(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 548 454**

(51) Int. CI.:

C12N 5/02 (2006.01)
A61K 35/16 (2015.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2009 E 09774697 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 2304023**

(54) Título: **Fracción plaquetaria derivada de sangre placentaria**

(30) Prioridad:

18.07.2008 IT MI20081316

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.10.2015

(73) Titular/es:

FONDAZIONE IRCCS "CA' GRANDA - OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO" (100.0%)
Via Francesco Sforza, 28
20122 Milano, IT

(72) Inventor/es:

REBULLA, PAOLO;
LAZZARI, LORENZA;
PARAZZI, VALENTINA y
GREPPI, NOEMI

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Fracción plaquetaria derivada de sangre placentaria

La presente invención se refiere a las fracciones plaquetarias que se pueden obtener a partir de sangre placentaria, con concentraciones altas de factores plaquetarios, así como geles y lisados derivados de las mismas. La invención se refiere adicionalmente a los procedimientos para preparar dichas fracciones plaquetarias a partir de sangre placentaria y a los usos de las mismas como tales o como geles plaquetarios o como lisados.

En la técnica se sabe que la sangre humana o animal contiene una fracción plaquetaria. Dicha fracción plaquetaria contiene plaquetas y otros factores o proteínas asociadas a las mismas y puede estar en forma de una suspensión, tal como p.ej. plasma plaquetario, o en una forma sólida, tal como p.ej. plasma liofilizado.

En particular, la fracción plaquetaria se puede encontrar en la parte sanguínea más ligera (plasma) y se puede dividir en dos porciones, es decir, plasma pobre en plaquetas (PPP) y plasma rico en plaquetas (PRP). La división se puede obtener mediante centrifugación adicional.

En el contexto de la presente invención, el término plasma pobre en plaquetas (PPP) se refiere a la porción plasmática más ligera e incluye plaquetas en una concentración por debajo de un millón por microlitro.

En el contexto de la presente invención, el término plasma rico en plaquetas (PRP) se refiere a la porción plasmática menos ligera e incluye plaquetas en una concentración por encima de un millón por microlitro.

La fracción plaquetaria, preferentemente la porción de PRP, se conoce en la técnica por ser útil tanto *in vivo* como *in vitro*.

La fracción plaquetaria se puede usar *in vivo* como un agente hemostático. Usando dicha fracción plaquetaria como agente hemostático cuando se lisan las plaquetas, también se puede observar un efecto terapéutico y estimulante en lesiones relacionadas con cirugía. Esto adicionalmente dio como resultado una segunda aplicación *in vivo*, es decir, la preparación de medicamentos para tratar lesiones y heridas o para incrementar el nuevo crecimiento de una variedad de tejidos dañados.

La fracción plaquetaria también se puede usar *in vitro* como parte de un medio de cultivo celular para mantener vitales los cultivos celulares *in-vitro* y/o para estimular el crecimiento de cultivos celulares *in vitro*. Dicho medio de cultivo se conoce en la técnica y se usa en la expansión o mantenimiento de protocolos para cultivos celulares, entre los que las células madre (p.ej. células madre mesenquimatosas o células madre hematopoyéticas). Dicho medio puede incluir la fracción plaquetaria, preferentemente lisada, tanto en forma de una solución como de un gel, que se mezcla con las células durante el cultivo celular.

Las fuentes de las fracciones plaquetarias que se conocen en la técnica son sangre de mamífero, en particular, sangre humana. Para el uso como un medio de cultivo, se usa una fracción plaquetaria que deriva de suero sanguíneo bovino. Para los usos *in vivo*, la fracción plaquetaria deriva de sangre periférica humana.

Dichas fuentes de componentes plaquetarios implican desventajas y problemas bastante pertinentes.

No se puede usar la sangre periférica de un ser humano (sangre alogénica, de origen no autólogo, pero de un sujeto que pertenezca a la misma especie), puesto que el sistema inmunitario de un ser humano no reconoce dicha fracción plaquetaria como autóloga y dicho reconocimiento da como resultado diversas complicaciones médicas y clínicas que son bien conocidas en la técnica en lo que respecta a procedimientos y dispositivos para trasplantes.

