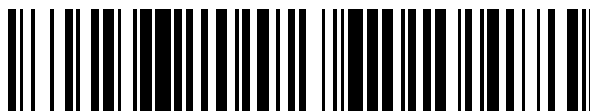


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 759**

51 Int. Cl.:

A61L 27/38 (2006.01)
C12N 5/078 (2010.01)
C12N 7/00 (2006.01)
A61L 27/24 (2006.01)
A61F 2/00 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2009 E 09850622 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 2491961**

54 Título: **Composición para inducir la regeneración tisular por activación de plasma rico en plaquetas (PRP) y procedimiento para fabricarla**

30 Prioridad:

23.10.2009 KR 20090101387

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

15.01.2015

73 Titular/es:

**SEWON CELLONTECH CO., LTD (100.0%)
Hanguk HP Building, 83 Uisadang-daero,
Yeongdeungpo-gu
Seoul, KR**

72 Inventor/es:

**PARK, HYUN-SHIN;
YU, JI-CHUL;
PARK, JU-HEE;
KIM, JANG-HOON;
KIM, HUN;
LEE, SAE-BOM;
JANG, JAE-DEOG y
JANG, CHEONG-HO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 526 759 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

Composición para inducir la regeneración tisular por activación de plasma rico en plaquetas (PRP) y procedimiento para fabricarla

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una composición para inducir la regeneración tisular al activar plasma rico en plaquetas (PRP) con una solución de cloruro de calcio y colágeno de tipo I y a un procedimiento para fabricarla. Más en particular, en la presente invención, la composición puede tener una formación de tipo gel que contenga PRP y se puede trasplantar en cualquier lesión con necesidad de regeneración tisular en casos tales como el tratamiento de defectos óseos y la cicatrización de heridas y, en consecuencia, se puede activar el PRP para inducir un factor de crecimiento que es útil para la regeneración tisular a partir del PRP para lograr de forma cómoda y rápida una regeneración tisular eficaz. En consecuencia, el procedimiento es muy útil para potenciar sumamente la credibilidad de la aplicación de PRP a lesiones y presentar una buena imagen ante los consumidores.

Técnica anterior

15 Como se sabe en general, el plasma rico en plaquetas (PRP) es un material autólogo separado de la sangre completa por centrifugación en gradiente de densidad y es una sustancia inactiva que incluye una gran cantidad de plaquetas concentradas con respecto a una pequeña cantidad de plasma y contiene leucocitos en una concentración alta.

20 En el interior de un vaso sanguíneo, las plaquetas inactivadas mantienen una forma redonda al tiempo que circulan por el vaso sanguíneo. Se sabe que las plaquetas tienen una vida útil de aproximadamente 10 días y que están presentes en una cantidad de aproximadamente $2-4 \times 10^8$ con respecto a 1 ml de sangre.

25 La plaquetas del PRP se activan por medio de sustancias incluidas en el interior del vasos sanguíneo y después liberan factores de crecimiento y diversas sustancias activas. Las sustancias activadoras incluyen colágeno, trombina, difosfato de adenosina (ADP) y epinefrina. En especial, el colágeno y la trombina son conocidos como agonistas fuertes. Se sabe que el colágeno induce la activación de las plaquetas a través de la adhesión de su secuencia específica a las plaquetas, como se muestra en la FIG. 1.

30 Cuando los factores activadores activan las plaquetas, las plaquetas liberan factores de crecimiento debido a la desgranulación de sus gránulos alfa. Los factores desempeñan un papel importante en la cicatrización inicial de las heridas. En el presente documento, los factores de crecimiento liberados incluyen el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-AB), el factor de crecimiento transformante b1 (TGF-b1), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento insulinoide (IGF) y similares. Asimismo, el PRP libera citocinas, etc. en condiciones *in vitro*, de modo que se sintetiza ADN de fibroblastos. Esto aumenta la producción de colágeno y, por tanto, permite que se organice una estructura de colágeno.

