el depósito 94 y el dispositivo de recogida primario 10, como se ha descrito anteriormente. El límite de fluencia del gel o medio es tal que no se mueva durante la centrifugación inicial para separar células sanguíneas del plasma. En la tercera realización, cada extremo del dispositivo tiene una abertura y cada extremo está sellado con un cierre hermético extraíble o no extraíble 22, 122 tal como un tapón de caucho, tapón, espuma, elastómero u otro compuesto. El depósito 94 con el tapón 122 está situado en el extremo opuesto del cierre hermético 22 del dispositivo de recogida y la abertura.

En otra realización, el depósito 94 también puede contener uno o varios de un antibiótico, un analgésico, un terapéutico contra el cáncer, un factor de crecimiento de plaquetas y una proteína morfogénica ósea. También se puede incluir otros agentes terapéuticos que puedan ser administrados. Los ejemplos de antibióticos incluyen, aunque sin limitación, ampicilina, eritromicina y tobramicina. Los analgésicos incluyen, aunque sin limitación, aspirina y codeína. Los agentes terapéuticos contra el cáncer incluyen, aunque sin limitación, 5-fluorouracilo.

La realización alternativa se usa de la misma manera que la descrita anteriormente con respecto a la segunda realización comparativa, es decir, la centrífuga es controlada a dos fuerzas centrífugas diferentes: 1) la primera es una fuerza suficiente para separar el plasma de los glóbulos rojos; y 2) la segunda es una fuerza suficiente para mover el medio de bloqueo 108 en el tubo, conducto o abertura 120 entre el recipiente y el interior del dispositivo y al cuerpo principal. Como resultado, el activador de coagulación de calcio puede entrar en el interior del dispositivo. A su vez, esto permite la centrifugación y la coagulación concomitantes del plasma con el fin de formar la lámina de fibrina sólida cuando la centrifugación prosigue a la segunda fuerza gravitacional más alta. El cierre hermético 122 se puede quitar con el fin de obtener la lámina de fibrina sólida o cola autóloga. En una realización preferida, el cierre hermético 122 está enroscado y se puede desenroscar del dispositivo 10 como se representa en la figura 16.

En un aspecto, el sistema puede incluir un recipiente primario sellado conteniendo un medio de separación y un líquido de baja densidad y alta viscosidad. El medio de separación es capaz de separar glóbulos rojos de plasma cuando el recipiente contiene sangre y es centrifugado, y el recipiente primario tiene una primera presión. El sistema incluye además un recipiente secundario sellado conteniendo un activador de coagulación de calcio. El recipiente secundario tiene una segunda presión que es menor que la primera presión. El sistema también incluye un dispositivo de transferencia incluyendo una cánula que tiene un primer extremo y un segundo extremo. Los extremos primero y segundo son capaces de perforar los recipientes primario y secundario sellados con el fin de realizar la comunicación de fluido entre los recipientes primero y segundo. El líquido de baja densidad y alta viscosidad del recipiente primario es capaz de bloquear el flujo a través de la cánula al entrar en ella.

En otro aspecto, el sistema incluye un recipiente primario sellado que tiene una primera presión que es capaz de aspirar sangre. El sistema incluye además un recipiente secundario sellado que tiene una segunda presión y que contiene un activador de coagulación de calcio. La segunda presión es menor que la primera presión. El sistema también incluye un dispositivo de transferencia incluyendo una cánula que tiene un primer extremo y un segundo extremo. Los extremos primero y segundo son capaces de perforar los recipientes sellados, y el dispositivo de transferencia es capaz de transferir una porción de sangre aspirada del recipiente primario al segundo recipiente por diferenciación de presión. El sistema también incluye una centrífuga para centrifugar y coagular simultáneamente la porción de sangre transferida desde el recipiente primario al recipiente secundario a través del dispositivo de transferencia y puesta en contacto con el activador de coagulación de calcio con el fin de formar una lámina de fibrina sólida que es capaz de regenerar tejido en un organismo vivo.

La invención proporciona un método de preparar una lámina de fibrina sólida para regenerar tejido corporal en un organismo vivo. El método incluye extraer sangre de un paciente a un recipiente primario y separar el plasma de la sangre en el recipiente primario. El plasma del recipiente primario es transferido a un recipiente secundario que contiene un activador de coagulación de calcio usando un dispositivo de transferencia que incluye una cánula que tiene un primer extremo y un segundo extremo con el fin de poner el plasma en contacto con el activador de

coagulación de calcio. El plasma y el activador de coagulación de calcio son coagulados y centrifugados simultáneamente en el recipiente secundario con el fin de formar una lámina de fibrina sólida. La lámina de fibrina sólida es adecuada para regenerar tejido corporal en un organismo vivo.

5 En otro aspecto, el sistema incluye un dispositivo de recogida primario sellado que tiene un interior y que contiene un medio de separación. El dispositivo de recogida primario es capaz de aspirar sangre a su interior, y el medio de separación es capaz de separar el plasma de los glóbulos rojos cuando el dispositivo de recogida primario contiene sangre y es centrifugado. El sistema incluye además un recipiente que tiene una cámara y un conducto en comunicación de fluido con ella. La cámara tiene un activador de coagulación de calcio, y el conducto está al menos  
10 parcialmente lleno de un medio de bloqueo para evitar que el activador salga de la cámara en condiciones ambientales.

El método incluye extraer sangre de un paciente a un dispositivo de recogida primario que tiene un cierre hermético y proporcionar un recipiente que incluye una cámara y un conducto en comunicación de fluido con la cámara. La cámara está al menos parcialmente llena de un activador de coagulación de calcio, y el conducto está al menos  
15 parcialmente lleno de un medio de bloqueo para evitar que el activador se salga de la cámara en condiciones ambientales. El recipiente está conectado al dispositivo de recogida primario de tal manera que la cámara, el conducto y el dispositivo de recogida estén en comunicación de fluido, excepto con respecto al medio de bloqueo. El dispositivo de recogida primario es centrifugado entonces a una primera velocidad. La primera velocidad es  
20 suficiente para separar plasma de la sangre, pero no suficiente para mover el medio de bloqueo en el conducto al dispositivo de recogida primario. El dispositivo de recogida primario es centrifugado posteriormente a una segunda velocidad. La segunda velocidad es suficiente para mover al menos una porción del medio de bloqueo desde el conducto al dispositivo de recogida primario, permitiendo por ello que el activador de coagulación de calcio fluya al dispositivo de recogida y contacte el plasma, formando por ello una lámina de fibrina sólida adecuada para  
25 regenerar tejido en un organismo vivo.

En contraposición a la presente invención, la mayoría de los sistemas explicados anteriormente emplean centrifugación radial (es decir, el eje del tubo está alineado perpendicularmente al eje de centrifuga) durante la  
30 segunda centrifugación con el fin de comprimir el coágulo. Sin embargo, cuando se usan estos sistemas y dispositivos, la operación de centrifugación puede no ser realizada dentro del quirófano debido a cuestiones de esterilidad. Por lo tanto, un tubo estéril exterior al quirófano, recoge el espécimen en condiciones estériles, transporta el espécimen fuera del quirófano, procesa el espécimen en una centrifuga y entonces asegura la esterilidad del exterior del tubo a la reintroducción al quirófano.

35 Consiguientemente, en unión con cualquiera de los sistemas de dos tubos explicados anteriormente, ambos tubos primario y secundario pueden estar empaquetados en una película de fácil extracción, o alternativamente, un soporte moldeado. La figura 52 representa un diseño de película que puede incluir una envuelta contráctil que tiene una tira de rasgado o un extremo dentado que tiene una parte inferior de rasgado fácil. La figura 52 representa un soporte de tubo estéril que permite la introducción de los recipientes primario o secundario a un campo estéril tal  
40 como un quirófano. El soporte puede llevar una envuelta contráctil para un nivel adicional de manejo, como se representa en la figura 53. El conjunto puede ser esterilizado por radiación. El conjunto se puede abrir posteriormente en un quirófano y el interior y exterior del tubo se mantienen estériles. La figura 53 representa un diseño de soporte. El empaquetado es generalmente de grosor mínimo durante la fabricación. Tanto el tubo como la envuelta pueden ser esterilizados por radiación, proporcionando esterilidad a las superficies interior y exterior. Justo  
45 antes de la entrada al quirófano, la película o el soporte se quitan del tubo primario y el tubo exterior estéril entra en el quirófano. Además, la superficie externa de la película, el tubo envuelto o el soporte pueden ser descontaminados o esterilizados usando sustancias químicas apropiadas conocidas en la técnica antes de ser introducidos al quirófano. Esto permite abrir la película, la envuelta o el soporte dentro del quirófano, lo que asegura la absoluta esterilidad del producto. Se recoge sangre y el tubo sale del quirófano y es centrifugado. El plasma estéril es  
50 transferido al segundo tubo que tiene el activador, mientras está en la película o recipiente y centrifugado. Justo antes de la reentrada al quirófano, se quita la envuelta exterior y entra un producto estéril en el quirófano. Una mejora en este diseño es la adición de una película adhesiva extraíble al tapón del tubo primario, que permite una superficie estéril durante la operación de transferencia.

55 Además, al usar cualquiera de los sistemas de un tubo explicados anteriormente, el tubo puede tener una película o soporte premontado durante la fabricación. El conjunto se coloca en una bolsa hermética y se esteriliza. La bolsa se abre justo antes de entrar en el quirófano. Posteriormente, el tubo recoge la sangre, cuando la aguja perfora el tapón del tubo y la película. También se puede añadir una película adhesiva al tapón del tubo. El tubo sale del quirófano, y se añade al conjunto el recipiente de líquido que tiene el activador u otra sustancia. Se lleva a cabo la centrifugación en dos etapas y el soporte se quita justo antes de la reintroducción al quirófano.  
60

En general, tanto el tubo primario como el secundario se pueden mantener en una película estéril o soporte durante el procesado y puede ser reintroducido al quirófano con un exterior estéril. La película o soporte está premontada sobre los tubos y su uso es transparente para la recogida y centrifugación del tubo de recogida de sangre ordinario.  
65 La película o soporte se puede construir de materiales que mejoren la duración en almacenamiento y la fiabilidad de los tubos proporcionando una barrera de permeación a gases y vapor de agua, especialmente útil para tubos de

plástico.

La explicación expuesta anteriormente establece una variedad de métodos y dispositivos usados para formar redes de fibrina densa y plaquetas y láminas de fibrina sólida por centrifugación y coagulación simultáneas. Los dispositivos y métodos convencionales emplean centrifugación radial, en la que el eje del tubo puede estar alineado de forma sustancialmente perpendicular al eje de centrifuga. Por ejemplo, el tubo puede estar alineado en el radio de la centrífuga, y puede tener el tapón cerca del centro y la parte inferior del tubo hacia el borde exterior de la centrífuga. En la mayoría de las aplicaciones explicadas anteriormente, el coágulo se comprime durante el segundo ciclo de centrifugación. Como resultado, la fuerza centrífuga varía linealmente a lo largo de la longitud del tubo. La diferencia de fuerza centrífuga puede ser usada ventajosamente usando la velocidad diferencial de la centrífuga para activar adiciones de reactivos. Las centrífugas radiales son el tipo más común en uso comercial y sus usos flexibles son ventajosos para el diseñador de productos, especialmente en vista de su amplia disponibilidad.

Una lámina de fibrina sólida o red de fibrina-plaquetas puede hacer referencia a una sustancia formada por centrifugación y coagulación simultáneas de plasma o, más en concreto, plasma rico en plaquetas. Como se ha explicado anteriormente, la lámina de fibrina sólida es útil en aplicaciones ilimitadas de regeneración de tejidos. El fibrinógeno del plasma es convertido a hilos de fibrina y sedimentado simultáneamente con la sedimentación de plaquetas. En el paso final de la cascada de coagulación, los hilos de fibrina se entrecruzan en una orientación aleatoria, dando lugar a una coherencia análoga a gel. Si se aplica fuerza centrífuga muy alta, la fibrina se comprime formando una membrana de alta resistencia. Consiguientemente, una membrana puede hacer referencia a una lámina de fibrina sólida que se ha comprimido más a una fuerza centrífuga o gravitacional más alta (tal como las fuerzas aquí expuestas).

Sin embargo, una alternativa a la centrifugación radial es la centrifugación axial usada en la presente invención. Al usar centrifugación axial, el recipiente que contiene el líquido se gira sobre su eje central. En otros términos, el recipiente actúa en esencia como el rotor. Como resultado, es posible que ya no se necesite un rotor pesado en la centrífuga. El recipiente axialmente centrifugado puede ser en general de radio menor que un rotor radial, requiriendo por ello un número de rpm más alto para lograr una fuerza g equivalente. Por ejemplo, en lugar de centrifugar la centrífuga hasta 10.000 rpm, la centrífuga puede girar hasta 200.000 rpm. Aunque las rpm requeridas son más, la reducción significativa de peso minimiza el peligro para la seguridad y disminuye de forma desproporcionada el costo del motor. En otros términos, dado que el peso de la centrífuga se reduce de forma significativa debido a la extracción del rotor, la centrífuga puede girar a rpm mucho más altas.

Por lo general, la fuerza centrífuga es proporcional al radio multiplicado por la segunda potencia de rpm ( $\text{rpm}^2$ ). De hecho, con este método se pueden obtener fuerzas g significativamente más altas. Se obtienen zonas cilíndricas significativamente más grandes a intensidad de campo centrífuga muy uniforme. Dado que el recipiente es generalmente el rotor, la centrifugación axial emplea por lo general una sola operación de recipiente, más bien que un lote. Por lo tanto, aunque se usa un tubo pequeño y se gira alrededor de su eje, la membrana cubre más de la mayor parte del exterior del tubo. Más en concreto, el área superficial del cilindro cubierto puede ser definida como aproximadamente  $2\pi r l$ , donde r es el radio del cilindro y l es la longitud del cilindro. En contraposición, al usar centrifugación radial, el área superficial sería esencialmente el diámetro del tubo. Por lo tanto, la utilización de centrifugación radial produce una membrana igual a  $2\pi r l$ , mientras que la centrifugación axial produce una membrana igual a  $\pi r^2$ .

La centrifugación axial puede ser realizada de varias formas. Por ejemplo, se puede colocar diferentes cartuchos en un rotor existente modificado. Alternativamente, se puede quitar el rotor y se puede insertar un cartucho o recipiente desechable en su lugar. Típicamente, los sistemas usados en unión con centrifugación axial emplearán dos cámaras, a saber, una cámara de separación de células, en la que la sangre es separada en glóbulos rojos y plasma rico en plaquetas, así como una cámara de densificación, en la que el plasma rico en plaquetas contacta el activador de coagulación y es centrifugado y coagulado simultáneamente formando una membrana. De nuevo, la membrana puede ser usada en una amplia variedad de aplicaciones de regeneración de tejidos y sellado de heridas.

En una realización, se facilita un cartucho de rotor de tambor desechable estéril 200, como se representa, por ejemplo, en las figuras 19-20. El cartucho 200 se puede hacer de varios materiales, por ejemplo, una amplia variedad de cerámica, vidrios y plástico. Si no se indica específicamente, los dispositivos y sistemas hechos aquí se pueden fabricar a partir de una amplia variedad de cerámica, plástico, vidrios u otros materiales adecuados. El cartucho 200 puede tener en general la forma de una sección de corona circular adaptada de tal forma que se pueda montar dentro de un rotor de tambor de una centrífuga, aunque la forma es menos importante que el hecho de tener dos cámaras separadas por un dispositivo de filtración, como se explica a continuación. La forma de la sección es tal que posteriormente se pueda quitar para recuperación de la membrana rica en fibrina-plaquetas. En una realización, el cartucho 200 incluye una cámara interior 204 definida por una pared central 208, paredes laterales 212, una pared superior y otra inferior 216, 220 y un dispositivo de filtración 224. La cámara interior 204 actúa como la cámara de separación de células explicada anteriormente. La pared superior 216 puede tener un orificio de carga perforable 228 a través del que se puede introducir o inyectar sangre del paciente a la cámara interior 204. El dispositivo de filtración 224 se puede hacer de un filtro centrifugable selectivo (soportado mecánicamente), que acepte una cantidad discreta de sangre entera. El dispositivo de filtración 224 se puede hacer

de una amplia variedad de materiales incluyendo, aunque sin limitación, policarbonato, celulosa, polietileno, polipropileno, nylon, o TEFLON®. El filtro puede tener un tamaño de poro de 4-9 micras. La cámara interior 204 puede contener un anticoagulante 232, por ejemplo, uno o más de los anticoagulantes explicados anteriormente con respecto a los métodos y dispositivos de centrifugación radial. El anticoagulante 232 evita que la sangre que entre a la cámara interior 204 se coagule.