En general, la disponibilidad de sangre autóloga es baja, puesto que puede ser peligroso extraer una cantidad suficiente de un paciente que no pueda tolerar dicha extracción, p.ej. debido a su edad avanzada, debilidad, complicaciones médicas y clínicas asociadas a dicha extracción. La sangre alogénica puede implicar riesgos de infecciones y, como es bien conocido, la sangre alogénica compatible es difícil de encontrar.

El uso de la fracción plaquetaria que deriva de suero sanguíneo bovino o de ternera está limitado a las aplicaciones *in vitro* que no posibiliten los usos para tratamientos o interacciones con el cuerpo humano por motivos de salud obvios relacionados con la posible transmisión de infecciones de animales o contaminaciones a partir de tejidos biológicos animales.

El documento D1 enseña un procedimiento para preparar PRP que implica las etapas de obtener sangre de vena umbilical a partir de recién nacidos a término; mezclar 9 volúmenes de sangre con 1 volumen de un 3,8 % de citrato de sodio; y centrifugar la sangre citrada en 250 g durante 12 minutos a temperatura ambiente.

El documento D2 se refiere a procedimientos para usar PRP, derivado de sangre de adulto, y/o células de fibroblasto y sus lisados para usos dermatológicos, en particular, para el tratamiento de la piel.

El documento D3 se refiere a composiciones que comprenden complejos de células humanas, fibras poliméricas y plaquetas (a partir de adultos), y se refiere a su uso para promover la cicatrización y para el tratamiento de hemorragias.

El documento D4 enseña un procedimiento para preparar concentrados plaquetarios a través de dos centrifugaciones (3000 g, 13 min y, a continuación, 170 g, 5 min), produciendo dicho procedimiento plasma rico en plaquetas y pobre en plaquetas. Se observa que el producto resultante contiene aproximadamente 0,37-106 leucocitos/ml (tabla 1, página 28).

El documento D5 enseña un procedimiento de una etapa para el aislamiento de plaquetas a partir de sangre para análisis. De acuerdo con el documento D5 "es una norma general que el número de centrifugaciones se mantenga en un mínimo para evitar la activación de las plaquetas".

Por lo tanto, todavía existe el problema de encontrar una fracción plaquetaria que pueda superar los problemas divulgados anteriormente, manteniendo, e incluso incrementando, su aplicación potencial.

Sorprendentemente, el solicitante ha descubierto que las fracciones plaquetarias derivadas de la sangre placentaria humana pueden satisfacer las necesidades referidas anteriormente y son más eficaces para los mismos usos.

Un primer aspecto de la presente invención, se refiere a un procedimiento para preparar una fracción plaquetaria que comprende las etapas de preparar sangre placentaria; centrifugar la sangre placentaria a una rotación que oscila de 300 a 900 g durante un periodo que varía de 5 a 20 minutos; y centrifugar la sangre placentaria, a una rotación que oscila entre 50 a 200 g durante un periodo que varía de 5 a 15 minutos.

Preferentemente, el procedimiento de la invención comprende adicionalmente una etapa de centrifugación llevada a cabo a una rotación en el intervalo de 1500 a 2500 g durante un periodo en el intervalo de 10 a 20 minutos.

De acuerdo con un modo de realización preferente, el procedimiento de la invención comprende una etapa de activación de la fracción plaquetaria.

En particular, la etapa de activación comprende añadir y mezclar de 0,1 a 2 ml de gluconato de calcio y de 0,1 a 2 unidades NIH trombínicas de batroxobina por 5,5 ml de la fracción plaquetaria.