35 Sin embargo, en la aplicación de PRP en estado líquido, es difícil inyectar el PRP en una herida y se produce la pérdida de tejidos circundantes. Por tanto, es necesario desarrollar la gelificación para la coagulación acompañada de propiedades físicas. Para la gelificación, recientemente, se ha llevado a cabo principalmente investigación sobre el uso de la trombina. Sin embargo, en un informe se recoge que al usar trombina (principalmente de origen bovino), que es una proteína de origen animal, se observó una reacción inmunitaria tal como el lupus. En otras palabras, se sabe que la trombina es un factor que plantea problemas clínicos relacionados con un anticuerpo. La trombina es el componente más potente como activador de plaquetas. Sin embargo, cuando se usa trombina, son necesarios anticuerpos frente a la trombina, la protrombina, el factor V y la cardiolipina. Asimismo, a través de la investigación en animales, se ha descubierto que hay problemas clínicos como las hemorragias postoperatorias y un síndrome autoinmunitario. Aunque estos problemas se producen con poca frecuencia, no pueden obviarse en el desarrollo. El uso de trombina puede provocar la extensión de una herida dañada, una resistencia anómala del gel o similar.

45 Además, debido a la gran capacidad de contracción de un gel activador de la trombina, existe una dificultad en el procedimiento quirúrgico para rellenar el espacio de una herida. Por tanto, se ha reconocido la importancia de un material que reemplace a la trombina.

50 El colágeno es una proteína fibrosa rígida y es uno de los principales componentes proteínicos del tejido conjuntivo de los mamíferos. Constituye hasta el 30 % o más de las proteínas totales. El colágeno proporciona forma, resistencia y flexibilidad al tejido y tiene diversas funciones tales como constituir el andamiaje tisular, la adhesión celular, la migración celular, la producción de vasos sanguíneos, la morfogenia tisular, la reparación de tejidos y similares. Como fuerte agonista de las plaquetas, el colágeno activa las plaquetas y provoca la agregación plaquetaria. El colágeno fibrilar induce más fuertemente la agregación plaquetaria y soporta una mayor adhesión de plaquetas que el colágeno soluble. Aunque el motivo de dicha diferencia no se ha demostrado claramente, se supone que existe la posibilidad de que el colágeno fibrilar se una a una molécula y aumente la acción de las plaquetas activadas.

55 El colágeno de tipo I constituye la mayor parte del tejido conjuntivo de los mamíferos. Asimismo, como andamiaje

natural, la investigación más activa se desarrolla en los campos de la medicina regeneradora y la ingeniería de tejidos. Debido a estas ventajas del colágeno de tipo I, el colágeno de tipo I desempeña un papel de activación de las plaquetas al reemplazar a la trombina y mantener la forma.

5 La publicación de patente US 6322785 B1 muestra una composición para inducir la regeneración tisular por activación de PRP con una solución de cloruro de calcio y el colágeno de tipo I.

Divulgación

Problema técnico

10 Por lo tanto, se ha preparado la presente invención en vista de los problemas mencionados anteriormente, y proporciona una composición para inducir la regeneración tisular por activación de plasma rico en plaquetas (PRP) y un procedimiento para fabricarla. La presente invención logra los siguientes objetivos. En primer lugar, se usa colágeno de tipo I con el fin de mejorar una reacción inmunitaria y problemas clínicos, donde la reacción inmunitaria y los problemas clínicos se originan cuando se usa plasma rico en plaquetas (PRP) junto con una proteína de origen animal, es decir, trombina (principalmente de origen bovino). En segundo lugar, para el tratamiento de defectos óseos o la cicatrización de heridas, se obtiene una pequeña cantidad de sangre, se separa el PRP de la sangre completa y se inyecta mezclado con colágeno de tipo I. En otras palabras, con el fin de eliminar el rechazo clínico, se usan plasma rico en plaquetas (PRP) como material autólogo y atelocolágeno, que provoca menos reacciones inmunitarias. En tercer lugar, el PRP se separa de forma práctica y rápida *in situ* para un procedimiento quirúrgico y se inyecta en una mezcla con una solución de cloruro de calcio y colágeno de tipo I, de modo que se puede lograr una regeneración tisular eficaz para pacientes con lesiones graves o pacientes que se someten a procedimientos quirúrgicos repetitivos. En cuarto lugar, cuando se aplica el PRP obtenido de acuerdo con la presente invención a una región que necesita una regeneración tisular en una mezcla con una solución de cloruro de calcio y colágeno de tipo I, el colágeno de tipo I activa el PRP e induce factores de crecimiento útiles para la regeneración tisular a partir del gel de PRP. Esto resulta eficaz para logra de forma práctica y rápida la regeneración tisular. Especialmente, en quinto lugar, la coagulación del colágeno de tipo I como agonista con el PRP puede liberar una cantidad similar o mayor de factores de crecimiento de acuerdo con los tipos de factores de crecimiento, que la de la coagulación de la trombina como agonista con el PRP. Esto induce una regeneración tisular más eficaz. Además, en sexto lugar, el PRP obtenido de acuerdo con la presente invención se inyecta en una mezcla con una solución de cloruro de calcio y colágeno de tipo I en todas las regiones que necesitan tratamiento de defectos óseos o cicatrización de heridas, de modo que se logra una regeneración tisular eficaz. Por último, en séptimo lugar, como consecuencia, la invención potencia sumamente la credibilidad de la aplicación de PRP a lesiones y presenta una buena imagen ante los consumidores.