El cartucho 200 también tiene una cámara externa 236, que por lo general tiene un volumen menor que la cámara interior 204. La cámara externa 236 o depósito periférico se define por el dispositivo de filtración 224 y una pared periférica 240 así como las paredes superior e inferior 216, 220, como se representa en la figura 20. La cámara externa 236 puede incluir un activador de coagulación 244 tal como uno o más de los activadores de coagulación de calcio explicados anteriormente. La cámara externa 236 actúa como la cámara de densificación, en la que el plasma rico en plaquetas es activado con el activador de coagulación 244. Estas sustancias son centrifugadas y coaguladas simultáneamente para formar la membrana. La cámara de densificación 236 también puede contener uno o más agentes activos secundarios 248 o agentes mejoradores terapéuticos. Los agentes activos secundarios 248 incluyen, aunque sin limitación, uno o más antibióticos, analgésicos, agentes terapéuticos contra el cáncer, factores de crecimiento de plaquetas, proteínas morfogénicas óseas, células para terapia génica, células madre para usos adicionales, otras hormonas y combinaciones de los mismos. También se puede incluir otros agentes terapéuticos que puedan ser administrados. Los ejemplos de antibióticos incluyen, aunque sin limitación, ampicilina, eritromicina y tobramicina. Los analgésicos incluyen, aunque sin limitación, aspirina y codeína. Los agentes terapéuticos contra el cáncer incluyen, aunque sin limitación, 5-fluorouracilo. Los agentes secundarios pueden ser incluidos en cualquiera de las cámaras de densificación aquí explicadas, y más en concreto, más adelante. Los agentes activos secundarios o agentes mejoradores terapéuticos se han explicado con más detalle anteriormente.

En la operación, el cartucho 200 se inserta en el rotor de tambor (no representado) para centrifugación. La cámara interior 204 puede contener ya sangre, o se puede inyectar sangre a través del orificio 228 después de introducción en el rotor de tambor. La inyección de sangre a la cámara interior 204 puede ser realizada usando venipuntura estándar. En otros términos, la cámara interior 204 se puede mantener al vacío. Se puede utilizar un anticoagulante 232 usado en la cámara interior 204 para evitar que la sangre se coagule. El orificio 228 mantiene la esterilidad de la cámara interior 204, y proporciona un sistema cerrado. El rotor de tambor puede acomodar varios cartuchos diferentes. Por lo general, cada cartucho 200 se deberá equilibrar dentro del rotor poniendo un cartucho similar o un contrapeso equilibrador en el lugar opuesto dentro del rotor. Después de centrifugar la muestra de sangre, el filtro 224 retiene la red y los leucocitos en la cámara interior 204, pero deja que el plasma y las plaquetas fluyan a su través a la cámara externa 236 bajo fuerza centrífuga apropiada durante un tiempo predeterminado. La fuerza centrífuga apropiada será probablemente del rango de 1000-15.000 xg, y el tiempo predeterminado será probablemente superior a 5 minutos, y más en concreto puede ser de entre 5 y 60 minutos o de 5 a 30 minutos. Una vez que el plasma rico en plaquetas entra en la segunda cámara 236, el cartucho contacta el activador de coagulación 244.

Como se ha explicado aquí con respecto a esta realización y las realizaciones siguientes, cualquiera de los activadores de coagulación 244 expuestos anteriormente es adecuado para uso. Al contactar el activador 244, el plasma es centrifugado y coagulado simultáneamente, formando por ello una lámina de fibrina sólida o membrana. La provisión de un movimiento de mezcla del rotor puede ser útil para mezclar plenamente el plasma y el activador 244 con el fin de iniciar el proceso de coagulación. Después de la mezcla, el rotor puede girar a 3000 a 15000 xg durante más de 10 minutos, y más en concreto más de 20 minutos para obtener una membrana rica en fibrina-plaquetas resistente deseada en la pared periférica 240 de la segunda cámara 236. Para extraer la membrana del cartucho 200, el dispositivo se puede abrir en dos partes con el fin de sacar la membrana para la aplicación. Alternativamente, una de las paredes puede tener una porción extraíble u otra zona de acceso a través de la que se pueda obtener la membrana. Otras formas de sacar la membrana del cartucho incluyen hacer rodar y plegar la membrana. Para fines sanitarios, el cartucho 200 puede ser desechable. La membrana tiene una amplia variedad de aplicaciones incluyendo, aunque sin limitación, el cuidado de heridas y el cuidado de quemaduras. Más en general, la membrana puede ser usada en un número ilimitado de aplicaciones de regeneración de tejidos.

En otra realización de la invención, conocida como la gran rotación axial, se puede obtener membranas, por ejemplo, membranas de hasta 1000 mm de diámetro, aunque sin limitación. Las figuras 21-25 muestran esta realización. El tamaño de la membrana puede depender del tamaño del rotor. Consiguientemente, el tamaño de la membrana puede depender de qué rotores estén disponibles en el mercado. En esta realización, ambas operaciones de centrifugación primaria y secundaria, explicadas anteriormente con respecto a los métodos y dispositivos de centrifugación radial, son realizadas en un recipiente de rotación axial. La cámara secundaria puede estar dividida para obtener múltiples membranas discretas de gran área. Esta división se explica con más detalle más adelante.

Este sistema incluye una centrífuga (no representada) y un dispositivo 252 para centrifugación radial, que puede estar insertado en ella y que se representa en las figuras 21-25. El dispositivo 252 tiene dos cámaras, a saber, una cámara primaria o superior 256 y una cámara secundaria o inferior 260 en comunicación de fluido una con otra. La cámara primaria o superior 256 actúa como la cámara de separación de células, mientras que la cámara secundaria o inferior 260 actúa como la cámara de densificación. El dispositivo 252, como se representa en las figuras 21-25,

también incluye un diafragma 264 en el que se ha definido al menos una abertura, agujero o agujero de ventilación. El diafragma 264 separa las dos cámaras 256, 260. La abertura, agujero o agujero de ventilación 268 proporciona comunicación de fluido entre la cámara primaria 256 y la cámara secundaria 260. El diafragma 264 se puede hacer, por ejemplo, de plástico, cerámica o vidrio.

5 La cámara primaria 256 puede contener un medio de separación 272. Se puede usar alguno de los medios de separación 272 explicados anteriormente en unión con el sistema, aunque los ejemplos específicos de medios de separación 272 pueden incluir al menos uno de geles de silicona, geles de poliéster, geles tixotrópicos y sus combinaciones. Más específicamente, el agujero o agujeros de ventilación 268 del diafragma 264 se pueden cerrar con el medio de separación 272 (por ejemplo, un gel) en una cantidad suficiente para bloquear el agujero o agujeros de ventilación 268 y realizar la separación de los glóbulos rojos del plasma después de una primera centrifugación. La cámara primaria 256 recibe sangre entera del paciente, generalmente a través de tapón perforable 276 u otro dispositivo adecuado tal como un tapón roscado recubierto, análogo a un tapón de botella. En las figuras 21-25, el sistema se representa con un tapón perforable 276 a través del que se puede introducir sangre en la cámara superior 256. La cámara primaria 256 también puede contener un anticoagulante 232. La cámara 256 también puede estar rarificada para permitir la recogida al vacío del espécimen por venipuntura estándar. La cámara secundaria 260 puede contener un activador de coagulación 244, y puede contener uno o más de los agentes activos secundarios 248 explicados anteriormente.

20 Después de recoger sangre 280 en la cámara superior 256 como se representa en la figura 22, el dispositivo 252 es centrifugado axialmente a la fuerza g apropiada para llevar a cabo la separación de células, a saber, separación de glóbulos rojos 288 del plasma rico en plaquetas 284. Las fuerzas g típicas usadas para llevar a cabo la separación de células pueden incluir de 500 a 15.000 xg durante un tiempo predeterminado, tal como, más de 5 minutos. Preferiblemente, la centrifugación inicial tiene lugar a 1000-1500 xg durante 5 a 15 minutos. Esto se aplica a todas las realizaciones pertenecientes a membranas aquí expuestas. La centrifugación inicial mueve el medio de separación 272 de su posición de bloqueo de los agujeros de ventilación 268 a la interfaz. Por ejemplo, un gel tixotrópico 272 puede mantener la separación de las dos cámaras 256, 260 durante el llenado de la cámara primaria 256 con sangre 280, pero se moverá durante la centrifugación inicial para realizar la separación de células y abrirá el recorrido de fluido de conexión para separar las dos cámaras 256, 260. El gel 272 fluye radialmente, hacia fuera y hacia arriba de modo que el gel 272 no caiga a la cámara inferior 260. El resultado de la centrifugación inicial se representa en la figura 23. Debido a las densidades relativas del plasma rico en plaquetas 284, el medio de separación 272 y los glóbulos rojos 288, la centrifugación pondrá estas tres sustancias en el orden previamente indicado desde el interior de la cámara primaria 256 al exterior de la cámara primaria 256 como se representa en la figura 23. En las figuras, y en el sentido en que se usa aquí, PRP significa plasma rico en plaquetas y RBC significa glóbulos rojos.

Posteriormente se para la centrifugación inicial, cuyo resultado se representa en la figura 24. Al terminar la centrifugación, el plasma rico en plaquetas 284 se drena a través de los agujeros de ventilación 268 por gravedad a la cámara inferior 260, donde se mezcla con el activador de coagulación 244 y los agentes activos secundarios 248 si los hay. Sin embargo, el medio de separación 272 permanecerá en posición, evitando por ello que los glóbulos rojos 288 entren en la segunda cámara 260 a través de los agujeros de ventilación 268. Los agujeros de ventilación 268 pueden tener forma de embudo para asegurar que la fuerza g ejercida haga que todo el plasma rico en plaquetas 284 fluya a la cámara de densificación secundaria 260.

45 Como se representa en la figura 25, la centrifugación se reinicia a la fuerza g apropiada, por ejemplo, de 500-15.000 xg, y se forma una membrana grande 292 en la circunferencia exterior de la cámara inferior 260. Preferiblemente, la centrifugación tiene lugar a 2500 a 10.000 xg durante 20 minutos aproximadamente a una hora dependiendo de la densidad de la membrana que se pretenda lograr. Esto se aplica a todas las realizaciones usadas para la formación de membrana aquí expuestas. Se deberá indicar que el medio de separación 272 y los glóbulos rojos 288 tienden a permanecer en la misma posición durante la centrifugación secundaria. Este sistema permite la centrifugación y la coagulación concomitantes, lo que da lugar a la membrana de plaquetas/fibrina grande 292. El dispositivo 252 también tiene una parte inferior 294, que puede ser extraíble, permitiendo por ello que la membrana se extraiga fácilmente del dispositivo.

55 Los sistemas y dispositivos siguientes son variaciones del sistema comparativo básico representado en las figuras 21-25. Por ejemplo, la cámara de separación de células o primaria 256 puede tener un radio diferente de la cámara de densificación o secundaria 260. Como se representa con más detalle en la figura 26, los radios de las cámaras superior e inferior pueden ser diferentes, lo que permite ejercer diferentes fuerzas g en la pared circunferencial. En consecuencia, las rpm producen dos fuerzas g diferentes, simplificando por ello el motor y la programación. Más en concreto, la provisión de las cámaras con radios diferentes elimina la necesidad de múltiples programas de velocidad debido a la fuerza g a las mismas rpm.

Las figuras 27-30 muestran una variación del sistema expuesto en las figuras 21-25, en la que se usan cilindros concéntricos. El sistema 296 incluye un tubo primario 300 que tiene una porción superior 304 separada de una porción inferior 308 por un diafragma u otro separador 309. El tubo primario 300 actúa como la cámara de separación de células. Al menos un agujero de ventilación, agujero o abertura 312 realiza la comunicación de fluido

- entre las porciones superior 304 e inferior 308 del tubo primario 300. De nuevo, se puede introducir sangre al tubo primario 300 a través de uno o más tapones perforables 316 u otro dispositivo adecuado explicado anteriormente. El tubo primario 300 puede contener un anticoagulante 232 para evitar la coagulación prematura de la sangre. Un medio de separación 272 evita que la sangre fluya desde la porción superior 304 del tubo primario 300 a la porción inferior 308 a través de al menos un agujero de ventilación 312. La porción inferior 308 también puede tener vacíos, agujeros o aberturas 310, a través de los que pueda fluir un líquido. La densificación del plasma rico en plaquetas 284 tiene lugar en un tubo concéntrico secundario 320. El tubo secundario 320 puede contener uno o varios activadores de coagulación 244 explicados anteriormente y/o uno o más agentes activos secundarios.
- 5
- 10 Inicialmente, la centrifugación del sistema separa la sangre en plasma y glóbulos rojos, que son separados por el medio de separación explicado anteriormente y representado en la figura 28. La centrifugación inicial tiene lugar por lo general a más de 1000 xg durante más de 10 minutos aproximadamente. Una vez parada la centrifugación, como se representa en la figura 29, el plasma rico en plaquetas 284 caerá a la porción inferior 308 del tubo primario 300 a través del único o los varios agujeros de ventilación 312, y los glóbulos rojos 288 quedarán atrapados en la porción superior 304 del tubo primario 300 por el medio de separación 272. Se facilita al menos un vacío 310 en la pared de la porción inferior 308 del tubo primario 300. El sistema se centrifuga posteriormente como se representa en la figura 30, dando lugar por ello a que al menos una porción del plasma rico en plaquetas 284 salga de la porción inferior 308 a través de los vacíos 310 del tubo primario 300 y que entre en el tubo secundario 320. De nuevo, los glóbulos rojos 288 permanecerán atrapados por el medio de separación 272 en la porción superior 304 del tubo primario 300. Como se representa en las figuras 27-30, el tubo secundario contiene al menos un activador de coagulación 244, con el que el plasma rico en plaquetas 284 entrará en contacto. En consecuencia, esta variación también realiza la coagulación y la centrifugación concomitantes, que forman la membrana 292. Esta variación permite una unidad más compacta y reduce el uso de plástico. El dispositivo 296 también puede tener una parte inferior extraíble 324 para facilitar la extracción de la membrana.
- 15
- 20
- 25 Como otra alternativa, se puede emplear una membrana hidrófoba 325 en lugar de un medio de separación. La membrana hidrófoba 325 puede ser usada en lugar de cualquiera de los sistemas que usan un medio de separación. La membrana hidrófoba 325 solamente permite el flujo del plasma rico en plaquetas a una fuerza g establecida, eliminando la necesidad de un medio de separación. En otros términos, en lugar de usar un diafragma que tenga agujeros bloqueados por gel, se puede usar una membrana hidrófoba como se representa en las figuras 31-32. Al usar una membrana, la cámara inferior y la cámara superior pueden tener los mismos radios representados en la figura 21, o las dos cámaras pueden tener radios diferentes, de los que se representa un ejemplo en la figura 26. Además, la membrana hidrófoba se puede aplicar al diseño concéntrico representado en la figura 27.
- 30
- 35 La membrana hidrófoba 325 evita sustancialmente que un líquido acuoso, tal como plasma rico en plaquetas, fluya a través de sus poros hasta que se alcance una presión hidrostática establecida. Los ejemplos de membranas hidrófobas 325 pueden incluir, aunque sin limitación, polipropileno, policarbonato, celulosa, polietileno, TEFLON® de Dupont y sus combinaciones. Otros ejemplos incluyen membranas y tamices Millipore® fabricados por Millipore, o membranas y tamices Nucleopore® fabricados por Nucleopore. Alternativamente, también se podría usar un diafragma de plástico que tenga agujeros de precisión perforados con un láser. Al usar una membrana hidrófoba, se puede introducir sangre a la cámara de separación de células, pero no caerá a la cámara de densificación. La presión hidrostática apropiada se puede lograr separando primero los glóbulos rojos del plasma a bajas rpm. Posteriormente, la tasa de centrifugación se incrementa para lograr la presión deseada para superar las limitaciones de energía superficial/tensión superficial que definen la presión de flujo. En otros términos, la fuerza gravitacional aumentará con la tasa de centrifugación, lo que dará lugar a que el plasma rico en plaquetas fluya a través de la membrana, pero no los glóbulos rojos. La membrana bloqueará sustancialmente los glóbulos rojos.
- 40
- 45
- 50 Otra modificación de los sistemas anteriores incluye cambiar la configuración de la cámara secundaria o de densificación de cualquiera de las realizaciones aquí explicadas. Estas cámaras de densificación modificadas pueden ser usadas en sistemas, donde las cámaras primaria y secundaria tienen los mismos radios o diferentes, donde las cámaras son concéntricas, y/o donde se usa un medio de separación o membrana hidrófoba. Las cámaras de densificación pueden tener diferentes paredes interiores que faciliten la extracción de la membrana, y aseguren la mayor recuperación de la membrana. Por ejemplo, la cámara de densificación puede contener una tela biodegradable tejida (tal como Goretex® fabricado por Goretex) que mejora la resistencia al rasgado de la membrana para la colocación inicial en el cuerpo, y que más tarde se disolverá. La pared exterior de la cámara también puede contener abombamientos o ranuras moldeados que soporten la tela alejándola de la pared a una longitud uniforme para lograr un grosor de fibrina y plaquetas de la dimensión deseada en ambos lados de la tela.
- 55
- 60 Más en concreto, como se representa en la figura 39, la pared interior o lateral de la cámara de densificación 318 puede incluir uno o más nervios sólido o dentados 319 para permitir la extracción de la membrana en forma de hojas planas más bien que como un cilindro. Los nervios perforados facilitan la aireación de la membrana. La pared interior de la cámara puede estar configurada para proporcionar perforaciones en la membrana resultante para facilitar el rasgado. La figura 39 representa una vista en planta inferior de uno o más nervios sólidos de la pared interior.
- 65

La figura 33 ilustra una tela biocompatible tejida 328 que puede estar en el interior de una cámara de densificación 326. Tal trama mantiene la membrana 292 lejos de la pared propiamente dicha. La tela 328 facilita la separación de las membranas del cilindro para obtener una membrana plana e incrementa la resistencia al rasgado de la membrana para algunas aplicaciones. La tela 328 se incrusta en la membrana 292. Además, se puede moldear abombamientos 332 o ranuras 340 en la pared 336 de la cámara 326 para controlar el grosor de la capa de fibrina a ambos lados de la tela, como se representa en la figura 34 y la figura 35, respectivamente. Estos actúan como pequeños nervios de soporte que mantienen la tela espaciada de la pared. En resumen, la figura 33 representa la tela 328 propiamente dicha impidiendo que la membrana se adhiera a la pared 336; la figura 34 representa abombamientos 332 en la pared 336 que facilitan la extracción de la membrana 324; y la figura 35 representa ranuras o nervios de soporte moldeados 340 que mantienen la membrana 292 lejos de la pared. Las paredes que tienen abombamientos 332 o ranuras 340 también se pueden emplear independientemente de la tela 328.