De acuerdo con un modo de realización preferente adicional, el procedimiento de la invención comprende adicionalmente una etapa de lisis de la fracción plaquetaria, preferentemente PRP, mediante centrifugación a una rotación de al menos 1700 g, preferentemente a una rotación en el intervalo de 1700 a 2500 g, durante un periodo en el intervalo de 5 a 20 minutos.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una fracción plaquetaria obtenible/obtenida mediante el procedimiento de la invención conteniendo dicha fracción menos de 5x103 linfocitos/ml, preferentemente menos de 1x103 linfocitos/ml.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un plasma pobre en plaquetas, un gel plaquetario o un lisado plaquetario obtenibles/obtenidos mediante el procedimiento de la invención.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un adsorbido sobre una matriz biocompatible, preferentemente, dicha matriz biocompatible es parte de una tirita o venda.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un biorreactor que comprende la fracción plaquetaria, el plasma pobre en plaquetas, el gel plaquetario o el lisado plaquetario de la invención.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a la fracción plaquetaria, el plasma pobre en plaquetas, el gel plaquetario o el lisado plaquetario de la invención para su uso como un medicamento.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a la fracción plaquetaria, el plasma pobre en plaquetas, el gel plaquetario o el lisado plaquetario de la invención para su uso en el tratamiento de un tejido animal dañado, preferentemente un tejido cutáneo ulcerado.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a la fracción plaquetaria, el plasma pobre en plaquetas, el gel plaquetario o el lisado plaquetario de la invención para su uso en el tratamiento de una hemorragia.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de la fracción plaquetaria, el plasma pobre en plaquetas, el gel plaquetario o el lisado plaquetario de la invención para la expansión *in vitro* y la maduración de células eucariotas, preferentemente células eucariotas humanas, más preferentemente células madre eucariotas humanas.

En el contexto de la presente invención, el término sangre placentaria se refiere a la sangre tomada a partir de la placenta, preferentemente a partir del cordón umbilical.

Un objetivo de la presente invención es una fracción plaquetaria que se puede obtener a partir de sangre placentaria de mamífero. Preferentemente, la sangre placentaria de mamífero es sangre placentaria humana.

Dicha fracción plaquetaria se puede obtener a partir de sangre placentaria mediante un procedimiento elegido adecuadamente por el técnico experto entre los que ya se conocen en la técnica. Preferentemente, el procedimiento incluye las siguientes etapas:

i) preparar sangre placentaria, y
ii) aislar la fracción placentaria a partir de restos presentes en la sangre y más pesados que la fracción plaquetaria.

Preferentemente, este aislamiento tiene lugar mediante centrifugación, en el que la fracción plaquetaria se aísla como el componente más ligero que resulta de la centrifugación.

En un modo de realización preferente, se prepara una muestra de sangre placentaria en alícuotas de 1-50 ml, preferentemente de 15-40 ml, más preferentemente de 25-35 ml, y la centrifugación se lleva a cabo a una rotación en el intervalo de 300 a 900 g, preferentemente de 450 a 700 g, más preferentemente de 500 a 600 g, durante un periodo en el intervalo de 5 a 20 minutos, preferentemente de 7 a 15 minutos, más preferentemente de 9 a 11 minutos.

Preferentemente, se lleva a cabo al menos una centrifugación posterior a una rotación en el intervalo de 50 a 200 g, preferentemente de 70 a 150 g, más preferentemente de 90 a 110 g, durante un periodo de 5 a 15 minutos, preferentemente de 7 a 13 minutos, más preferentemente de 9 a 11 minutos, para retirar cualesquiera linfocitos presentes, a fin de impedir que una fracción plaquetaria resultante provoque una reacción inmunógena. El valor de linfocitos que pueden estar presentes está preferentemente por debajo de $5x10^3$ linfocitos/ml, más preferentemente por debajo de $1x10^3$ linfocitos/ml. La presencia de linfocitos se puede determinar usando un hemocitómetro automático, tal como p.ej. ABX Micros CRP.

Dicha fracción plaquetaria está caracterizada por una concentración más alta de factores plaquetarios que la sangre periférica humana. Preferentemente, dichos factores plaquetarios incluyen una selección de factores de crecimiento, hormonas y citocinas. En particular, la concentración de dichos factores plaquetarios es más alta para factores plaquetarios dirigidos a angiogénesis. Dichos factores plaquetarios dirigidos a angiogénesis son preferentemente factores solubles e incluyen más preferentemente los siguientes factores de crecimiento:

- FGFB (factor de crecimiento fibroblástico básico),
- PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), isoforma BB,
- TGF-beta (factor de crecimiento transformante, subespecie beta) y
- VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular).