Solución técnica

35 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de fabricación de una composición para inducir la regeneración tisular por activación de plasma rico en plaquetas (PRP); el procedimiento, como se define en las reivindicaciones, incluye las etapas de: separar el PRP de la sangre completa, mezclar el PRP con una solución de cloruro de calcio y mezclar una mezcla del PRP y la solución de cloruro de calcio con colágeno de tipo I.

Efectos ventajosos

40 Como se describe en detalle anteriormente en el presente documento, en la presente invención se usa colágeno de tipo I con el fin de mejorar la reacción inmunitaria y los problemas clínicos, donde la reacción inmunitaria y los problemas clínicos se provocan cuando se usa plasma rico en plaquetas (PRP) junto con una proteína de origen animal, es decir, trombina (principalmente de origen bovino).

45 En la configuración técnica de la presente invención descrita anteriormente, para el tratamiento de defectos óseos o cicatrización de heridas, se obtiene una pequeña cantidad de sangre, se separa el plasma rico en plaquetas (PRP) de la sangre completa y se inyecta mezclado con colágeno de tipo I. En otras palabras, con el fin de eliminar el rechazo clínico, se usan PRP como material autólogo y atelocolágeno, provocando menos reacciones inmunitarias.

50 Asimismo, en la presente invención, el PRP se separa de forma práctica y rápida *in situ* para un procedimiento quirúrgico y se inyecta en una mezcla con una solución de cloruro de calcio y colágeno de tipo I, de modo que se puede lograr una regeneración tisular eficaz para pacientes con lesiones graves o pacientes que se someten a procedimientos quirúrgicos repetitivos.

Además, cuando se aplica el PRP obtenido de acuerdo con la presente invención a una región que necesita una regeneración tisular en una mezcla con una solución de cloruro de calcio y colágeno de tipo I, el colágeno de tipo I activa el PRP e induce factores de crecimiento útiles para la regeneración tisular a partir del gel de PRP. Esto es eficaz para lograr de forma práctica y rápida la regeneración tisular.

55 Especialmente, en la presente invención, la coagulación del colágeno de tipo I como agonista con el PRP puede liberar una cantidad similar o mayor de factores de crecimiento de acuerdo con los tipos de factores de crecimiento,

que la de la coagulación de la trombina como agonista con el PRP. Esto induce una regeneración tisular más eficaz.

Además, el PRP obtenido de acuerdo con la presente invención se inyecta en una mezcla con una solución de cloruro de calcio y colágeno de tipo I en todas las regiones que necesitan tratamiento de defectos óseos o cicatrización de heridas, de modo que se logra una regeneración tisular eficaz.

- 5 Por último, como consecuencia, la invención potencia sumamente la credibilidad de la aplicación de PRP a lesiones y presenta una buena imagen ante los consumidores.

Breve descripción de los dibujos

Los objetivos anteriores y otros, las características y otras ventajas de la presente invención resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, tomada en conjunto con los dibujos adjuntos, en los que:

- 10 la FIG. 1 es una vista que ilustra un modelo en el que se producen de forma secuencial adsorción y activación, y la agregación avanza a través de una interacción entre las plaquetas y proteínas subendoteliales;

- la FIG. 2 muestra fotografías de 1 ml de plasma rico en plaquetas (PRP) separado de la sangre completa en una mezcla con una solución de cloruro de calcio y colágeno de tipo I, en las que en la FIG. 2(a), se incluye la solución de cloruro de calcio en una cantidad de 0,25 mg/ml, en la FIG. 2(b), se incluye la solución de cloruro de calcio en una cantidad de 0,3 mg/ml y en la FIG. 2(c), se incluye la solución de cloruro de calcio en una cantidad de 0,5 mg/ml; y
- 15

la FIG. 3 muestra fotografías del cultivo de una mezcla de trombina convencional (A) y de la mezcla de colágeno de tipo I de la invención (B).