Alternativamente, como se representa en la figura 36, la cámara de densificación puede estar recubierta con una película extraíble 344 para facilitar la extracción de la membrana 292. La película 344 puede incluir plástico tal como poliolefinas que incluyen polietilenos, polipropilenos, policarbonatos o TEFLON®. La película 344 puede tener lengüetas 348 para fácil manipulación, y puede ser de color para ayudar a separar la membrana 292 de la película 348. Además, la película 348 puede ser tratada para obtener propiedades deseables, tal como activación por contacto cristalino. Maniobrando las lengüetas 348, se puede quitar toda la película 344 que tiene la membrana 292 encima. Por ejemplo, la cámara de densificación 326 puede estar recubierta con una película tratada que proporcione tanto la activación de plaquetas para coagulación y liberación de factor de crecimiento como la fácil manipulación de la membrana. Alternativamente, el PRP o PPP puede fluir a través de un túbulo de alta energía superficial para activar el PRP o PPP para coagulación, lo que permite usar un adhesivo de coagulación rápida como una capa de sellado o adhesiva de fibrina.

Considerando otras superficies en las cámaras, las superficies de plástico pueden funcionar, pero pueden no ser ideales para activación de coágulos y liberación de factores de crecimiento de plaquetas. Como resultado, se esbozan alternativas al plástico en la figura 50 y 51. Por ejemplo, el plasma rico en plaquetas puede contactar vidrio en la cámara inferior. En otros términos, se podría fijar vidrio al tapón inferior como se representa en la figura 50, o se puede encolar o clavar en caliente esferas de vidrio en la parte inferior como se representa en la figura 51. El vidrio también se podría calentar y depositar sobre el plástico. Alternativamente, la superficie puede ser tratada con plasma usando procesos de descarga luminosa que emplean gases de activación tales como oxígeno u óxido nítrico. Más en concreto, la superficie se podría tratar usando deposición química al vapor mejorada con plasma. Alternativamente, la superficie puede ser modificada usando una variedad de recubrimientos químicos, por ejemplo, surfactantes de silicio o PVPyr. Otra manera de modificar el plástico es poner perlas o partículas de sílice de pequeñas dimensiones en la solución de citrato en la cámara superior. Debido a la alta densidad del sílice en relación al gel y los glóbulos rojos, la mayor parte del sílice permanecerá en la cámara superior o debajo del gel o incrustado en él. Consiguientemente, estas modificaciones del plástico pueden ser usadas para recubrir porciones de los sistemas, y más en concreto, porciones de las cámaras de densificación de cualquiera de las realizaciones aquí expuestas.

En un aspecto diferente, la invención permite la producción de membranas de fibrina rica en plaquetas de forma cuadrada a usar en unión con el cuidado de heridas, que explota las características mitogénicas de las plaquetas y proporciona factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) y beta-tromboglobulina (BTG), y acción protectora de una película de fibrina sólida. Los factores de crecimiento, BTG, el Factor 4 de plaqueta (PT4) y la trombospondina son factores que pueden mejorar la proliferación de células en la lámina de fibrina sólida. Más en concreto, la acción protectora incluye el entorno microaerófilo, actividad antiséptica y actividad de separación. El dispositivo, que puede ser usado para llevar a la práctica la centrifugación y la coagulación concomitantes, incluye un dispositivo médico rotor representado en la figura 38. El dispositivo incluye un cartucho desechable 352, que se puede hacer de plástico o algún otro material adecuado. De nuevo, las técnicas de modificación de plástico explicadas anteriormente se aplican a cualquiera de las realizaciones aquí expuestas. El cartucho cilíndrico tiene dos cámaras concéntricas, a saber, una cámara interior 356 y una cámara exterior 360.

La cámara interior 356 es cilíndrica y está definida por una pared de filtración interior 364 como se representa en las figuras 38 y 39. Cualquiera de los filtros o dispositivos de filtración aquí explicados son adecuados para uso con esta realización. La cámara interior 356 tiene un extremo superior 368 y un extremo inferior 372, en cada uno de los cuales va montado un eje de rotor 376. El eje de rotor 376 permite insertar y usar el cartucho 352 en una centrífuga (no representada). Al menos uno de estos extremos 368, 372 de la cámara interior 356 puede tener un orificio o agujero adecuado 380 a través del que se puede introducir o inyectar sangre del paciente. Como se ha explicado anteriormente, en una realización, la cámara interior 356 se puede mantener al vacío con el fin de facilitar la venipuntura estándar. La cámara interior 356 puede contener un anticoagulante 232 para evitar que se coagule la sangre que entre en ella. La cámara interior 356 actúa como la cámara de separación de células. La pared de filtración interior 364 es un filtro selectivamente centrifugable (mecánicamente soportado), que aceptará una cantidad discreta de sangre entera. La actividad de filtración de la pared de filtración evita sustancialmente que glóbulos rojos y leucocitos fluyan a su través. Sin embargo, el filtro permite que plasma y plaquetas fluyan a su través a la segunda cámara 360 cuando se ejerza una fuerza centrífuga predeterminada, por ejemplo, superior a 1000 xg durante un tiempo predeterminado, por ejemplo, más de 10 minutos.

5 La segunda cámara 360 se define por una pared externa 384, la pared de filtración interna 364 así como paredes superior e inferior. La segunda cámara externa 384 puede contener uno o más activadores de coagulación 244 así como uno o más agentes activos secundarios 248 explicados anteriormente. La segunda cámara 360 actúa como la cámara de densificación. Como se representa en las figuras 38-39, las cámaras interna y externa 356, 360 son concéntricas.

10 En la operación, después de introducir sangre en la cámara interior 356, el dispositivo 352 es centrifugado. Como se ha explicado anteriormente, la centrifugación tiene lugar a una fuerza predeterminada durante un tiempo predeterminado de tal manera que la sangre se separe en plasma y glóbulos rojos. De nuevo, la pared de filtración 364 permite que el plasma rico en plaquetas pase a su través, mientras que los glóbulos rojos obstruyen el filtro. Al pasar a través del filtro 364, el plasma contacta el activador de coagulación 244 y/o el agente activo secundario 248, dando lugar por ello a coagulación y centrifugación concomitantes, y la formación de la membrana. Para mejorar la coagulación, puede ser útil realizar un movimiento de mezcla. La centrifugación que tiene lugar después de que el plasma ha entrado en la segunda cámara tiene lugar por lo general a 1500 a 15.000 xg durante más de 10 minutos con el fin de obtener una membrana rica en fibrina-plaquetas resistente deseada. La membrana puede ser usada en cualquiera de las aplicaciones de regeneración de tejidos aquí expuestas, pero puede ser especialmente útil en unión con el cuidado de heridas o quemaduras.

20 En la porción interior de la cámara externa 360 puede haber una o más varillas 388 para que la membrana pueda ser aspirada verticalmente desde la parte superior del dispositivo. Toda la explicación relativa a la superficie de la cámara de densificación se aplica aquí a la cámara exterior 360 (por ejemplo, usando tejidos, abombamientos, ranuras, etc). Además, la explicación relativa a la modificación de superficies de plástico también se aplica aquí. La membrana puede ser extraída rompiendo el dispositivo o abriéndolo en dos partes. Típicamente, por razones sanitarias, el dispositivo es desechable. El dispositivo realiza operaciones inocuas y proporciona condiciones seguras y estériles.

30 Otro aspecto de la invención se refiere a métodos, así como modificaciones de los métodos anteriores, que pueden ser usados para formar redes de fibrina y plaquetas de alta densidad moldeadas por centrifugación axial. Este aspecto también se refiere a un método para dividir líquido dosificado en múltiples alícuotas para moldeo simultáneo de múltiples redes. La eficacia clínica y la facilidad de uso de redes de fibrina autóloga y plaquetas se han explicado anteriormente. Hay varias aplicaciones clínicas para la regeneración de tejido blando (por ejemplo, reparación del menisco de la rodilla), en la que es deseable formar la red o las membranas explicadas anteriormente en una forma específica antes del implante. En el caso de cartilago de menisco, la forma ideal sería una forma de cuña semicircular, similar a una sección de naranja, que puede ser usada para sustituir un menisco severamente dañado. Las plaquetas presentes proporcionarían la necesaria vascularización para regeneración del tejido y la fibrina proporcionaría un amortiguamiento absorbible para soporte de carga.

40 Las prácticas corrientes de reparación de tejido blando, tal como cartilago, permiten tratar solamente el veinte por ciento de los casos. Frecuentemente, en el resto de los casos, el tejido blando se ha quitado permanentemente y el paciente padece una movilidad deteriorada. Este síndrome es evidente en atletas profesionales y es de gran interés en medicina deportiva. Hay disponibles materiales sintéticos a formar a modo de andamio para que crezca un nuevo tejido, pero tienen las desventajas de producir respuesta inmune adversa y poco éxito debido a la falta de vascularización. Un método exitoso permitiría dividir el plasma rico en plaquetas en volúmenes controlados para formar simultáneamente múltiples formas y configuraciones usadas para un procedimiento dado.

50 El sistema de moldeo incluye una cavidad formada definida por una forma de una parte deseada en el punto máximo de la fuerza centrífuga en cualquiera de los recipientes de centrifugación explicados anteriormente. La cavidad se puede definir en la pared cilíndrica del recipiente que sea centrifugado axialmente. La figura 40 representa ejemplos de un molde orientado para uso en una centrifugación radial como se representa en la figura 40(a) y un molde orientado para uso en una centrifugación axial como se representa en la figura 40(b). El molde puede ser integral con el recipiente o puede ser una parte separada conectada, acoplada, extendida o añadida al recipiente como se representa en las figuras 43-46. La cavidad, si no es integral, puede ser de diseño dividido para permitir el moldeo de formas complejas y permitir una extracción fácil. La cavidad también puede contener un elemento de embudo para dirigir el flujo de la mezcla de fibrina/plaquetas a la cavidad, como se representa en la figura 41. Más en concreto, la figura 41 representa un molde 392 que tiene un embudo 396 que conduce a un canal 400 que permite que una sustancia lleve información a la cavidad 404. La zona en sección transversal de la abertura de embudo 396 determinará la cantidad relativa de concentración de los monofilamentos de fibrina/plaqueta. Un canal 400 también puede estar conectado al embudo 396 y la cavidad 404 como se representa en la figura 41, permitiendo por ello el flujo directo a la cavidad 404 y minimizando cualquier recorte de la parte moldeada. Como se representa en la figura 42, también se puede incluir en el bastidor de molde 392 agujeros de ventilación o pasos 408 para permitir que salga de la cavidad 404 el gas y/o líquido producidos por el desplazamiento de la fibrina entrante. En otros términos, los agujeros de ventilación 408 permiten la liberación de gases y líquidos.

65 En procedimientos que requieren múltiples implantes, en particular los que requieren diferente volumen y densidad, uno de los dispositivos de centrifugación axial explicados anteriormente puede estar dividido en volúmenes

controlados por inclusión de paletas verticales en la parte inferior, como se representa en las figuras 43-47. En otros términos, se puede emplear uno de los dispositivos explicados anteriormente, por ejemplo, una realización de cámara concéntrica, pero se usan múltiples cavidades en cada recipiente de centrífuga para proporcionar simultáneamente objetos de formas múltiples. Las cantidades relativas de plasma rico en plaquetas a enviar a cada molde en el diseño de rotación axial se pueden obtener incluyendo paletas verticales 412, como se ilustra en las figuras 43-47. Las paletas 412 se pueden extender la altura del dispositivo aunque no tienen que hacerlo, y sobresalir hacia el eje central pero no tocarlo, permitiendo por ello el flujo libre del plasma rico en plaquetas entre los volúmenes definidos por las paletas.

La figura 44 es una vista en planta superior que representa paletas B1 y B2. Las paletas B1 y B2 no se tocan, y el agujero de ventilación 416 permite la conexión de fluido entre las cámaras W1 y W2 cuando el fluido es añadido en primer lugar y la centrífuga está en reposo. El área en sección transversal de las cámaras W1 y W2 puede ser proporcional al volumen del fluido a enviar a cada molde. El nivel de líquido, inicialmente en reposo, es igual en todos los compartimientos, así los volúmenes relativos son proporcionales al área en sección transversal definida por la colocación de las paletas. Consiguientemente, la colocación de las paletas determinará el volumen en cada compartimiento. En consecuencia, se puede emplear "trozos" más grandes para más moldes profundos.

Una vez centrifugado, el volumen en cada compartimiento avanza radialmente al molde deseado. La figura 45 ilustra un dispositivo de tres cámaras que tiene "trozos" desiguales. La figura 47 representa un dispositivo de tres cámaras con cada molde 420 puesto en un radio diferente, sometiendo por ello el contenido de cada molde 420 a fuerza g proporcional al radio. El número de cámaras dependerá de la aplicación concreta. Los materiales formados tendrán diferentes densidades dependiendo del radio del molde 420. La figura 46 representa moldes en tres posiciones diferentes, a saber, integrales, conectados y extendiéndose desde el dispositivo. La colocación del molde afecta a la densidad de la membrana resultante. Dado que el volumen relativo de cada alícuota y la posición de las cavidades están predeterminados, se puede añadir contrapesos moldeados para lograr el equilibrio apropiado. Un ejemplo de una aplicación útil de esta característica sería el moldeo de una membrana a alta densidad y una pasta de baja densidad.

En la operación, se añade plasma rico en plaquetas a un recipiente, tal como los explicados anteriormente, o se prepara añadiendo sangre entera a una cámara de preprocesado y transfiriendo el plasma rico en plaquetas a un segundo recipiente conteniendo un activador de coagulación adecuado. El recipiente se coloca rápidamente en la centrífuga y gira a la fuerza g deseada requerida para la aplicación. Esto realiza la centrifugación y la coagulación concomitantes. El cordón de fibrina y plaquetas sedimenta rápidamente hacia la cavidad y la llena. Los hilos de fibrina se entrecruzan entonces formando una red estable. A la extracción de la centrífuga, la parte moldeada se puede quitar y recortar el excedente. Para formas más complejas se puede emplear un molde de cavidad dividida. Como se ha explicado anteriormente y se representa en la figura 41, se puede emplear un preprocesador de tunelación en el diseño para minimizar el volumen de sangre requerido y para aumentar la eficiencia. También se puede incluir canales y agujeros de ventilación representados en las figuras 41-42 para asegurar el llenado completo de la cavidad y para facilitar el manejo de formas complejas, de forma en gran parte análoga al sistema de canales que se emplea en kits de modelo de plástico para practicantes de hobbies.

Las figuras 47-49 muestran vistas en sección transversal del dispositivo durante la operación. La figura 47 representa el dispositivo en reposo; la mezcla de plasma rico en plaquetas 284 y el activador de coagulación 244 fluye entre las cámaras hasta que se logra una superficie de fluido nivelada y el fluido se divide adecuadamente entre las cámaras. La figura 48 representa el dispositivo cuando la centrífuga arranca; el líquido forma una forma de torbellino por la rotación axial. Durante la centrifugación, las paletas 412 evitan la comunicación entre los canales y por ello mantienen la apropiada dispensación a cada molde. Las paredes 428 pueden estar ahusadas hacia el molde para que actúen como embudos de concentración. Cuando la velocidad de la centrífuga y la fuerza g resultante aumentan, el torbellino parabólico aumenta hasta que todo el fluido es transferido a los moldes. La figura 49 representa el dispositivo en centrifugación plena, punto en el que los moldes se llenan.

Este sistema también se puede usar para plasma pobre en plaquetas (PPP) para formar sustancias incluyendo fibrina. En otros términos, puede ser usado en aplicaciones que no requieren plaquetas. El plasma pobre en plaquetas se puede formar centrifugando un primer tubo a una fuerza g más alta, por ejemplo, superior a 5.000 xg, en lugar de 1.000 xg. Además, el diseño puede ser usado para formación no autóloga de la red deseada de fibrina o fibrina/plaqueta en casos donde se haya establecido la idoneidad del donante y del receptor.

Por lo general, los moldes proporcionan la compatibilidad completa y autóloga del paciente. Como resultado, la red de fibrina-plaquetas se puede formar en formas y densidades moldeadas exactas. Se puede formar múltiples formas simultáneamente, tal como el menisco izquierdo y derecho de la rodilla. Además, un martillo, yunque y estribo de moldeo para el oído interno se puede hacer usando estos moldes, así como un manguito rotador para el hombro. Además, también se puede formar cartílago del codo, partes del epicondilo, partes de los dedos, cartílago del tarso y carpo. La membrana o red formada también es absorbible, estable y tiene factores de crecimiento para mejorar la curación. Para aplicaciones de múltiples formas, la densidad de las partes puede variar el establecimiento el radio del molde.