La concentración de los factores plaquetarios en la fracción plaquetaria se puede cuantificar mediante procedimientos conocidos en la técnica y elegir adecuadamente por el experto técnico, más preferentemente mediante protocolos haciendo uso de la tecnología de ELISA (ensayo de inmunoadsorción enzimática).

En el contexto de la presente invención, la fracción plaquetaria se puede dividir en una porción de PPP y una porción de PRP. Las porciones de PPP y PRP se pueden preparar partiendo de la fracción plaquetaria de acuerdo con la invención mediante una centrifugación posterior de la fracción plaquetaria, en que el componente más pesado descansa sobre la parte inferior en forma de un sedimento. Dicha porción más pesada es PRP y se puede resuspender en un volumen adecuado de líquido fisiológico, preferentemente plasma humano, más preferentemente plasma sanguíneo placentario. Dicho plasma puede consistir en una porción de plasma que deriva de la centrifugación como un sobrenadante, es decir, del propio PPP.

La centrifugación se lleva a cabo a una rotación en el intervalo de 1500 a 2500 g, preferentemente de 1700 a 2300 g, más preferentemente de 1900 a 2100 g, durante un periodo en el intervalo de 10 a 20 minutos, preferentemente de 13 a 17 minutos, más preferentemente de 14 a 16 minutos. Los modos de realización de la presente invención son, por lo tanto, las porciones de PPP y PRP separadas que se pueden obtener a partir de la fracción plaquetaria de acuerdo con la invención. La fracción plaquetaria de acuerdo con la invención tiene niveles de inmunogenia bajos, que son extremadamente más bajos que las fracciones plaquetarias de sangre alogénica. La fracción plaquetaria de acuerdo con la invención adicionalmente tiene un nivel bajo de contaminaciones infecciosas, tales como p.ej. bacterias o virus.

La fracción plaquetaria de acuerdo con la invención pueden estar en forma líquida, en forma sólida (también como un gel) o en forma liofilizada y se puede almacenar en cualquier dispositivo conocido en la técnica para almacenar fracciones plaquetarias o plasma. Las fracciones plaquetarias de acuerdo con la invención se pueden conservar mediente procedimientos elegidos adecuadamente entre los conocidos en la técnica, tales como p.ej. congelar la fracción plaquetaria a -80 °C cuando está en un volumen adecuado de solución fisiológicamente aceptable, preferentemente plasma, más preferentemente plasma sanguíneo placentario.

La fracción plaquetaria de acuerdo con la invención está preferentemente en forma liofilizada. Dicha forma liofilizada se puede transportar, envasar y almacenar fácilmente. En un modo de realización de la invención, dicha fracción plaquetaria está presente en una composición farmacéutica. Dicha composición farmacéutica puede contener excipientes y, dependiendo de las necesidades y de las formulaciones específicas deseadas, puede contener otros principios activos tales como p.ej. otros agentes hemostáticos o moléculas para preparar formulaciones específicas, tales como p.ej. emolientes y tensioactivos.

Otro objetivo de la presente invención es un procedimiento para preparar una fracción plaquetaria como ya se describe anteriormente.

Un objetivo adicional de la invención son los productos que derivan de la lisis y/o la activación de la fracción plaquetaria que se puede obtener como se describe anteriormente, preferentemente a partir de la fracción plaquetaria de PRP. Dichos productos derivados son preferentemente la fracción plaquetaria lisada y/o activada e incluyen los mismos factores plaquetarios como se menciona anteriormente, pero se separan de estructuras macromoleculares plaquetarias y, por lo tanto, se pueden acceder y usar más fácilmente.

El experto técnico puede elegir adecuadamente entre procedimientos y dispositivos conocidos para llevar a cabo dichas lisis y/o dicha activación de plaquetas, tales como p.ej. el uso de colágeno o agentes trombínicos (tales como p.ej. batroxobina) en la activación de plaquetas en la fracción plaquetaria.

En un modo de realización más preferente, la activación plaquetaria produce un gel plaquetario. El experto técnico puede elegir adecuadamente entre procedimientos conocidos en la técnica para preparar geles plaquetarios. Preferentemente, la fracción plaquetaria a ser activada está en forma líquida o se convierte en forma líquida, tal como p.ej. mediante resuspensión en un volumen adecuado de solución fisiológica, antes ser activada.