Descripción detallada de la invención

- 20 A continuación en el presente documento se describirá en detalle un modo de realización preferente de acuerdo con la presente invención para mostrar estos efectos con referencia a los dibujos adjuntos.

De acuerdo con la presente invención, una composición para inducir la regeneración tisular por activación de plasma rico en plaquetas (PRP) y un procedimiento para fabricarla se configuran como se muestran en las FIG. 2 y 3.

- 25 En las siguientes descripciones de la presente invención, se omitirán la descripción detallada de funciones conocidas y las configuraciones incorporadas en el presente documento cuando se determine que la descripción detallada de las funciones y las configuraciones conocidas puede oscurecer innecesariamente el asunto objeto de la presente invención.

Asimismo, los términos descritos a continuación se establecen teniendo en cuenta sus funciones en la invención, que pueden variar de acuerdo con el propósito de un fabricante o el uso convencional. Por tanto, sus definiciones se pueden basar en la descripción de esta memoria descriptiva.

- 30 En primer lugar, en la presente invención una composición para inducir la regeneración tisular por activación de plasma rico en plaquetas (PRP) se fabrica mediante las etapas de: separar el PRP de la sangre completa, mezclar el PRP con una solución de cloruro de calcio y mezclar la mezcla del PRP y la solución de cloruro de calcio con colágeno de tipo I.

- 35 Al mismo tiempo, en la presente invención, la composición se puede aplicar de diversas maneras y se puede preparar de distintas formas.

Asimismo, se entenderá que la presente invención no se limita a modos de realización específicos mencionados en la descripción detallada y que en el espíritu y el alcance de las reivindicaciones adjuntas de la presente invención se incluyen modificaciones, equivalentes y alternativas.

- 40 A continuación en el presente documento se describirán los efectos funcionales del procedimiento de la invención de fabricación de la composición para inducir la regeneración tisular por activación de PRP, como se configura anteriormente.

En primer lugar, el procedimiento de la invención incluye la etapa de separar el PRP de la sangre completa.

- 45 En el presente documento, la etapa de separar el PRP de la sangre completa incluye la etapa de obtener 10 ml de sangre completa de un animal o un paciente, disponerlos en un tubo de ensayo a vacío que contenga citrato de sodio al 3,2 % y, primariamente, centrifugar la sangre completa (1.750~1.900 g) durante de 3 a 5 minutos.

Después, a través de la configuración, se obtiene un sobrenadante líquido (capa de plasma) que incluye la capa leucocítica.

El sobrenadante líquido obtenido (capa de plasma) que incluye la capa leucocítica se transfiere a un nuevo tubo de ensayo a vacío con una aguja roma y se centrifuga una segunda vez (4.500~5.000 g) durante de 4 a 6 minutos.

Después, se obtiene el PRP concentrado en una capa inferior (desde el fondo hasta una altura de aproximadamente 1 ml del tubo de ensayo) con una aguja roma.

Asimismo, el procedimiento de la invención incluye la etapa de mezclar el PRP con una solución de cloruro de calcio.

- 5 En el presente documento, en la etapa de mezclar el PRP con la solución de cloruro de calcio, se mezcla una vez aproximadamente 1 ml de PRP obtenido en la etapa de separación del PRP de la sangre completa con una solución de cloruro de calcio con una concentración de 0,30~0,55 mg/ml mediante un conector de tres vías.

Asimismo, el procedimiento de la invención incluye la etapa de mezclar la mezcla del PRP y la solución de cloruro de calcio con colágeno de tipo I con el fin de fabricar la composición para inducir la regeneración tisular por activación del PRP.

- 10 En el presente documento, la etapa de mezclar la mezcla del PRP y la solución de cloruro de calcio con colágeno de tipo I incluye la etapa de dejar el colágeno de tipo I a temperatura ambiente.

Después, se mezcla la mezcla del PRP y la solución de cloruro de calcio con el colágeno de tipo I opaco con una concentración de 20~50 mg/ml cuatro veces a través de una conexión mediante un conector de tres vías.

- 15 A continuación, se inyecta la mezcla del PRP y el colágeno de tipo I, cargada en una jeringuilla, en todas las regiones que necesiten regeneración tisular en casos tales como el tratamiento de defectos óseos y la cicatrización de heridas.