Otro aspecto de la invención se refiere a dispositivos y métodos para controlar la distribución de plaquetas en una red de fibrina/plaquetas utilizando sedimentación centrífuga diferencial. La eficacia clínica y la facilidad de uso de las redes de fibrina autóloga y plaquetas se han explicado anteriormente. La fibrina proporciona estasis de la herida y un medio para el crecimiento celular y la movilidad. Las plaquetas, aunque contribuyen inicialmente a la estasis de la herida, también contienen varios agentes antiinflamatorios, de crecimiento y vascularización. Como tal, en muchos procedimientos terapéuticos es beneficioso concentrar la posición de las plaquetas en el continuo de fibrina. Por ejemplo, en el caso de heridas crónicas, una concentración de plaquetas en el lado de una membrana que contacte la herida aumentaría la adhesión de la membrana a la herida y aumentaría la vascularización de la capa subdérmica. Para reparación del menisco, puede ser beneficioso concentrar las plaquetas en la región exterior del menisco formado, a saber, la "zona roja", para aumentar la vascularización de esta región. Para cemento óseo, puede ser preferible que las plaquetas estén distribuidas uniformemente por todo el continuo. En consecuencia, este aspecto de la invención proporciona una manera por la que colocar preferentemente plaquetas en una matriz de fibrina usando fuerza centrífuga.

Las plaquetas sedimentan en función de la fuerza g mientras que la formación de fibrina prosigue a una velocidad independiente de la fuerza g. Más en concreto, las plaquetas sedimentan a velocidad constante, y como resultado, las plaquetas se depositan a una velocidad constante hasta que todas se hayan sedimentado. Las plaquetas se distribuyen uniformemente por todo el plasma rico en plaquetas. Cuando el plasma se somete a una fuerza gravitacional, las plaquetas sedimentan a una velocidad constante, aumentando la velocidad con la fuerza gravitacional creciente. El tiempo hasta completar la sedimentación es proporcional a la altura del plasma rico en plaquetas que las plaquetas superiores deben atravesar. Así, para una columna de plaquetas de 100 mm de alto, el tiempo de terminación de la sedimentación es aproximadamente 5 minutos a 6000 xg o 15 minutos a 2000 xg.

Por otra parte, se forman monómeros de fibrina a una tasa independiente de la fuerza gravitacional. En pacientes normales, este proceso se completa en treinta minutos aproximadamente. Así, los métodos aquí expuestos resuelven el problema de desarrollar un perfil de fuerza centrífuga que acomode las dos tasas de sedimentación diferentes, dando lugar por ello a una posición preferente de las plaquetas dentro de la red. La posición preferente de las plaquetas optimiza la regeneración del tejido para adaptarla a cada aplicación concreta, proporcionando una curación más rápida y tasas de éxito más altas del procedimiento. El método de colocar preferentemente las plaquetas implica ajustar la fuerza g durante el proceso de sedimentación para tener en cuenta la diferencia de las tasas de sedimentación de las plaquetas y la formación y posterior sedimentación de la fibrina.

En un ejemplo, el plasma rico en plaquetas puede exponerse al activador de coagulación, y luego centrifugarse inmediatamente a 4000 a 6000 xg. Consiguientemente, las plaquetas sedimentarán rápidamente en 5 a 10 minutos y luego estarán en capas encima con la fibrina que se forma en los 25-35 minutos posteriores. La estructura resultante tendrá las plaquetas concentradas en la superficie que se formó inicialmente y disminuirá en las capas formadas más tarde. Esta aplicación es especialmente ventajosa para reparación de menisco y heridas crónicas.

En otro ejemplo, el plasma rico en plaquetas puede exponerse al activador de coagulación, y luego centrifugarse inmediatamente a más de 2000 xg. La sedimentación de plaquetas y la formación de fibrina pueden proseguir a tasas equivalentes. Consiguientemente, la red resultante tiene plaquetas uniformemente distribuidas por toda la red. Esta aplicación es especialmente ventajosa para cemento óseo y para crecimiento de tejidos blandos en periodontología.

En otro ejemplo, el plasma rico en plaquetas puede exponerse al activador de coagulación y centrifugarse inmediatamente. Sin embargo, la velocidad de centrifugación se cicla entre tasas alternativas de 1-2 minutos aproximadamente a 4000-6000 xg, luego de 5-10 minutos aproximadamente a 1000-2000 xg. La iteración puede ser realizada 5-10 aproximadamente, dando lugar a una estructura emparedada que tiene 10-20 capas distintas de plaquetas de concentración alta y baja alternas. Esta aplicación es especialmente ventajosa para reparación de cartílago de articulaciones, que evita que los huesos rocen unos con otros.

En consecuencia, el control de la tasa a la que el plasma rico en plaquetas y el activador de coagulación son centrifugados, así como la duración de la centrifugación, da lugar a una posición preferente de las plaquetas. El control de la posición de las plaquetas optimiza la regeneración de tejido dependiendo de la aplicación concreta, proporcionando por ello una curación más rápida y tasas de éxito más altas del procedimiento.

La figura 56 representa otra realización del diseño del molde. El inserto moldeado 424 se hace por lo general de un plástico o material de caucho. El inserto se introduce en un recipiente 426 y se puede sacar de él, como se representa en la figura 56. Una vez que el plasma rico en plaquetas está situado en un recipiente 426, se le puede añadir un activador de coagulación. Alternativamente, un activador de coagulación puede estar ya presente en el plasma a la introducción. El inserto tiene paletas 428 similares a las de las figuras 42-49. Las paletas 428 sobresalen con el fin de definir cámaras 430 en las que se puede moldear o formar una membrana a la centrifugación. En otros términos, las paletas dejan un espacio entre un núcleo 432 del inserto y el recipiente cuando está insertado, en el que se puede formar una membrana cilíndrica usando una centrífuga radial. Aunque el inserto se representa con tres paletas, el inserto se puede fabricar con una o más paletas. Alternativamente, el inserto podría estar dividido de modo que se forme una membrana rectangular entre los dos insertos. La ventaja de usar el inserto moldeado 424 es

que no se requiere un recipiente de fondo plano con una centrífuga de cabezal basculante.

En otra realización de la invención, se facilitan métodos que se utilizan para tratar personas que padecen enfermedades del cartílago. El tejido del cartílago fibroso tiene una estructura compleja organizada en multicapas de condrocitos encapsulados en un tejido fibroso amorfo, cuyo componente principal es el colágeno, más ácido hialurónico, y polisacáridos. La capa interior es la más compacta (es decir, puede ser hasta 25 veces más rígidas que las capas exteriores), mientras que las otras dos capas más blandas se reconocen hacia la superficie. Los casos patológicos que implican el tejido de cartílago articular son comunes en humanos y en animales, debido a infecciones, enfermedades autoinmunes (como artritis), degeneración relacionada con la edad y eventos traumáticos. Los cuidados actuales se centran en el tratamiento farmacológico de pacientes para parar las infecciones, para reducir la inflamación, o para estimular la regeneración natural de tejido de cartílago autólogo. En casos con dolor, como el tratamiento de rotura del menisco de la rodilla, se lleva a cabo tratamiento quirúrgico para eliminar el cartílago que no es sustituido, dejando sin protección el hueso del paciente. Esta realización proporciona métodos de tratamiento de enfermedades del cartílago.

Las membranas y la fibrina pueden ser usadas como andamios para el cultivo de condrocitos. Más en concreto, estos métodos se podrían aplicar a células humanas y animales para producir amortiguadores de fibrina sólida duros activos biológicos, con condrocitos autólogos incluidos, para sustituir in vivo cartílagos dañados para soportar el esfuerzo mecánico e iniciar la recuperación biológica del tejido. En una realización particular, comenzando con una biopsia del tejido del cartílago que es digerido enzimáticamente, como conocen los expertos en la técnica, los condrocitos son cultivados en monocapas con un protocolo convencional en una incubadora de CO<sub>2</sub>. Los condrocitos, una vez separados con cuidado de sus soportes, se pueden mezclar con el PRP justo antes de centrifugar el recipiente a 4.000 a 10.000 xg con el fin de obtener una membrana fuerte "orientada" que puede ser usada para sustituir parte del cartílago dañado in vivo. La fuerza centrífuga aplicada puede diferenciar los condrocitos en tipos diferentes de cartílago.

Los andamios de fibrina que tienen los condrocitos pueden ser cultivados durante varios días en un biorreactor especial en condiciones estériles (como describe R. Portner, Animal Cell Culture Group – Universidad de Dortmund). En este dispositivo, el medio de cultivo DMEM (Invitrogen), al que se ha añadido suero, TGF (factor de crecimiento transformante -Cell concept), IGF (factor de crecimiento insulínico - Cell Concept) es refrescado de forma continua en el andamio en una cámara de flujo. Este procedimiento puede ser realizado durante 19 días. El objetivo es producir cartílago real in vitro sobre la base y forma de la fibrina original. Este nuevo cartílago puede ser usado para sustituir cartílagos dañados in vitro.

En un método, se puede formar una membrana autóloga muy fuerte usando métodos de coagulación y centrifugación concomitantes explicados anteriormente. Más en concreto, se puede preparar una membrana gruesa (por ejemplo, de 3 mm de grosor y 24 mm de diámetro) según el ejemplo 5 siguiente. Naturalmente, se puede hacer una amplia variedad de tamaños de membranas usando alguno de los dispositivos o métodos explicados anteriormente. Se puede hacer una membrana concreta en un recipiente estéril (por ejemplo, un matraz de vidrio de fondo plano de 25 ml lleno de 20 ml aproximadamente de plasma autólogo rico en plaquetas (PRP) y girándolo a 4500-5000xg durante 30 minutos). En este paso se podría usar plasma pobre en plaquetas (PPP). También se puede emplear alguna de las otras técnicas de formación de membrana expuestas anteriormente.

Después de formar ésta o cualquier otra membrana de la invención, se puede lavar bien con solución fisiológica estéril y colocarse en un matraz estéril más grande conteniendo el activador, para preparar una segunda capa de fibrina rica en plaquetas (PRF). En este paso, se introduce una nueva cantidad de plasma rico en plaquetas, en completa esterilidad, en el nuevo matraz conteniendo la membrana fuerte. Se puede someter un segundo matraz a un segundo paso de centrifugación con el fin de obtener una membrana de tres capas. En un ejemplo concreto, esta centrifugación puede tener lugar a una tasa de 1000xg durante 20 minutos para formar una membrana de 30 mm de diámetro. La centrifugación puede tener lugar a alguna de las tasas expuestas anteriormente (a saber, de 500 a 15.000 xg durante más de 10 minutos.) la membrana resultante podría ser utilizada para implante donde se haya de sustituir el cartílago. De nuevo, el grosor y las dimensiones de la membrana vienen dictadas por las condiciones expuestas anteriormente. La cantidad de sangre y el tipo de matraz también cambiarán consiguientemente. La clave es exponer una membrana estéril (formada por alguno de los procesos expuestos anteriormente) a un activador de coagulación adicional, y posteriormente centrifugar el contenido con el fin de formar una segunda capa de fibrina rica en plaquetas. Alternativamente, una coagulación y centrifugación adicionales podrían formar una tercera capa de membrana, y así sucesivamente.

En un método relacionado, se pone tejido de cartílago (autélogo) en cultivo in vitro en un gel, según el método de Condrocito Recuperado a partir de Alginato (ARC), conocido por los expertos en la técnica. El gel en el método ARC podría ser sustituido por fibrina autóloga preparada según los métodos y dispositivos expuestos anteriormente. Más específicamente, durante el segundo paso de la preparación de fibrina rica en plaquetas, se puede añadir las cepas de condrocitos seleccionadas al recipiente secundario juntamente con fibrina autóloga y la mezcla se podría gelificar a una tasa de centrifugación baja, o sin la aplicación de fuerza centrífuga.

La forma y las dimensiones del recipiente en el que tiene lugar la gelificación se pueden elegir según el uso posterior

del “cartilago artificial” (es decir, la forma del cartilago a sustituir). La gelificación puede ser realizada de tal forma que el gel se forme alrededor de la membrana fuerte preparada según el párrafo anterior. Esto se puede lograr colocando la membrana fuerte dentro del recipiente donde esté teniendo lugar la segunda coagulación, de tal forma que el nuevo gel rodee sustancialmente la membrana fuerte original y los condrocitos queden incluidos en el gel. El recipiente estéril que tiene condrocitos autólogos, fibrina rica en plaquetas autóloga gelificada, y eventualmente la membrana fuerte interior, se puede poner a incubar en una atmósfera apropiada (niveles de temperatura, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y RH), como conocen los expertos en el crecimiento de condrocitos in vitro. Así se puede obtener el nuevo tejido cultivado in vitro sobre un andamio de gel de fibrina. Una vez que el cultivo de tejido tenga la densidad correcta de condrocitos y tejido fibroso, un tejido de tres capas dará lugar a una membrana que será muy fuerte por dentro y blanda y preparada para sustituir el tejido enfermo en el huésped. Se añadirán aditivos apropiados al medio de cultivo con el fin de optimizar el rendimiento del procedimiento. También se puede prever el uso de células madre; dado que éstas son el origen de todas las células del cuerpo, pueden originar nuevos condrocitos in vitro, si son tratadas adecuadamente como saben los expertos.

En general, esta realización produce un implante para tratar las enfermedades antes descritas, reduciendo al mismo tiempo los riesgos vinculados al uso de materiales sintéticos o heterólogos. Los condrocitos autólogos encontrarán en la membrana, enriquecida con plaqueta, el soporte sólido apropiado para proliferación in vitro e in vivo y para producir la matriz de condrocitos que es fundamental para la producción de nuevo cartilago. La membrana resultante es fácil de preparar en un armario estéril y tiene las propiedades físicas que permiten implantarla directamente en posición con el fin de reducir el tiempo de recuperación después de la cirugía, y de facilitar la migración de condrocitos que formarán el nuevo cartilago.

Las realizaciones y los métodos aquí descritos también se pueden usar en unión con la recogida de PRP de una máquina de plasmaféresis. Muchas veces durante la cirugía se utiliza un conservador de células o máquina de féresis para conservar sangre aspirando la sangre acumulada en un lugar quirúrgico, separando las células y reinfundiéndolas al paciente. Esta técnica, a veces llamada “cirugía sin sangre”, minimiza o elimina la necesidad de transfusiones de sangre para sustituir la sangre perdida, haciendo el procedimiento más seguro y menos caro. Dicho equipo lo fabrican Haemonetics (Braintree, Massachusetts) y Cobe (Colorado). Estas máquinas de féresis se usan a veces para separar plaquetas y plasma de los glóbulos rojos. El acceso al orificio de plaqueta y plasma de estas máquinas permite la recogida de PRP. Si el PRP se añade al segundo tubo, se recalifica y puede ser centrifugado y coagulado simultáneamente, en unión con los métodos expuestos anteriormente. Esto permite obtener volúmenes mayores de PRP, eliminando al mismo tiempo el primer paso de centrifugación y el dispositivo de recogida. A partir de ello se puede obtener una amplia variedad de hojas y membranas de fibrina sólida, y usarse en esta aplicación.

La mayoría de las centrifugas están diseñadas para procesar un tubo de recogida de sangre o segunda red de fibrina/plaquetas que tiene unas dimensiones de 16 mm x 125 mm. Los tubos de estas dimensiones suelen tener una capacidad máxima de 15 ml. Estos tubos están anidados en una copa de centrifuga que es extraíble para limpieza. Las copas tienen forma de tubo y pueden tener un aro para soportar el tubo y la copa durante la centrifugación a alta velocidad (figura 52). La formación de metal o el moldeo por inyección de materiales poliméricos pueden formar integralmente el aro sobre el tubo. También se puede formar por separado y adherir al tubo por adhesivo, soldadura ultrasónica, soldadura por rozamiento, soldadura por inducción u otros métodos de adhesión de materiales; estos métodos no requieren que los materiales del aro y del tubo sean los mismos, lo que permite mayores opciones de selección de materiales. Alternativamente, el tubo puede tener un diámetro exterior ahusado que se estreche hacia el extremo inferior cerrado y el aro puede tener un ahusamiento inverso de acoplamiento en su diámetro interior, de tal manera que el tubo, cuando se inserte en el aro, pueda proseguir solamente al punto donde el diámetro exterior del tubo y el diámetro interior del aro interfieren, preestableciéndose la distancia del extremo abierto del tubo durante la operación de formación. El aro deberá tener un diámetro interior que permita un contacto suficiente con el tubo para soportar el tubo durante las altas fuerzas de cizalladura que se desarrollan en la centrifugación. El grosor del aro, es decir, la altura del cilindro achaparrado, lo determinan las propiedades del material del aro y las fuerzas a las que estará sometido el aro durante la centrifugación. El diámetro exterior del aro deberá ser suficiente para excluir el movimiento del tubo radialmente hacia fuera durante la centrifugación. Las dimensiones del aro se pueden calcular fácilmente usando computación técnica o análisis de elementos finitos computerizado.