La activación de la fracción plaquetaria preferentemente incluye las etapas de añadir y mezclar 0,1 a 2 ml, preferentemente 0,5 a 1,5 ml, más preferentemente 0,9 a 1,1 ml de gluconato de calcio y 0,1 a 2 unidades NIH trombínicas, preferentemente 0,5 a 1,5 unidades NIH trombínicas, más preferentemente 0,8 a 1 unidad trombínica de batroxobina por 5-6 ml, preferentemente 5,5 ml de la fracción plaquetaria.

0,9 unidades NIH trombínicas de batroxobina se interpretan preferentemente como correspondientes a aproximadamente 5 unidades Bethesda. Preferentemente, la batroxobina está liofilizada.

En un modo de realización preferente, después de la activación plaquetaria la mezcla se deja reposar, de modo que se forma un gel. Preferentemente, la mezcla se deja reposar durante al menos 2 minutos, más preferentemente durante al menos 5 minutos, todavía más preferentemente durante al menos 8 minutos y e incluso más preferentemente durante al menos 10 minutos.

El lisado se puede obtener mediante un procedimiento que incluye una etapa de lisis de la fracción plaquetaria de acuerdo con la invención. La lisis de las plaquetas en la fracción plaquetaria, preferentemente PRP, se puede llevar a cabo a fin de obtener una suspensión de los factores plaquetarios. La lisis se realiza mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como la aplicación de variaciones de calor repentinas, el uso de tensioactivos o, preferentemente, el uso de una centrífuga enuna rotación de al menos 1700 g, preferentemente a una rotación en el intervalo de 1700 a 2,500 g, preferentemente de 1800 a 2300 g, más preferentemente de 1900 a 2150 g, durante un periodo en el intervalo de 5 a 20 minutos, preferentemente de 7 a 15 minutos, más preferentemente de 9,5 a 10,5 minutos. En un modo de realización, la lisis se puede realizar en las fracciones plaquetarias que ya se han activado, p.ej. en un gel plaquetario.

El producto obtenido a partir de la lisis está preferentemente liofilizado de acuerdo con los procedimientos y con los dispositivos conocidos en la técnica a fin de obtener un lisado liofilizado en forma de polvo.

El lisado obtenido como se describe anteriormente se puede adsorber sobre matrices biocompatibles. Dichas matrices biocompatibles se pueden fabricar de material obtenido forma sintética, tal como p.ej. retronectina o cerámica tal como p.ej. hidroxiapatita, o material biológico, tal como p.ej. colágeno. Todavía más preferentemente, la matriz biocompatible es parte de una tirita o venda. Más preferentemente, la matriz que contiene el lisado plaquetario está situada a fin de estar en contacto con la herida cuando la tirita o venda se aplica sobre la misma.

Otro objetivo de la invención es un biorreactor que comprende una fracción plaquetaria o productos que derivan de la misma como se describe anteriormente. Dicho biorreactor es cualquier dispositivo que puede permitir la expansión *in vitro* o la maduración de material celular que se puede reproducir por sí mismo mediante maduración o expansión celular. Preferentemente, dicho material celular que se puede reproducir por sí mismo está compuesto de células eucariotas, más preferentemente de ser humano, todavía más preferentemente células madre o precursores conocidos en la técnica por su potencial de expansión numérica. Preferentemente, dicho biorreactor es una placa de Petri o una bolsa para cultivo celular, en el que el material celular que se puede reproducir por sí mismo se mezcla con las fracciones plaquetarias o los productos que derivan de las mismas como se describe anteriormente.

La fracción plaquetaria, o los productos que derivan de la misma como se describe anteriormente, es ventajosa, puesto que permite una mayor diferenciación y expansión celular en un biorreactor y, al mismo tiempo, mantiene el mismo potencial o multipotencial de las mismas células madre. Preferentemente, las células en el biorreactor son células madre, preferentemente células mesenquimatosas.

Otro aspecto de la invención es el uso de las fracciones plaquetarias, o de los productos que derivan de las mismas, como un medicamento. Preferentemente, los productos que derivan de las mismas son lisados y/o un componente obtenido a partir de la activación de la fracción plaquetaria.