Preferentemente, el colágeno de tipo I tiene una concentración de 20~50 mg/ml.

Además, preferentemente, el colágeno de tipo I se deja a temperatura ambiente durante de 15 a 30 minutos.

A continuación en el presente documento se describirán ejemplos de la presente invención.

20 **Ejemplo 1**

En primer lugar, se prepara un kit para la separación de PRP como se indica a continuación.

- 1) Un tubo de ensayo a vacío que contiene citrato de sodio al 3,2 %
- 2) Un soporte para tubos de ensayo a vacío
- 3) Una aguja para tubos de ensayo a vacío
- 25 4) Un tubo de ensayo a vacío (de tipo sin aditivos)
- 5) Una jeringuilla de 3 ml
- 6) Una aguja roma

A partir de los componentes mencionados anteriormente se puede deducir un procedimiento de separación de PRP. En primer lugar,

- 30 1) Se obtienen 10 ml de sangre completa de un paciente en un tubo de ensayo a vacío que contenga citrato de sodio al 3,2 %
- 2) Se centrifuga la sangre completa cargada en el tubo de ensayo a vacío (1.750~1.900 g) durante de 3 a 5 minutos. En el presente documento, se fijan la aceleración de la gravedad y el tiempo del separador por centrifugación para que alcancen niveles óptimos para separar la sangre completa en los hemocitos, la capa leucocítica y el plasma.
- 35 3) Después de abrir la tapa del tubo de ensayo a vacío, se obtiene un sobrenadante líquido (capa de plasma) que incluye la capa leucocítica y se transfiere a un nuevo tubo de ensayo a vacío (de tipo sin aditivos) mediante el uso de una jeringuilla provista de una aguja roma.
- 4) El plasma que incluye la capa leucocítica, transferido a un nuevo tubo de ensayo a vacío, se centrifuga (4.500~5.000 g) durante de 4 a 6 minutos. En el presente documento, se fijan la aceleración de la gravedad y el tiempo del separador por centrifugación para que alcancen niveles óptimos para concentrar el PRP del plasma.
- 40 5) Después de que se abra la tapa del tubo de ensayo a vacío, se obtiene el PRP concentrado en una capa inferior del tubo de ensayo (desde el fondo hasta la altura de aproximadamente 1 ml del tubo de ensayo) mediante el uso de una jeringuilla provista de una aguja roma.

- 45 6) Con el fin de determinar la eficacia de la separación de 1 ml de plaquetas separadas de partir de 10 ml de sangre completa, se hacen reaccionar un marcador de superficie específico de plaquetas, es decir, CD41, y un marcador de superficie específico de leucocitos, es decir, CD45. Después, se usa la citometría de flujo para cuantificar el número

de células con expresión. Como consecuencia, el número de plaquetas del PRP separado es de 5,8 a 7,6 veces mayor que el valor de referencia. En las recomendaciones exigidas clínicamente, se exige que el número sea de 4,0 a 6,0 veces (aproximadamente 1.000.000 de plaquetas/ml) mayor que el valor de referencia por volumen de 6 ml de sangre completa. Por tanto, el procedimiento de separación de PRP cumple las recomendaciones. Asimismo, el número de leucocitos es de 2,8 a 4,2 mayor que el valor de referencia. Por tanto, al aplicar el PRP, se espera lograr un efecto antivírico.

Asimismo, como se indica en la tabla siguiente, se centrifuga la sangre completa (1º: a 1.750~1.900 g, de 3 a 5 minutos, 2º: a 4.500~5.000 g, de 4 a 6 minutos) dos veces para separar 1 ml de PRP. Después, se hacen reaccionar un marcador de superficie específico de plaquetas, es decir, CD41, y un marcador de superficie específico de leucocitos, es decir, CD45. Después, se usa la citometría de flujo para medir el número de células con expresión. Como consecuencia, el número de plaquetas del PRP separado es de 5,8~7,6 mayor que el valor de referencia y el número de leucocitos es de 2,8 a 4,2 mayor que el valor de referencia.