Los materiales de construcción son típicamente acero o plástico de ingeniería de alta resistencia. En muchas aplicaciones de redes de fibrina y plaqueta, tal como fusión espinal y cirugía plástica, se desean volúmenes más grandes de PRP y/o redes de fibrina/plaqueta que los que se pueden obtener con tubos de 16 x 125 mm. Un método para obtener volúmenes significativamente mayores de sangre recogida o fibrina/plaquetas incluye hacer más grande el tubo de recogida o recepción fijando a él un aro de soporte o formando integralmente el aro encima. El tubo se puede colocar directamente en el rotor de centrifuga después de sacar la copa de soporte. El material de construcción del tubo puede contener vacío, recibir un tapón, ser compatible con la sangre y tener una resistencia suficiente para resistir la centrifugación. Los ejemplos de materiales adecuados incluyen, aunque sin limitación, metal, vidrio con un aro de soporte unido por adhesivo, o un plástico barrera de alta resistencia tal como tereftalato de polietileno (PET) o naftalato de polietileno (PEN). Tal tubo puede tener un diámetro de 20 a 30 mm (por ejemplo, 25 mm) y una longitud de 110 a 140 mm (por ejemplo, 125 mm) y contener más de 20-30 ml. Se puede hacer tubos

más grandes modificando el rotor para recibir tubos de mayor diámetro. Esto también es útil en pruebas de diagnóstico y otros procedimientos en los que son deseables volúmenes de espécimen más grandes que los que se pueden obtener con tubos de tamaño estándar.

5 Retardar la centrifugación y/o la recalcificación después de la transferencia de PRP puede mejorar la incorporación de fibrina, plaquetas y factores de crecimiento a materiales de injerto. Retardar la centrifugación y/o la recalcificación no significa que no tengan lugar la coagulación y la centrifugación concomitantes. Se puede añadir materiales de injerto de tamaño pequeño de partícula al PRP después de la transferencia al segundo tubo o se puede preintroducir al menos uno en el tubo secundario durante el proceso de fabricación. Estos materiales de injerto pueden incluir  
10 hueso autólogo, hueso de donante, hueso animal, hueso sintético, trifosfato de calcio, carbonato, sulfato y sus combinaciones. Debido a la densidad del material de injerto y su pequeño tamaño de partícula, puede ser difícil incorporar uniformemente el injerto a la red de fibrina-plaquetas o lámina de fibrina sólida. Esto puede ser el resultado de que la densidad del injerto es mucho más alta que la densidad de PRP, y el material de injerto cae rápidamente a la parte inferior del tubo durante la centrifugación. El pequeño tamaño de partícula del material de injerto empaquetado no siempre puede permitir que la fibrina y plaquetas, que descienden después durante el ciclo de centrifugación, penetren fácilmente en los intersticios del material de injerto empaquetado. Un método alternativo a la centrifugación inmediata es retardar la centrifugación durante un período de tiempo que permita que los monómeros de fibrina, plaquetas y factores de crecimiento rodeen y penetren en la superficie porosa del material de injerto, antes de que tenga lugar el posterior entrecruzamiento. La mezcla se puede mezclar periódicamente o de  
20 forma continua durante el período de retardo para mejorar la dispersión y el recubrimiento de las partículas de injerto individuales. Después de un período de tiempo determinado apropiado por el tamaño de partícula del material de injerto, se puede iniciar la centrifugación para empaquetar el injerto y estabilizar la red de fibrina-plaquetas comprimiendo la red por centrifugación durante el paso de entrecruzamiento de la formación de fibrina.

25 Puede haber un amplio rango de retardos, dependiendo del tamaño de partícula del material de injerto óseo: cuanto mayor es la partícula, menor es el beneficio del retardo. Para autoinjerto e injertos humanos y animales superiores a 3 mm, puede no ser necesario ningún retardo para incorporar el injerto a la red de fibrina-plaquetas. Para injertos de más de 0,5 mm y menos de 3 mm, un retardo de 1 a 20 minutos (por ejemplo, 3 minutos) permite una buena incorporación del material de injerto, permitiendo al mismo tiempo la centrifugación durante el proceso de entrecruzamiento. Para materiales de injerto de menos de 0,5 mm, un retardo de 3 a 25 minutos (por ejemplo, 5 minutos) permite una buena incorporación y compresión durante el entrecruzamiento. De nuevo, retardar la recalcificación del PRP permite que el PRP sea absorbido al injerto antes del inicio de la coagulación. En un ejemplo, el calcio no está prellenado en el segundo tubo, sino que se añade después de un período de impregnación, de 1-30 minutos, idealmente de 5-15 minutos.

35 En otros casos se emplean materiales de injerto de gran volumen, tal como varillas óseas para fusión espinal. En estos casos, a veces es deseable impregnar el material de injerto en el PRP antes de la coagulación para efectuar una penetración más profunda del plasma, las plaquetas y/o los factores de crecimiento en la superficie porosa y mejorar por ello la incorporación de la posterior red de fibrina-plaquetas al material de injerto. Esto se puede lograr retardando la adición del calcio u otra especie catiónica que desplazaría el calcio endógeno unido por el agente quelante anticoagulante al PRP después de la transferencia al segundo tubo. El activador de coagulación de calcio se puede añadir directamente al tubo después del retardo de tiempo apropiado dictado por las propiedades del material de injerto y posteriormente la centrifugación durante la coagulación. Alternativamente, el activador de coagulación de calcio se puede añadir usando un recipiente conteniendo la solución de calcio que esté conectado al  
40 segundo tubo y se active incrementando la velocidad de centrifugación, en un método similar al de la realización del sistema de tubo único.

También puede ser deseable pulverizar PRP sobre la superficie de una herida y formar la red de fibrina-plaquetas in situ. Este procedimiento proporciona un valor terapéutico mejorado. La fibrina puede actuar como un adhesivo mientras que las plaquetas proporcionan mejor curación por adición de sus factores de crecimiento. Los ejemplos de procedimientos que emplean esta técnica pueden incluir: adherir injertos de piel a víctimas de quemaduras o heridas crónicas; adherir piel a las capas subdérmicas durante la cirugía plástica tal como lifts de cara; sellar heridas exudantes después del desbridamiento de víctimas de quemaduras; y aplicar un agente hemostático tópico. Un método de lograr el efecto deseado es transferir el PRP al tubo de recalcificación o secundario y posteriormente  
50 añadir un pulverizador aerosol de bomba o pulverizador asistido por aire al tubo y aplicar el PRP recalcificado al lugar de la herida. El PRP formará entonces una red de fibrina-plaquetas in situ.

Un método alternativo sería bombear directamente del primer tubo después de la separación de glóbulos rojos o transferir el PRP a un tubo que no contenga activador de coagulación de calcio u otra especie catiónica. El calcio puede ser añadido por adición de la solución al recorrido de fluido durante el bombeo utilizando un colector de fluido separado o haciendo fluir el PRP a través de una cámara que contenga cristales de calcio.

Un método alternativo puede ser concentrar las plaquetas en la parte inferior del segundo tubo sin solución de calcio centrifugando el PRP después de la transferencia. La admisión del sistema de bombeo aspiraría de la parte inferior del tubo, aplicando plaquetas a concentraciones más altas para niveles incrementados de factores de crecimiento. La varilla de admisión puede tener un diafragma deslizante que selle el concentrado de plaquetas debajo del

diafragma. La varilla de admisión puede tener un tope que limite la posición inicial del diafragma, estableciendo por ello la concentración de plaquetas en el volumen a dispensar a un valor deseado (véase la figura 53). El tope está situado a una distancia preestablecida de la parte inferior de la admisión que producirá la concentración deseada de plaquetas en el volumen de plasma debajo del diafragma. Cuanto más alto esté situado el tope en la varilla de admisión, menor será la concentración de plaquetas. Otra realización es poner una superficie de activación de coagulación de alta energía en el recorrido de fluido del sistema de pulverización. La superficie activará el plasma y formará un coágulo con una densidad de entrecruzamiento más alta, proporcionando una mayor resistencia mecánica y un tiempo de coagulación reducido.

Se puede emplear otros dispositivos para facilitar la extracción de la red de fibrina-plaquetas, con y sin material de injerto, del tubo secundario. Después de la terminación del segundo paso de centrifugación, la red de fibrina-plaquetas puede ser empaquetada a la parte inferior del segundo tubo. Normalmente, el tubo puede ser decantado a una copa estéril y la red puede fluir libremente a la copa. A una velocidad de centrifugación más alta requerida para redes más densas, el coágulo puede ser empaquetado ajustadamente para fácil decantación. La empaquetadura puede formar un cierre hermético contra la pared del tubo de tal manera que se forme un vacío cuando el coágulo se mueva después de la inversión, evitando el flujo adicional. Esta situación puede ser exacerbada por la adición de materiales de injerto que se compactan durante la centrifugación, formando una matriz empaquetada densa, muy parecida a la sinterización de polvos de metal. Por lo tanto, es deseable quitar la red de la parte inferior del tubo, preferiblemente como parte de un sistema de administración, para la adición de la red al lugar de la herida, tal como una cavidad ósea.

Un método de facilitar la extracción de la red es la inclusión de una copa con una parte inferior perforada en el segundo tubo al tiempo de la fabricación (véase la figura 54). La parte inferior está perforada (figura 54a) para que el suero producido durante la centrifugación pueda drenar durante la extracción de la copa del tubo. La altura de las paredes de la copa puede variar, siendo del rango desde aspectos poco profundos (figura 54a) a toda la longitud del tubo (figura 54b). El labio de la copa puede contener un método de entrecruzamiento a un dispositivo de administración. El método de entrecruzamiento puede ser roscas, bloqueos de torsión de bayoneta, clips o mecanismos similares. Las paredes de la copa pueden tener ranuras en sus paredes exteriores para evitar el vacío durante la extracción de modo que se evite una fuerza de extracción excesiva (figura 54d). La pared de la copa puede tener perforaciones de modo que el suero encima del coágulo pueda fluir a través de las paredes, a lo largo de las ranuras y al volumen debajo de la copa creado durante la extracción de la copa del tubo. La parte superior de la copa también puede conectar con un sistema dispensador operado por desplazamiento positivo de un pistón a través de la sección cilíndrica de la copa; la operación puede imitar a una jeringa (figura 54e) o mecanismo de "pistola de calafateo" de trinquete (54f). El material de la porción cilíndrica de la copa o cilindro dispensador puede ser radioopaco para permitir una dispensación exacta usando una técnica fluorométrica. En la figura 55, el segundo tubo es cilíndrico y tiene un tapón en cualquier extremo del cilindro. Después de la centrifugación, se quitan los tapones y un pistón desplaza la red formada. Esto constituye un sistema de cartucho. Alternativamente, la copa puede ir montada en el tapón con fibras de tal manera que la copa se extraiga cuando se quite el tapón.

Las membranas y las fibrinas producidas por los métodos aquí descritos pueden actuar como un andamio a usar para cultivar células, como se ha explicado anteriormente. La matriz de fibrina puede ser suficientemente densa para actuar como un andamio. La matriz se puede formar en un material de andamio de absorción lenta tal como una esponja de colágeno, un polímero biodegradable o un polímero no biodegradable tal como un injerto de aneurisma aórtico abdominal. Estos andamios combinados pueden proporcionar resistencia mecánica adicional y un nuevo crecimiento de tejido más uniforme que los actuales materiales de andamios. En un ejemplo, la membrana obtenida por la aplicación de alta fuerza centrífuga, por ejemplo, de 4.000 a 10.000xg, puede actuar como un andamio para cultivos adhesivos in vitro de células dérmicas. Estos cultivos son especialmente útiles para reparar daños severos de la piel debido a quemaduras o a abrasión mecánica del tejido original. Estos andamios de fibrina proporcionan naturalmente a las células en cultivo factores de crecimiento, por las plaquetas, y factores adhesivos, por la lámina de fibrina sólida. Para obtener un buen cultivo in vitro puede ser aconsejable empezar con una buena densidad de células epiteliales en el medio de cultivo.

Las membranas y las láminas de fibrina sólida aquí descritas también se pueden usar para fundir células madre encima. Más en concreto, las membranas y las láminas de fibrina sólida pueden ser usadas para cultivar células pancreáticas conjuntamente con células madre en una monocapa o en varias capas de células o membranas. Por ejemplo, Medvinsky en la Universidad de Edimburgo, Reino Unido, y XWang en la Universidad de Portland, Oregón, han demostrado recientemente que las células madre inyectadas en el páncreas de ratones diabéticos funden su genoma con células pancreáticas enfermas y generan varios grados de poliploides que son de nuevo activos en la producción de insulina. Los factores de crecimiento activos presentes en los andamios y soportes aquí explicados pueden permitir el crecimiento de células usando medios convencionales, y la posibilidad de estudiar la fusión y los aspectos bioquímicos y los aspectos citológicos.

En una aplicación diferente, los condrocitos tomados de un cultivo monocapa son inmovilizados en perlas de alginato, como saben los expertos en la técnica. Estas perlas sólidas son comprimidas a un agregado mayor "parecido a tejido" usando la fuerza centrífuga para "comprimir" estos agregados con el fin de regular la presión neumática y de estimular el "tejido" según el esfuerzo fisiológico in vivo. (Czermakm, P. –Universidad de Ciencias

Aplicadas, Giessen, Alemania). Durante la centrifugación, se puede añadir PRP a las perlas de alginato para preparar un agregado bioactivo compacto preparado para implantarse en lugar de un cartílago dañado, o para ser cultivado en un biorreactor durante varios días con el fin de guiar el crecimiento del cartílago.

## 5 Ejemplos

### Ejemplo 1

10 En un recipiente de vidrio de 5 ml para antibióticos, sellable bajo 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, de pureza superior a 98%, lo comercializa la compañía americana Sigma Inc. Por separado, se prepara una solución de 1M  $\text{CaCl}_2$ , pesando en una balanza de precisión 147,0 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (>99% puro), de la misma compañía americana Sigma Inc.

15 Se disolvió esta sal en 1 litro exacto de agua destilada no pirógena ultrapura, durante unos pocos minutos a temperatura ambiente, con frecuente agitación. Usando un dispensador de pistón de precisión, que tiene una precisión de dispensación de  $\pm 5\%$  (análogo a Eppendorf), se introdujeron 80  $\mu\text{l}$  de la solución activadora en el recipiente de vidrio. En este paso, al mismo tiempo que la dispensación, se llevó a cabo una filtración usando un filtro de esterilización de 0,22  $\mu\text{m}$  de Millipore, evitando al mismo tiempo con cuidado la posible contaminación de polvos o filamentos de cualquier tipo. Finalmente, se cerró el recipiente de vidrio con un tapón de caucho perforable y cerrable bajo vacío, teniendo cuidado de no cerrar completamente el recipiente, con el fin de permitir la posterior obturación al vacío y posiblemente otra esterilización usando gas. El recipiente se introdujo entonces en un dispositivo adecuado para obturación al vacío, evitando al mismo tiempo cualquier posible contaminación de partículas sólidas en la atmósfera (filtración ULPA o HEPA en cámara estéril). Se aplicó un vacío de hasta 4 ml, usando una bomba de vacío de membrana y un control micrométrico, a la atmósfera interior del dispositivo. Con el fin de controlar el nivel de vacío en la atmósfera interior, se usó un calibre de vacío de precisión (precisión #1 mbar). Finalmente, sin descargar el dispositivo, el recipiente se obturó bajo vacío, para ser recuperado a continuación para el uso descrito en el ejemplo siguiente.

### 30 Ejemplo 2

Se extrajeron 10 ml de sangre venosa de un paciente según las provisiones de las normas cualitativas para análisis clínico, por ejemplo, usando tubos de prueba estériles VACUTAINER® de Becton-Dickinson, añadiéndoseles 0,106 M de una solución de citrato de sodio. Para esta finalidad también se puede usar tubos de prueba a los que se haya añadido etilendiamina tetracetato disódico o dipotásico. La muestra se mantuvo estéril con cuidado durante la extracción de sangre. Finalmente, la muestra se agitó suavemente para mezclar completamente los componentes, asegurando por ello la acción anticoagulante del citrato de sodio. El tubo de prueba se introdujo entonces en una centrífuga adecuada, equilibrando con cuidado el peso del rotor con el fin de evitar que la centrífuga se dañase. Una vez sellada la tapa, la muestra se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos, separando por ello los glóbulos rojos (más gruesos) del plasma citrado (supernadante). En este caso el rendimiento de plasma, dependiendo principalmente de las características de la sangre del donante, fue de hasta 55%. El tubo de prueba conteniendo el plasma separado se mantuvo cerrado en condiciones estériles y se colocó verticalmente en un soporte para recuperar el plasma propiamente dicho; en este paso se tubo cuidado de no agitar el tubo de prueba, con el fin de evitar la mezcla de las dos fases separadas en la centrifugación. La porción exterior del tapón del tubo de prueba se esterilizó entonces usando alcohol desnaturalizado, y a continuación se introdujo una aguja estéril, conectada a una jeringa estéril, en el tapón del tubo de prueba. La aguja se llevó hasta 3-4 mm del menisco separado de las dos fases, y se aspiraron 4 ml de plasma. Usando la misma aguja, se perforó el tapón del recipiente según la presente invención, preparado como se describe en el ejemplo 1, que había sido esterilizado previamente con alcohol. Tan pronto como la aguja perforó el tapón, el plasma citrado contenido en la jeringa fue aspirado completamente al recipiente. Éste se agitó suavemente y, después de aproximadamente 2 minutos a 37°C, se obtuvo un coágulo de cola de fibrina autóloga estéril, preparada para ser usada inmediatamente.