En un modo de realización preferente, las fracciones plaquetarias, o los productos que derivan de las mismas, se usan como un medicamento, o de forma alternativa, en la preparación de dicho medicamento, para tratar, detener y/o impedir pérdidas de sangre accidentales, tales como hemorragias. En dicho modo de realización, el medicamento ventajosamente puede contener excipientes y/o otros agentes hemostáticos.

En otro modo de realización preferente, las fracciones plaquetarias, o los productos que derivan de las mismas, se usan como medicamento, o de forma alternativa, en la preparación de dicho medicamento, para el nuevo crecimiento o el tratamiento de cualquier tejido animal dañado. En el contexto de la presente invención, un tejido dañado se define como un tejido que requiere un nuevo crecimiento debido a una enfermedad o una herida provocada p.ej. por un cuerpo extraño. Preferentemente, dicho tejido animal dañado es una herida y/o una lesión en el tejido cutáneo o muscular animal. Preferentemente, el nuevo crecimiento significa cicatrización, vascularización o curación de una herida o lesión. Todavía más preferentemente, la herida y/o lesión se debe a una ulcera cutánea.

En dicho modo de realización, la fracción plaquetaria está preferentemente en forma de un lisado o en forma de un gel plaquetario como se describe anteriormente.

En otro modo de realización de la invención, la fracción plaquetaria se usa en la expansión *in vitro* o la maduración de material biológico celular que se puede reproducir por sí mismo, preferentemente en un biorreactor, como ya se describe anteriormente.

La presente invención se divulga en la siguiente descripción detallada y se ejemplifica adicionalmente a continuación gracias a las figuras adjuntas.

La figura 1 muestra la comparación en el crecimiento de células madre mesenquimatosas durante tres semanas (véase el ejemplo 3), a continuación, sometidas a diferenciación adipogénica (véase el ejemplo 4), cuando se usan como un cultivo DMEM y un 10 % v/v de lisado plaquetario obtenido a partir de sangre placentaria (fig. 1A), y cuando se usan como un cultivo DMEM y un 10 % v/v de lisado plaquetario obtenido a partir de sangre periférica (fig. 1B).

La figura 2 muestra la comparación en el crecimiento de células madre mesenquimatosas durante tres semanas (véase el ejemplo 3), a continuación, sometidas a diferenciación osteogénica (véase el ejemplo 4), cuando se usan como un cultivo DMEM y un 10 % v/v de lisado plaquetario obtenido a partir de sangre placentaria (fig. 2A), y cuando se usan como un cultivo DMEM y un 10 % v/v de lisado plaquetario obtenido a partir de sangre periférica (fig. 2B).

Ejemplo 1 - **Preparación de la fracción plaquetaria y, a continuación, del PRP a partir de sangre placentaria**

Se realizó un hemocromo con un hemocitómetro ABX Micros CRP en una bolsa de sangre placentaria del Cord Blood Bank de Milán, con el propósito de conocer la concentración de plaquetas.

A continuación, la sangre se transfirió a tubos de 50 ml en alícuotas de 25-30 ml y, a continuación, se centrifugó a 550 g durante 10 minutos.

La porción de plasma, que contiene la fracción plaquetaria y está situada por encima del anillo de linfocitos, se extrajo con una pipeta.

A continuación, se centrifugó dicha porción a 2000 g durante 15 minutos.

El sedimento resultante se resuspendió en 5,5 ml de dicha porción de plasma a fin de obtener una concentración final de $2x10^9$ plt/ml.

A continuación, la muestra de PRP resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Ejemplo 2 - **Preparación del gel plaquetario a partir de la fracción plaquetaria**

El protocolo del ejemplo 1 se repitió a fin de obtener una muestra de 5,5 ml de fracción plaquetaria de PRP a partir de sangre placentaria que tiene una concentración de $2x10^9$ plt/ml.

Dicha muestra se activó añadiendo 1 ml de gluconato de calcio y un comprimido de batroxobina liofilizada correspondiente a 5 unidades Bethesda y aproximadamente 0,9 unidades NIH trombínicas.