Tabla 1

Muestra	Recuento plaquetario ($\times 10^8/\text{ml}$)		Leucocitos ($\times 10^6/\text{ml}$)	
	Valor de referencia para sangre completa	PRP (veces el valor de referencia)	Valor de referencia para sangre completa	PRP (veces el valor de referencia)
Muestra 1	2,46	14,81 (6,02)	8,7	29,7 (3,41)
Muestra 2	1,18	11,27 (6,20)	4,3	14,9 (3,50)
Muestra 3	2,11	15,24 (7,22)	5,0	20,9 (4,18)
Muestra 4	2,62	16,15 (6,16)	12,1	39,3 (3,27)
Muestra 5	1,94	11,58 (6,00)	4,6	12,9 (2,80)
Muestra 6	2,36	20,09 (5,81)	6,2	25,2 (4,06)
Muestra 7	2,55	17,48 (6,85)	6,4	30,7 (4,80)
Muestra 8	1,77	13,52 (7,64)	4,8	17,9 (3,73)
Muestra 9	2,13	15,6 (7,32)	5,0	17,9 (3,58)
Promedio	2,19	15,08 (6,88)	6,3	23,3 (3,7)

15 Ejemplo 2

Se prepara un kit para trasplantar una mezcla de PRP, una solución de cloruro de calcio y colágeno de tipo I como se indica a continuación.

1) Jeringuillas de 1 ml y 3 ml

2) Conector de tres vías

20 2) Una solución de cloruro de calcio

3) 20~50 mg/ml de colágeno de tipo I

A partir de los componentes mencionados anteriormente, se puede deducir un procedimiento de trasplante de la mezcla del PRP, la solución de cloruro de calcio y el colágeno de tipo I. En primer lugar,

25 1) se conecta una jeringuilla cargada con 1 ml de PRP a una jeringuilla cargada con una solución de cloruro de calcio con una concentración de 0,30~0,55 mg/ml a través de un conector de tres vías y se mezclan una vez los materiales.

30 En otras palabras, la FIG. 2 muestra fotografías de 1 ml de PRP separado de la sangre completa en una mezcla con una solución de cloruro de calcio y colágeno de tipo I, en las que en la FIG. 2(a) se incluye la solución de cloruro de calcio en una cantidad de 0,25 mg/ml, en la FIG. 2(b) se incluye la solución de cloruro de calcio en una cantidad de 0,3 mg/ml y en la FIG. 2(c), se incluye la solución de cloruro de calcio en una cantidad de 0,5 mg/ml. En la presente invención, para la agregación plaquetaria de la mezcla de la solución de cloruro de calcio y el colágeno de tipo I, la concentración óptima de cloruro de calcio oscila preferentemente desde 0,30 a 0,55 mg/ml.

35 Un ion de calcio (Ca^{2+}) como componente de una solución de cloruro de calcio desempeña el papel de convertir la solubilidad en insolubilidad en la coagulación sanguínea. Dicha característica del ion de calcio (Ca^{2+}) induce la agregación plaquetaria de la mezcla de 1 ml de PRP separado y colágeno de tipo I. Después, si la concentración de la solución de cloruro de calcio para la agregación plaquetaria es de 0,25 mg/ml o menos, no se forma la agregación plaquetaria. Por otro lado, si la concentración es de 0,55 mg/ml o más, se produce daño celular por la presión osmótica.

- 2) El colágeno de tipo I con una concentración de 20-50 mg/ml se deja a temperatura ambiente durante de 15 a 30 minutos para hacer que el colágeno soluble cambie a colágeno fibrilar. En el presente documento, el motivo por el que se deja el colágeno de tipo I a temperatura ambiente es el siguiente: en primer lugar, se temple el colágeno de tipo I, de modo que el colágeno de tipo I en estado de colágeno soluble se puede convertir en colágeno fibrilar; en segundo lugar, prácticamente no hay diferencias en las cantidades de factores de crecimiento liberados entre la mezcla de colágeno de tipo I convertido en colágeno fibrilar con el PRP y la mezcla de colágeno de tipo I en un estado de colágeno soluble con el PRP; y en tercer lugar, en general, el colágeno de tipo I convertido en colágeno fibrilar puede inducir la agregación plaquetaria y soportar la adhesión plaquetaria de forma más eficaz que el colágeno soluble.
- 3) Se conecta una jeringuilla cargada con la mezcla de 1 ml de PRP y la solución de cloruro de calcio a la misma cantidad de colágeno de tipo I fibrilar con una concentración de 20~50 mg/ml a través de un conector de tres vías y se mezclan los materiales entre sí cuatro veces.
- 4) Se inyecta la mezcla del PRP, la solución de cloruro de calcio y el colágeno de tipo I, cargada en una jeringuilla, en todas las regiones que necesiten regeneración tisular en casos tales como el tratamiento de defectos óseos y la cicatrización de heridas.