### Ejemplo 3

55 Se extrajeron 18 ml aproximadamente de sangre venosa de un paciente de 49 años usando tubos de prueba de 5 ml de citrato de sodio VACUTAINER® de Becton-Dickinson, teniendo cuidado de agitar suavemente justo después de la extracción de la muestra. La sangre así extraída se sometió inmediatamente a centrifugación (15 minutos a 2500 rpm) para separar el plasma. El plasma (12 ml) fue transferido con cuidado a dos tubos de prueba de 10 ml, conteniendo 120  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  (10g/100ml) cada uno, que se habían preparado como se describe en el ejemplo 1, pero sin usar ácido tranexámico. Después de mezclar el plasma con el activador, los tubos de prueba fueron centrifugados durante 30 minutos a 3000 rpm, obteniendo finalmente dos muestras de fibrina masivas que se insertaron, con todas las precauciones de esterilidad, dentro de 2-3 horas de preparación, en la cavidad mandibular vesicular grande resultante de la extracción del canino izquierdo impactado y el segundo incisivo derecho, así como de la abscisión del quiste presente en la zona central de los dientes incisivos. Finalmente, los bordes gingivales se cerraron con ocho puntos. Una verificación radiográfica a los 15 días demostró que la fibrina todavía estaba en su posición, aparentemente intacta. La histología efectuada 7 meses después demostró la completa sustitución de la

fibrina por tejido óseo, con un mejor transcurso postoperatorio que con los métodos tradicionales, que requieren más de 12 meses para lograr el mismo resultado. Dado que no se había usado ningún agente antifibrinolítico para la preparación de fibrina autóloga, se puede indicar en este caso que dicho aditivo era útil para la finalidad específica.

#### 5 Ejemplo 4

Al objeto de producir una cola de fibrina adhesiva, se transfirieron 12 ml de plasma, obtenido como en el ejemplo 3,, con todas las medidas para preservar la esterilidad, a un recipiente de 20 ml según la presente invención, preparado como se describe en el ejemplo 1.

10 Después de realizar una agitación esmerada, se vertió el plasma mezclado a 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™ · NOTEBS S.A. Francia), o con fluoruro de calcio (>98% Sigma Inc.). Estas sales de calcio son conocidas por los expertos 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 que se usó como un relleno para espacios subgingivales o diferentes cavidades después de la abscisión de sacos mucosos infectados. La pasta, colocada con el fin de llenar los espacios vacíos, formó en unos pocos minutos una lámina de fibrina sólida que actuaba como un tapón hemostático y creó un sustrato biológico autólogo que soportaba los bordes mucosos en posición y donde más tarde se inició la migración de células conectivas.

#### Ejemplo 5

25 Para obtener una membrana de cola de fibrina, se pusieron 20 ml de plasma, obtenidos como en el ejemplo 3, en un recipiente de fondo plano, de 25 ml, según la presente invención preparado como en el ejemplo 1. Después de la esmerada agitación usual, el recipiente se centrifugó durante 40 minutos a 4000 rpm con un rotor abatible. Al final de la operación de centrifugación, de la parte inferior del tubo de prueba se recuperó una membrana muy compacta y resistente a la tracción, de color blanco, que tenía el mismo tamaño que la parte inferior del tubo de prueba (24 mm de diámetro) y un grosor de 3 mm. Esta membrana autóloga, debido a su compacidad y resistencia, se usó como una membrana de sujeción y separación en cirugía dental y general, como un sucedáneo de las membranas sintéticas porosas. La membrana obtenida puede ser almacenada estéril durante varios días a 4°C.

#### 35 Ejemplo 6

Para obtener membranas de cola de fibrina de gran tamaño, se extrajeron 200 ml aproximadamente de plasma citrado de un paciente, se recogieron y separaron en una bolsa de transfusión doble. El plasma se sometió a crioprecipitación por congelación a -80°C durante 12 horas, realizándose la descongelación durante la noche a 4°C (este procedimiento es bien conocido por los expertos en la técnica). La misma mañana, el plasma obtenido por este procedimiento fue sometido a centrifugación durante 15 minutos a 5000 rpm a 4°C obteniendo 20 ml aproximadamente de crioprecipitado. Después de una esmerada extracción del supernadante usando un dispositivo de presión (por ejemplo, XP100 de la compañía Jouan S.A. Francia), el crioprecipitado se asoció con 20 ml de plasma entero del mismo paciente. Los 40 ml resultantes se pusieron en un recipiente de polipropileno estéril de fondo plano, de 35 mm de diámetro, según la presente invención, conteniendo la cantidad adecuada de activador, como en el ejemplo 1. Después de esmerada agitación, el recipiente se centrifugó durante 40 minutos a 5000 rpm obteniendo una membrana como en el ejemplo 5, pero más compacta y resistente a la tracción debido al mayor contenido de fibrina. Dicha membrana también puede ser almacenada en forma estéril durante varios días a 4°C.

50 La membrana obtenida con el método descrito en el ejemplo 5, además de la utilización descrita en el ejemplo 4, puede ser usada como un sustrato para el cultivo in vitro de células dérmicas del mismo paciente, con el fin de obtener injertos a trasplantar en caso de quemaduras muy graves.

También se puede obtener membranas de buena calidad útiles para los fines antes mencionados a partir de plasma entero separado directamente transferido al recipiente según la presente invención. La membrana obtenida será más fina que la antes descrita, pero seguirá siendo útil para usos quirúrgicos y como un sustrato para el crecimiento celular.

#### Ejemplo 7

60 Para obtener fibrina pulverizada comenzando a partir de un crioprecipitado como en el ejemplo 5, se asociaron 20 ml de crioprecipitado con 10 ml de plasma entero a temperatura ambiente y se agitaron suavemente hasta la completa disolución. El plasma resultante fue transferido con cuidado a un recipiente de 50 ml según la presente invención preparado como en el ejemplo 1, agitando suavemente para una mezcla perfecta de los componentes. Después de 120 segundos a temperatura ambiente, el tubo de prueba se conectó a un compresor de aire estéril tipo Venturi, conocido por los expertos en la técnica, para ser distribuido uniformemente sobre la superficie de un órgano sangrante sometido a cirugía (pulmón, corazón, bazo, anastomosis arterial). El plasma concentrado, conteniendo

fibrinógeno concentrado, trombina, iones calcio y otros enzimas de coagulación, distribuido sobre el órgano, coaguló a unos pocos segundos, debido también a enzimas de activación de coagulación de tejido presentes en el endotelio del paciente creando una película de fibrina que tenía una función hemostática protectora. Por lo tanto, la operación quirúrgica concluyó con la reducción de hemorragias internas y evitando así más transfusiones de sangre o complicaciones.

#### Ejemplo 8

La membrana obtenida con el método descrito en el ejemplo 5 también incorporará plaqueta autóloga si se usa plasma rico en plaquetas (PRP) como un componente sanguíneo inicial. Para obtener PRP a partir de sangre entera, se puede centrifugar muestras de sangre a 1000xg durante 10-15 minutos. Los pasos siguientes serán similares a los descritos en dicho ejemplo.

La membrana obtenida con este método de aplicación se podría usar como un sustrato activo para estudiar in vitro el fenómeno de la fusión de células madre descrito por Wang y Vassilopoulos (Nature-Vol 422-2003, 24 de Abril). Este estudio describe el uso de células madre cultivadas en presencia de hepatocitos en hígado de ratón, y la fusión de sus genomas para crear una célula de nuevo tipo capaz de regenerar el tejido dañado o defectuoso.

Debido a la presencia de plaquetas, proveedores de factor de crecimiento, y otros agentes estimulantes, la membrana obtenida como se ha descrito anteriormente podría ser usada como un soporte para estudiar in vitro este fenómeno muy importante y usar eventualmente la generación obtenida de nuevas células a introducir in vivo (de forma análoga a lo hecho con respecto a los condrocitos o las células epiteliales).

#### Ejemplo 9

Todo el procedimiento siguiente se lleva a cabo en un armario de flujo laminar en condiciones estériles. Comenzando a partir de una muestra bióptica sólida, se trató tejido dérmico con un homogenizador para separar pequeños aglomerados de células manteniendo intacta su integridad de célula única. Después de lavar el homogenizado con 40 mm de PBS estéril (solución tampón fosfato pH 7,3 - Gibco), las células fueron centrifugadas a 500-1000xg durante 7-15 minutos a un tubo de PP para recuperar el pellet. El lavado se repitió dos veces. Las células obtenidas fueron digeridas entonces a 37°C durante 20 minutos con una solución de tripsina a 0,05%/EDTA 0,02% para eliminar la estructura de colágeno que soporta las células.

Posteriormente, las células se lavaron bien con PBS estéril para eliminar la colagenasa. Las células se resuspendieron posteriormente en un medio de cultivo (por ejemplo M199, HAM-F12, u otro, conocido por los expertos en la técnica) y se distribuyeron de forma homogénea sobre la superficie de una membrana de fibrina. La densidad de las células sobre la superficie del soporte de fibrina puede ser importante para el buen resultado del cultivo de células epiteliales. Por ejemplo, los mejores resultados se pueden obtener con una densidad de 1 a  $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> de membrana, donde normalmente se adhirieron en 15-60 minutos. Después de la distribución y al cabo de 2-5 horas son completamente planas. El cultivo se puede mantener hasta 5 días en una atmósfera controlada de 5% CO<sub>2</sub>, R.H. 98% a 37°C, controlando regularmente el desarrollo del cultivo, y cambiando eventualmente el medio de cultivo cada 2 a 3 días, si es necesario. En caso de un recipiente cilíndrico, se usa un sistema de rodillos apropiado en base a 24 horas, dentro del incubador de CO<sub>2</sub>, de modo que el medio cultivado lave de forma continua la superficie de la membrana que alimenta las células del cultivo.

El cultivo deberá ser realizado en un recipiente estéril apropiado, con un sistema de ventilación que permita intercambios de gases, pero que mantenga la esterilidad del interior. La membrana de fibrina deberá formarse en el interior del recipiente para adherirse perfectamente a la superficie interior del matraz durante todo el tiempo del cultivo.

Después de verificar el desarrollo del cultivo in vitro (por ejemplo usando un microscopio de fase de contraste), la membrana, con las células sobre la superficie superior, se recupera con cuidado y prepara para implante bajo condiciones estériles en la herida o quemadura del paciente, manteniéndola eventualmente en posición con puntos.

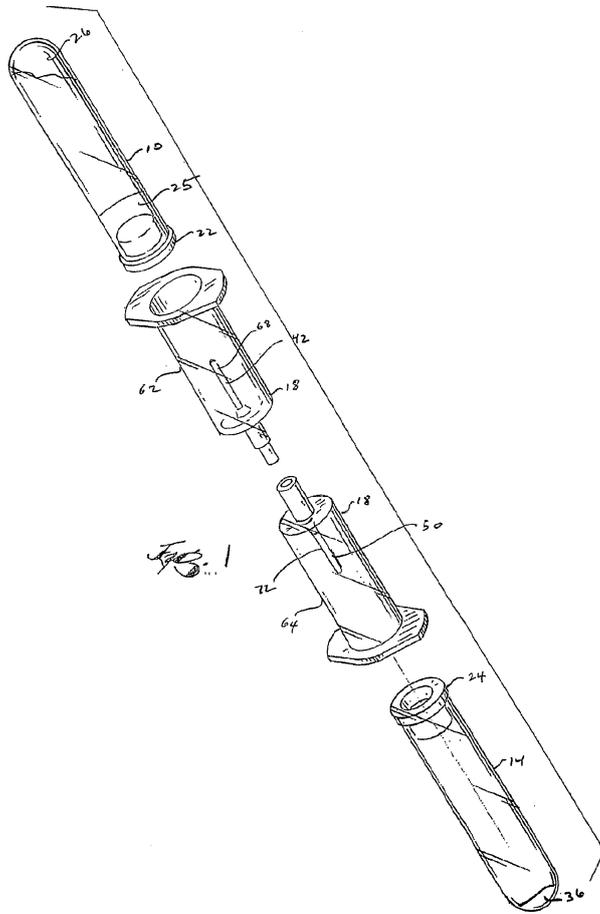
**REIVINDICACIONES**

1. Un método para preparar una lámina de fibrina sólida, incluyendo el método:
- 5 extraer sangre de un paciente;  
separar plasma de la sangre; y
- 10 concomitantemente coagular y centrifugar axialmente el plasma para formar la lámina de fibrina sólida, siendo adecuada la lámina de fibrina sólida para regenerar tejido corporal en un organismo vivo.
2. El método para preparar una lámina de fibrina sólida según la reivindicación 1, donde se usa un dispositivo para preparar una lámina de fibrina sólida, incluyendo el dispositivo:
- 15 una cámara primaria;  
una cámara secundaria conteniendo un coagulador; y
- 20 un medio que separa la cámara primaria de la cámara secundaria, usándose el dispositivo en centrifugación axial.
3. El método para preparar una lámina de fibrina sólida según las reivindicaciones 1 o 2, donde el plasma separado de la sangre contiene calcio endógeno y el método incluye además:
- 25 poner el plasma en contacto con un anticoagulante; y  
poner el plasma en contacto con un coagulador incluyendo una especie catiónica que tiene una afinidad igual o más alta al anticoagulante que al calcio endógeno.
- 30 4. El método para preparar una lámina de fibrina sólida según la reivindicación 3, donde la especie catiónica incluye al menos uno de magnesio, manganeso, zinc y una combinación de los mismos.
5. El método para preparar una lámina de fibrina sólida según la reivindicación 3, donde la especie catiónica incluye calcio.
- 35 6. El método para preparar una lámina de fibrina sólida según la reivindicación 3, donde la especie catiónica incluye al menos uno de cloruro de calcio, fluoruro de calcio, carbonato de calcio, gluconato de calcio, fumarato de calcio, piruvato de calcio, y una combinación de los mismos.
- 40 7. El método para preparar una lámina de fibrina sólida según las reivindicaciones 1 o 2, donde la lámina de fibrina sólida incluye además un agente mejorador terapéutico.
- 45 8. El método para preparar una lámina de fibrina sólida según la reivindicación 7, donde el agente mejorador terapéutico incluye al menos uno de un antibiótico, analgésico, terapéutico contra el cáncer, factor de crecimiento de plaquetas, proteína morfogénica ósea, célula madre, material de injerto óseo, injerto de tejido blando, material de cultivo de células, inmunosupresor, y una combinación de los mismos.
- 50 9. El método para preparar una lámina de fibrina sólida según la reivindicación 7, donde el agente mejorador terapéutico incluye un antibiótico, y el antibiótico incluye al menos uno de ampicilina, eritromicina, tobramicina y una combinación de las mismas.
- 55 10. El método para preparar una lámina de fibrina sólida según la reivindicación 7, donde el agente mejorador terapéutico incluye un analgésico, y el analgésico incluye al menos uno de aspirina, codeína y una combinación de las mismas.
- 60 11. El método para preparar una lámina de fibrina sólida según la reivindicación 7, donde el agente mejorador terapéutico incluye material de injerto óseo, y el material de injerto óseo incluye al menos uno de hueso autólogo, aloinjerto de cadáver, homoinjerto de cadáver, hueso de origen animal, injerto óseo sintético, compuesto ortobiológico, proteína morfogénica ósea (BMP), proteína morfogénica ósea humana recombinante (rhBMP), y una combinación de los mismos.
- 65 12. El método para preparar una lámina de fibrina sólida según la reivindicación 7, donde el agente mejorador terapéutico incluye al menos uno de piel, materiales de injerto cutáneo, injerto gingival, colágeno, un injerto bioabsorbible, un injerto vascular, un factor de crecimiento derivado de plaquetas, Factor 4 de plaqueta (PF4), tromboglobulina, trombospondina, y una combinación de los mismos.
13. El método para preparar una lámina de fibrina sólida según la reivindicación 7, donde el agente mejorador

terapéutico incluye al menos uno de un inmunosupresor para trasplantes de órganos y un inmunosupresor cutáneo.

14. El método para preparar una lámina de fibrina sólida según la reivindicación 7, donde la membrana de fibrina sólida incluye células vivas para expresión de moléculas deseadas, terapia génica y terapia celular.

5 15. El método para preparar una lámina de fibrina sólida según la reivindicación 7, donde la lámina de fibrina sólida se ha de usar para regenerar tejido en un organismo vivo.