Ejemplo 3

- 1) Se carga una mezcla del PRP, una solución de cloruro de calcio y colágeno de tipo I, cargada en una jeringuilla, en un tubo de vidrio de fondo redondo.
- 2) Se cultiva la mezcla en una estufa de incubación a 37 °C durante 15 minutos y se coagula. En el presente documento, a través del cultivo de la mezcla en la estufa de incubación a 37 °C, es posible lograr la misma condición que si se trasplantara la mezcla a una región tisular y coagulara.
- 3) Se dispone la mezcla coagulada en un recipiente de cultivo esterilizado de 24 pocillos al que se le añade 1 ml de DMEM y se cultiva en una estufa de incubación a 37 °C.

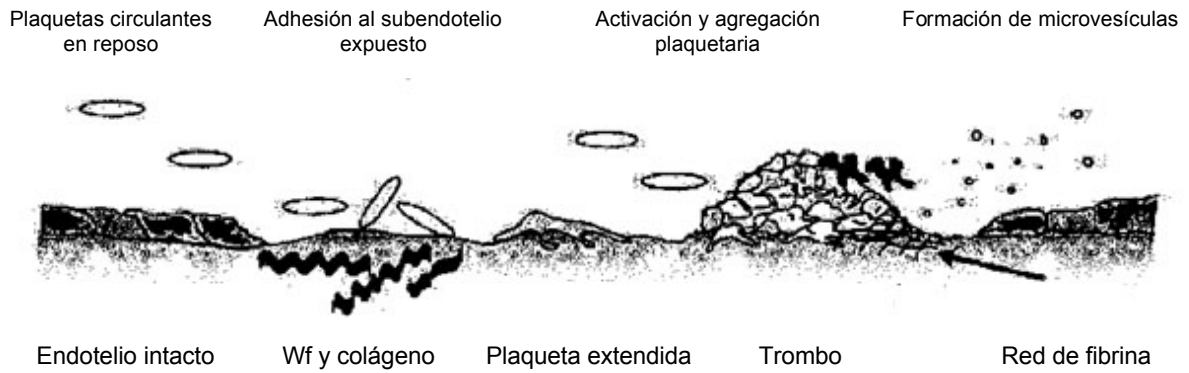
A través del procedimiento descrito anteriormente, se obtienen 10 ml de sangre completa de un paciente y se someten a dos etapas de centrifugación para dar 1 ml de PRP concentrado. El PRP se mezcla en primer lugar con una solución de cloruro de calcio y, en segundo lugar, se mezcla con colágeno de tipo I. Después, se trasplanta la mezcla en todas las regiones que necesiten regeneración tisular en casos tales como el tratamiento de defectos óseos y la cicatrización de heridas. En este procedimiento no se produce rechazo clínico. Asimismo, es posible separar el PRP, mezclar el PRP con colágeno de tipo I y trasplantar la mezcla en un plazo de tiempo corto. Por tanto, es posible inducir de forma eficaz y rápida la regeneración tisular tal como en el tratamiento de defectos óseos y la cicatrización de heridas.

Especialmente, la FIG. 3 muestra cultivos cuando se activó el PRP separado con cada uno de trombina y colágeno de tipo I y se cultivó un medio de cultivo en una estufa de incubación con CO₂ al 5 % (a 37 °C). Después de 15 días, la mayor parte de una mezcla convencional con trombina (A) se había degradado. Por otro lado, la mezcla de colágeno de la invención (B) mantuvo su forma inicial con pocos cambios de tamaño durante 15 días.

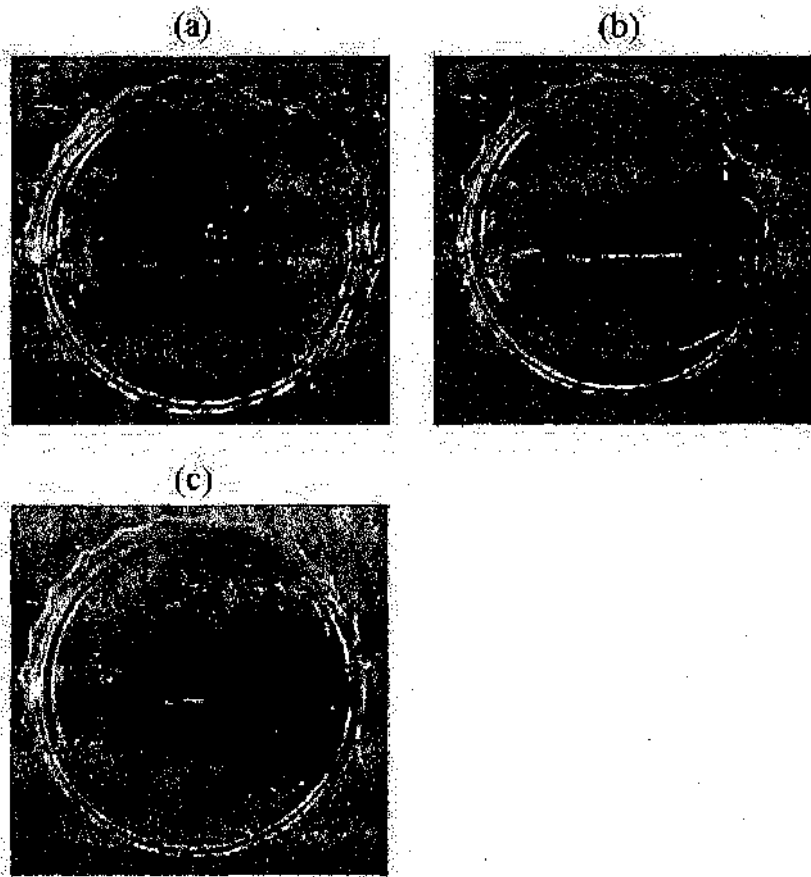
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de fabricación de una composición para inducir la regeneración tisular por activación de plasma rico en plaquetas (PRP), comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- separar el PRP de la sangre completa;
- 5 mezclar el PRP con una solución de cloruro de calcio; y
- mezclar una mezcla del PRP y la solución de cloruro de calcio con colágeno de tipo I;
- en el que la etapa de separar el PRP de la sangre completa comprende las etapas de:
- 10 obtener 10 ml de la sangre completa de un animal o un paciente en un tubo de ensayo a vacío que contenga citrato de sodio al 3,2 % y, primariamente, centrifugar la sangre completa obtenida (1.750~1.900 g) durante de 3 a 5 minutos;
- obtener un sobrenadante líquido (capa de plasma) que comprende la capa leucocítica a través de dicha centrifugación;
- transferir el sobrenadante líquido obtenido (capa de plasma) que comprende la capa leucocítica a un nuevo tubo de ensayo a vacío con una aguja roma y centrifugarlo una segunda vez (4.500~5.000 g) durante de 4 a 6 minutos; y
- 15 obtener el PRP concentrado en una capa inferior (desde el fondo hasta una altura de aproximadamente 1 ml del tubo de ensayo) con una aguja roma.
2. El procedimiento como se reivindica en la reivindicación 1, en el que en la etapa de mezclar el PRP con la solución de cloruro de calcio, se mezcla una vez aproximadamente 1 ml de PRP obtenido por un procedimiento de separación del PRP de la sangre completa con la solución de cloruro de calcio con una concentración de
- 20 0,30~0,55 mg/ml mediante un conector de tres vías.
3. El procedimiento como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la etapa de mezclar la mezcla del PRP y la solución de cloruro de calcio con el colágeno de tipo I comprende las etapas de:
- dejar el colágeno de tipo I a temperatura ambiente;
- 25 mezclar cuatro veces la mezcla del PRP y la solución de cloruro de calcio con el colágeno de tipo I con una concentración de 20~50 mg/ml, en una fase opaca, a través de una conexión mediante un conector de tres vías; e
- inyectar la mezcla del PRP y el colágeno de tipo I, cargada en una jeringuilla, en todas las regiones que necesiten regeneración tisular en casos tales como el tratamiento de defectos óseos y la cicatrización de heridas.
4. El procedimiento como se reivindica en la reivindicación 3, en el que el colágeno de tipo I tiene una concentración de 20~50 mg/ml.
- 30 5. El procedimiento como se reivindica en la reivindicación 3, en el que el colágeno de tipo I se deja a temperatura ambiente durante de 15 a 30 minutos.

[FIG. 1]



[FIG. 2]



[FIG. 3]