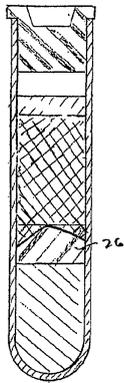
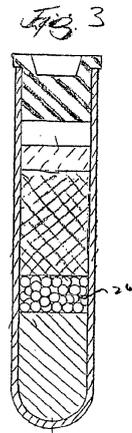
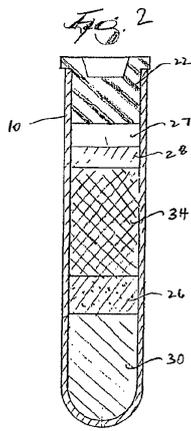


Fig. 4

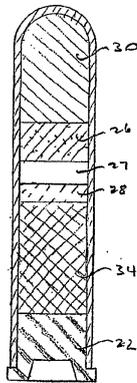
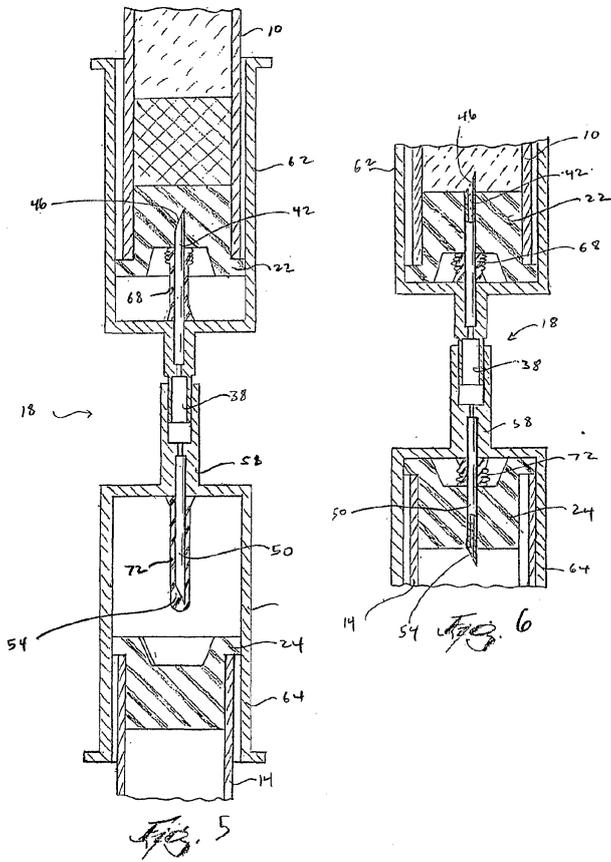
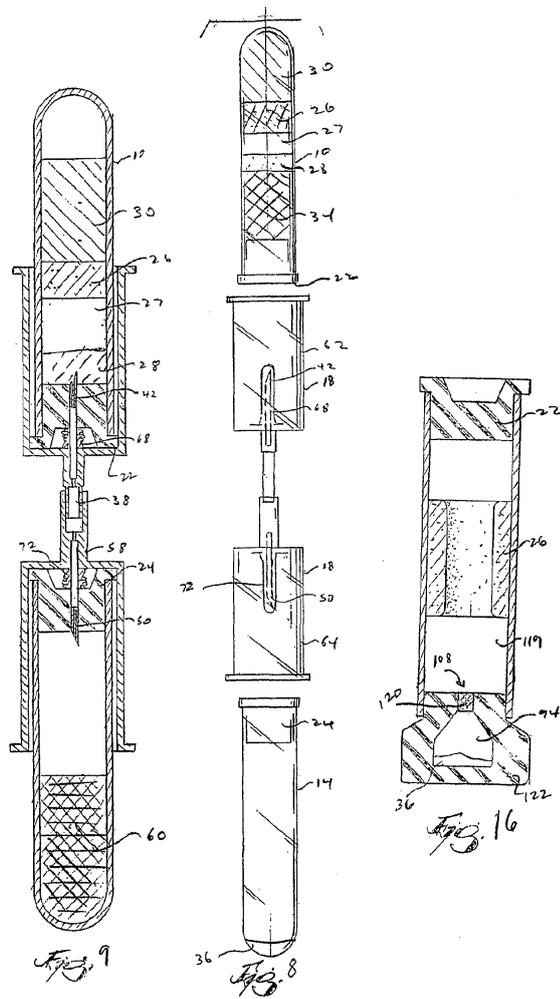
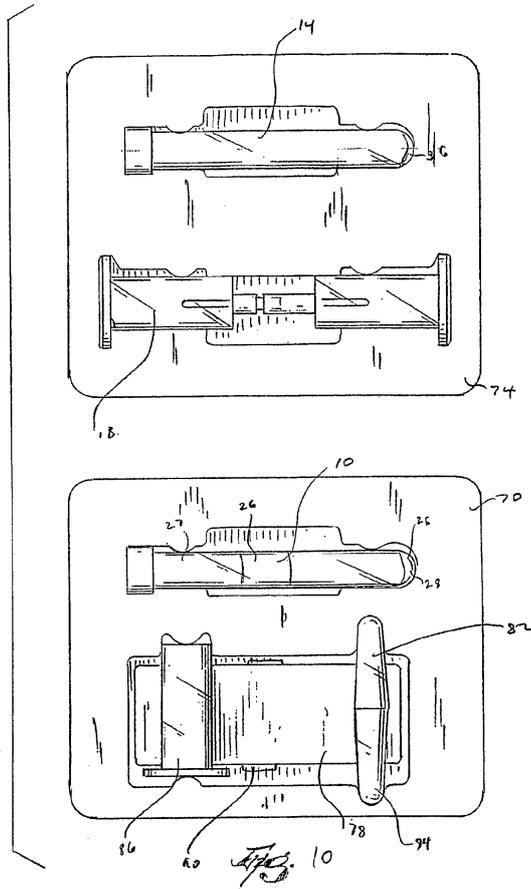
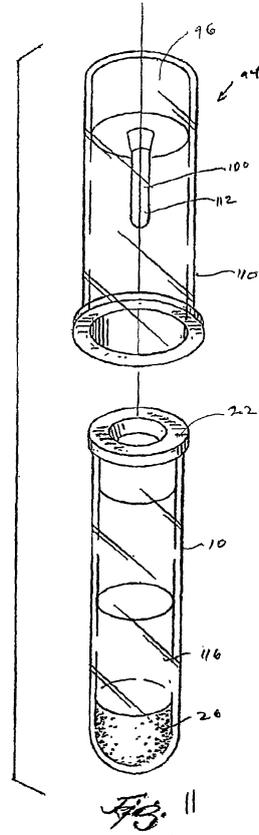
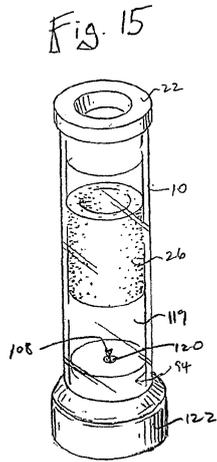


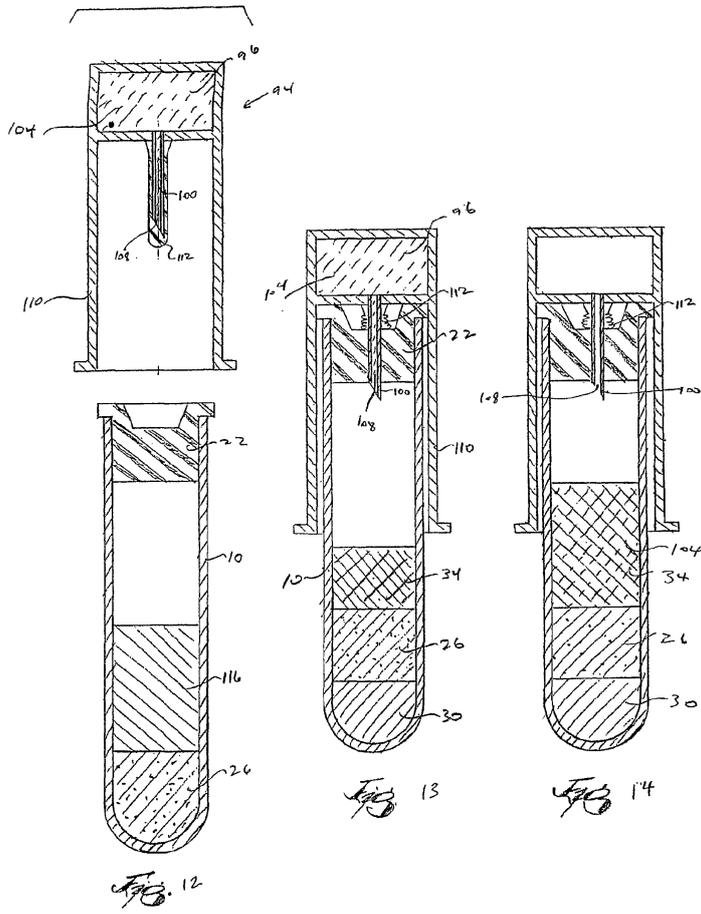
Fig. 7

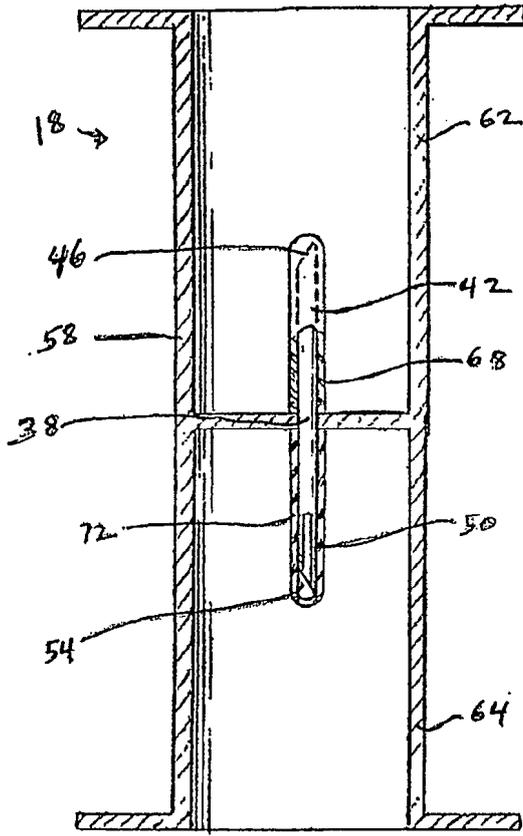




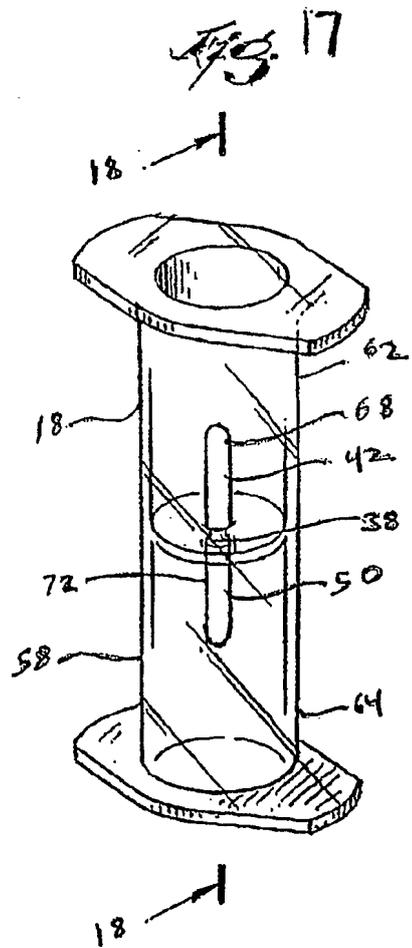




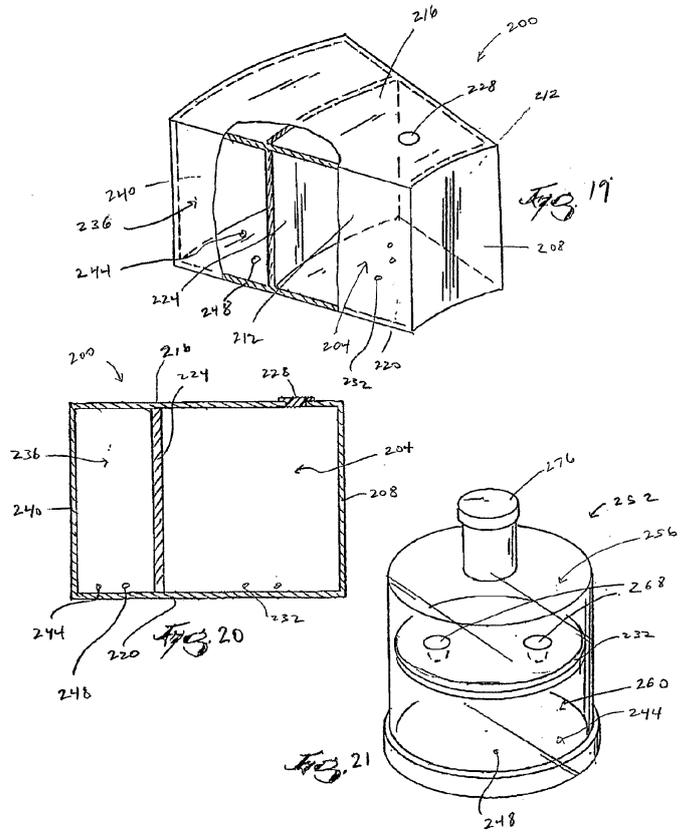


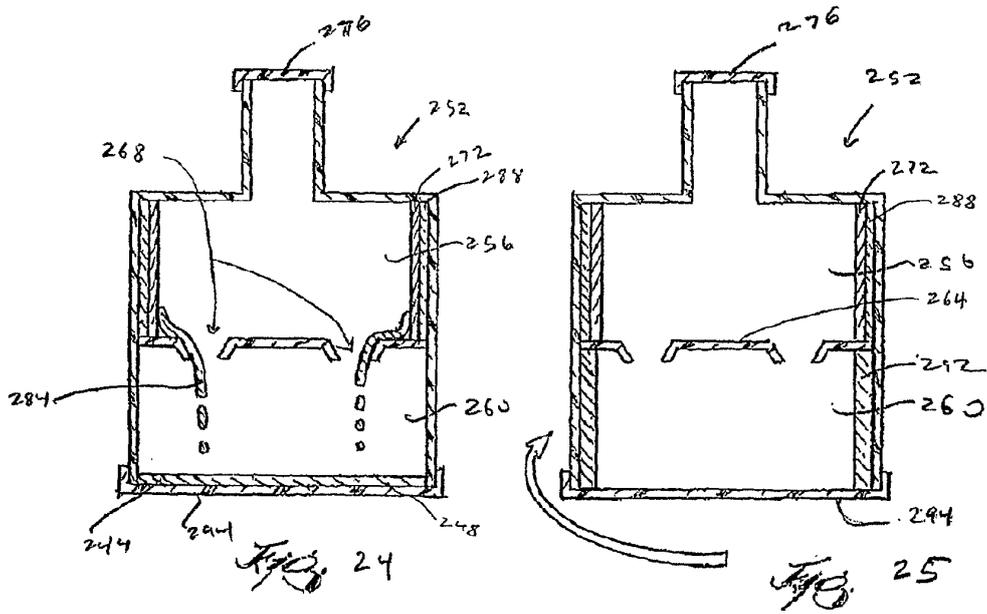
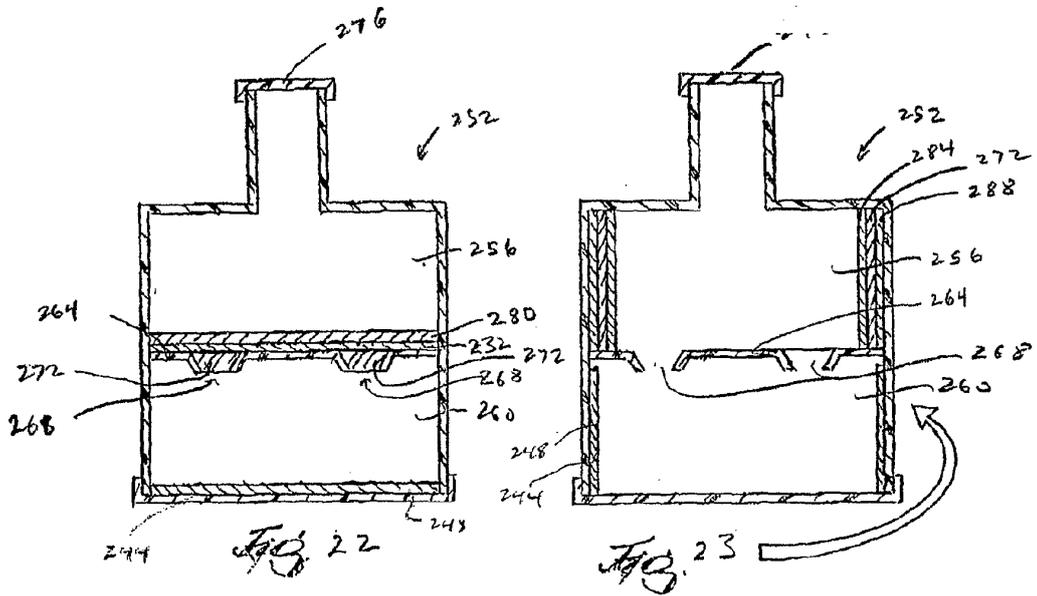


*Fig. 18*

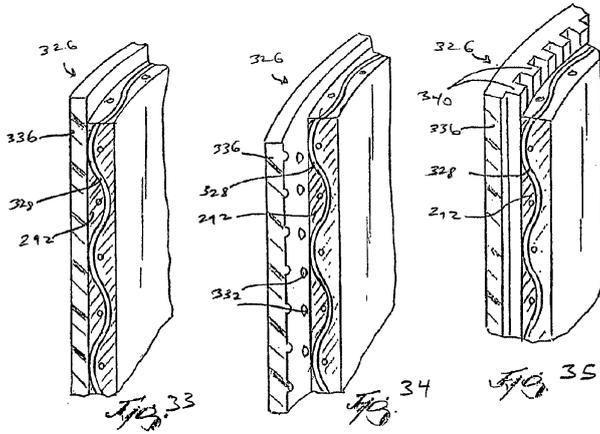
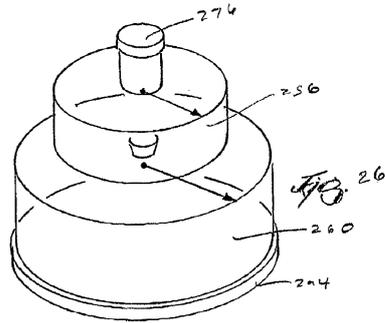


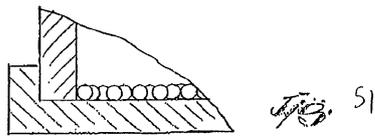
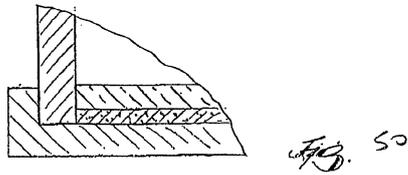
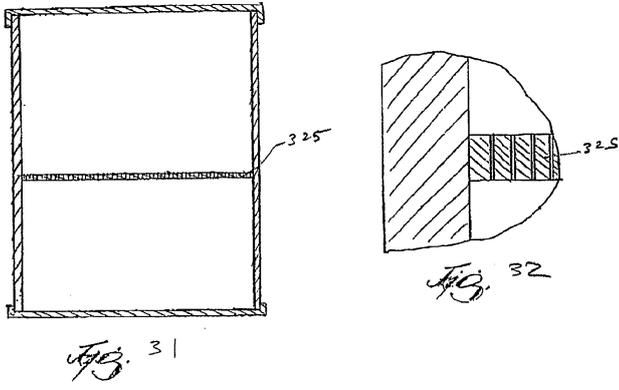
*Fig. 17*

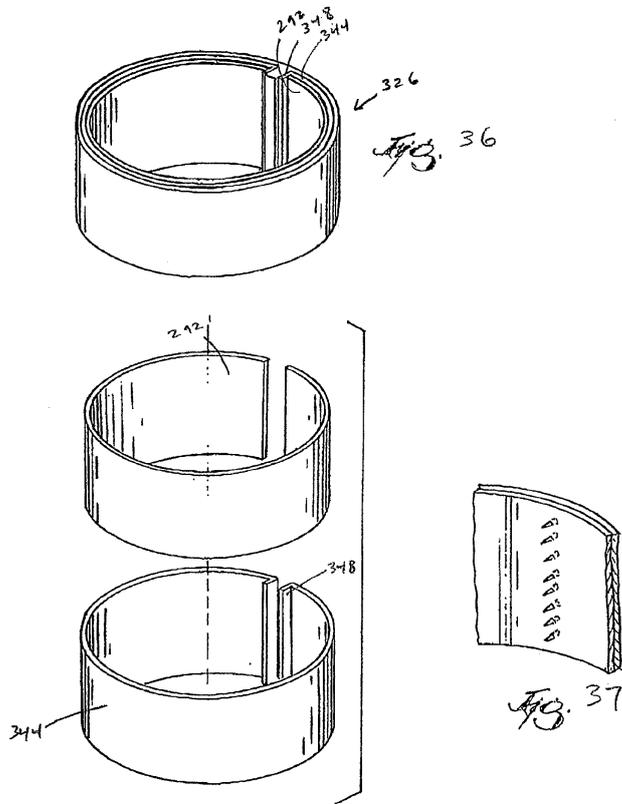














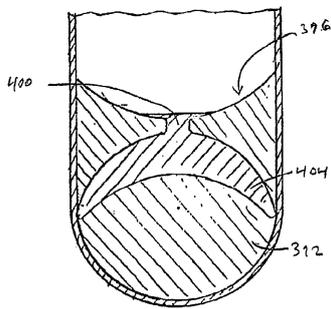


FIG. 41

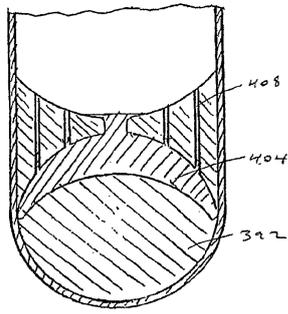


FIG. 42

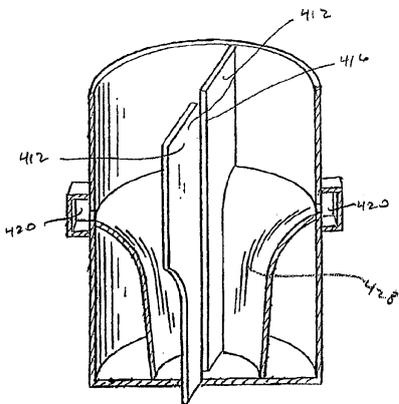


FIG. 43

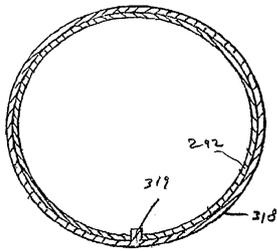
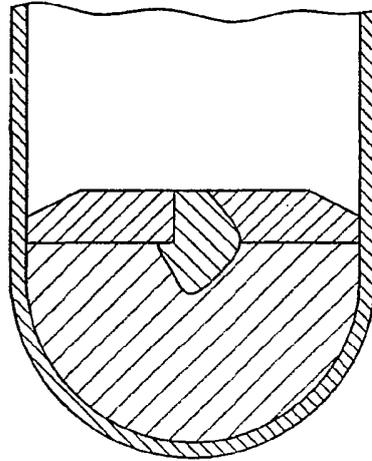
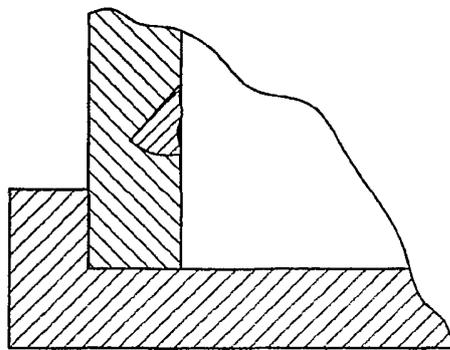


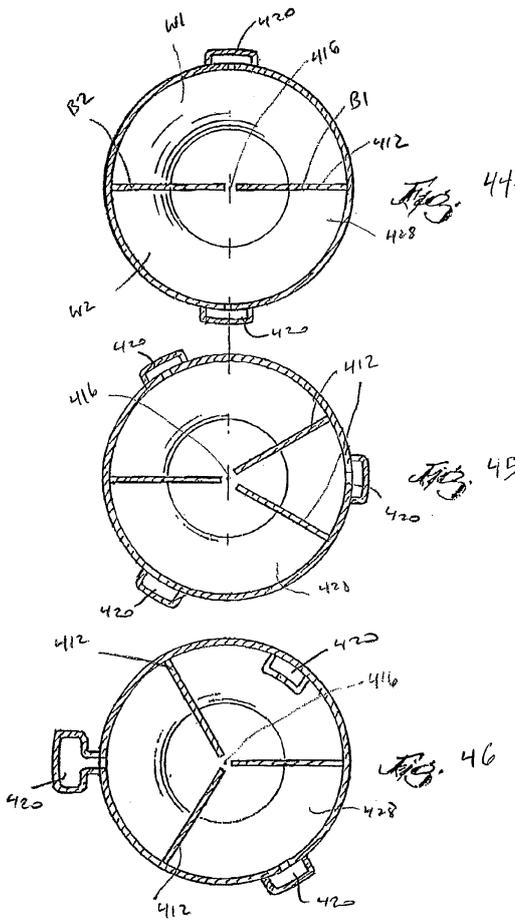
FIG. 39

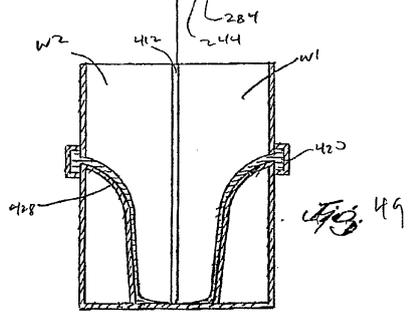
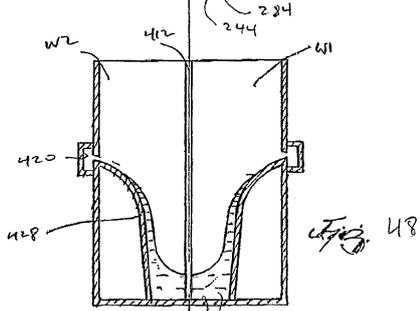
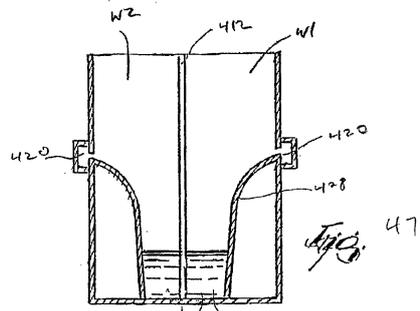


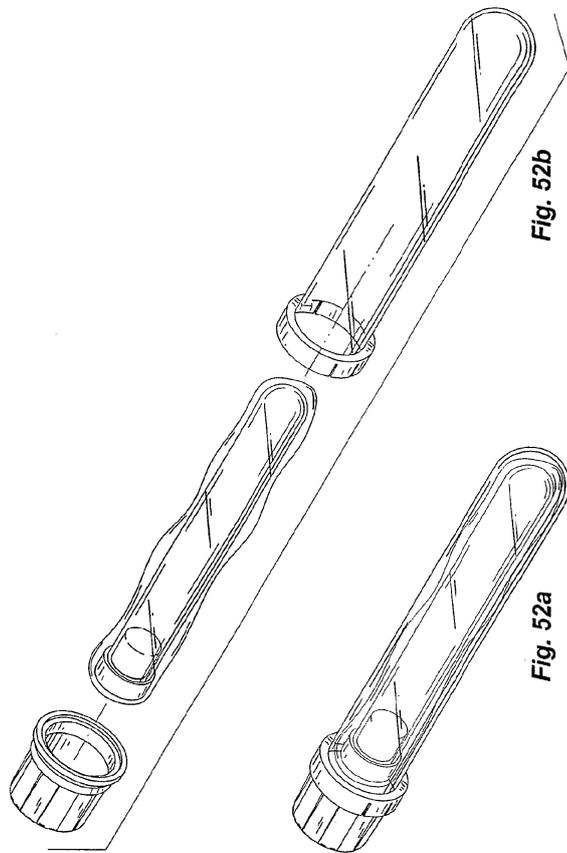
**Fig. 40a**

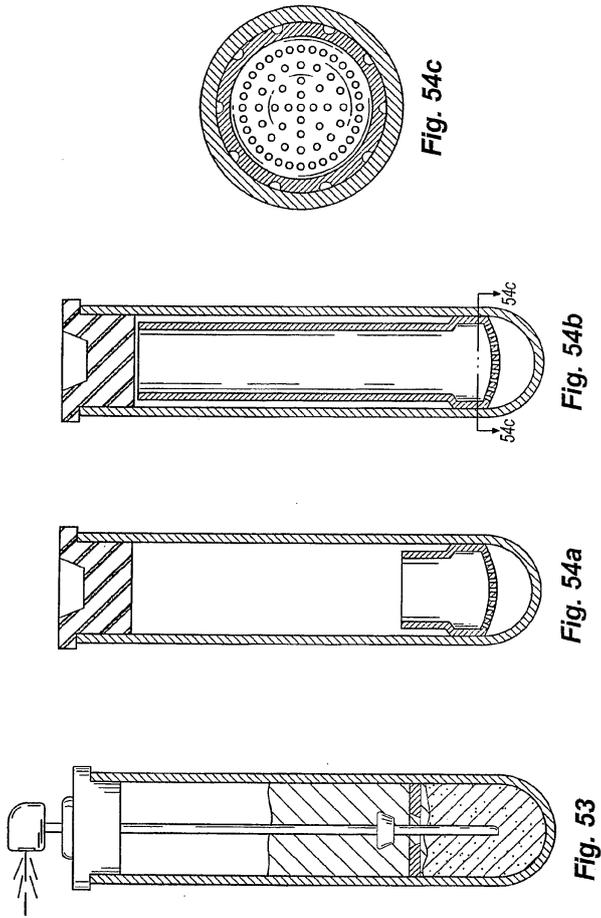


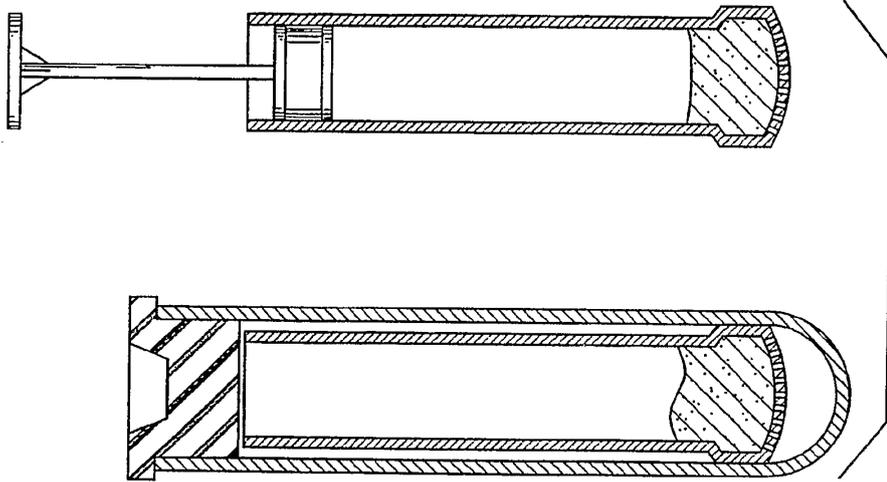
**Fig. 40b**



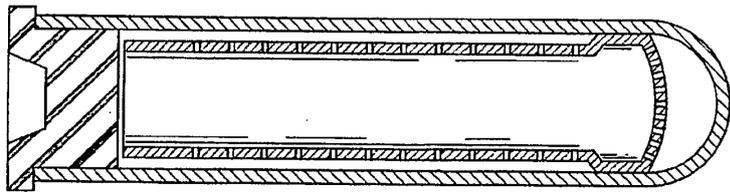




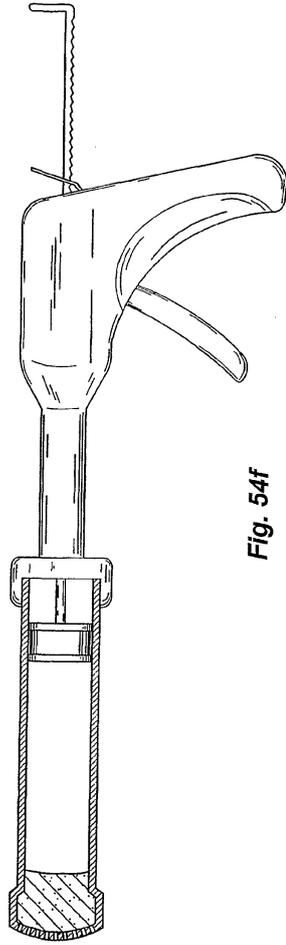




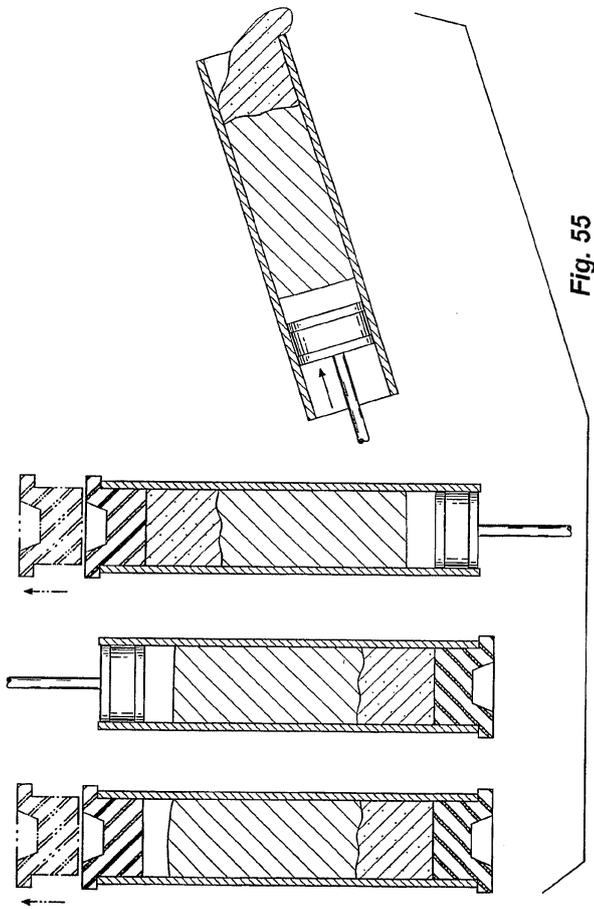
*Fig. 54e*



*Fig. 54d*



*Fig. 54f*



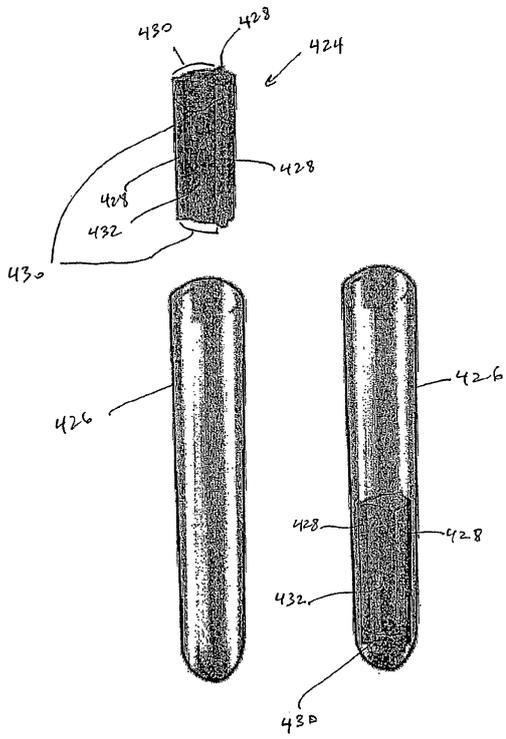


Fig. 56