Se esperó durante 10 minutos a fin de obtener un gel plaquetario.

Ejemplo 3 - **Comparación de la eficacia de un cultivo para la expansión celular que comprende una fracción plaquetaria a partir de sangre placentaria y uno que comprende una fracción a partir de sangre periférica**

El gel plaquetario preparado de acuerdo con el ejemplo 2 se centrifugó a 2000 g durante 10 minutos y el sobrenadante se filtró con un filtro que tenía poros de 20 micrómetros a fin de obtener un lisado plaquetario. Un correspondiente lisado plaquetario a partir de sangre periférica se preparó adicionalmente del mismo modo.

Se aislaron $2x10^5$ células madre mesenquimatosas a partir de tejido adiposo de adultos humanos (con consentimiento informado). Dichas células madre mesenquimatosas se sembraron en un cultivo de (medio de Eagle modificado por Dulbecco) y un 10 % v/v de lisado plaquetario obtenido a partir de sangre placentaria y un 1 % v/v de penicilina/estreptomicina. Un cultivo que comprendía un 10 % v/v de lisado que derivaba de sangre periférica se prepararó del mismo modo. Las células se mantuvieron en cultivo durante tres semanas, reemplazando la mitad del medio de cultivo una vez por semana.

Después de tres semanas, las células se caracterizaron mediante análisis citofluorimétrico con el dispositivo Cytomics C500 y el software CXP de Beckam Coulter.

Las células madre mesenquimatosas obtenidas después de 3 semanas se sembraron en DMEM+ un 20 % v/v de FBS (suero fetal bovino) a $2,1x10^4$ células/cm^2 y se incubaron a 37 °C con un 5 % v/v de CO_2.

Una vez han alcanzado la confluencia, se estimulan las células con tres ciclos de diferenciación. Cada ciclo consiste en cultivar las células obtenidas en dichos medios de cultivo con medio de inducción de adipogénesis (Lonza) durante tres días, seguido de 1-3 días de cultivo en medio de mantenimiento adipogénico (Lonza).

Después de tres ciclos completos, las células se mantienen en cultivo con medio de mantenimiento adipogénico durante siete días, reemplazando el medio cada 2-3 días. Finalmente, con el propósito de observar la diferenciación real las células se lavan con PBS, se fijan en un 10 % v/v de formaldehído durante 10 minutos y se colorean con el aceite rojo O durante 5 minutos.

Solo se colorean las vacuolas lipídicas. Los resultados se pueden comparar visualmente en la figura 1, en la que la figura 1A muestra el crecimiento de la fracción plaquetaria de acuerdo con la invención y la figura 1B muestra el crecimiento con la fracción plaquetaria a partir de sangre periférica.

Más allá de la prueba con diferenciación adipogénica, la diferencia en eficacia de la fracción plaquetaria también se midió con diferenciación osteogénica. Las células madre mesenquimatosas obtenidas a partir de los cultivos después de 3 semanas, como anteriormente, se sembraron en una concentración de $2,1x10^4$ células/cm^2 en DMEM + un 20 % v/v de FBS (suero fetal bovino) y se incubaron a 37°C con un 5 % v/v de CO_2.

Después de 24 horas, el medio de cultivo se reemplazó con medio de inducción de osteogénesis (Lonza). Las células se mantienen en cultivo durante 3 semanas, reemplazando el medio con medio recién preparado cada 2-3 días.

Finalmente, con el propósito de observar la diferenciación real las células se lavan con PBS y se fijan con un 70 % v/v de alcohol etílico (almacenado a -20°C) durante 1 hora y se colorean con rojo de alizarina S 40 mM (pH = 4,1).

Solo se colorean los depósitos de calcio. Los resultados se pueden comparar visualmente en la figura 2, en la que la figura 2A muestra el crecimiento de la fracción plaquetaria de acuerdo con la invención y la figura 2B muestra el crecimiento con la fracción plaquetaria a partir de sangre periférica.

La comparación para ambos tipos de diferenciación muestra que el uso de la fracción plaquetaria que deriva de sangre placentaria tiene un efecto evidente sobre el potencial de dichas células madre mesenquimatosas.

En particular, se observó que, más allá de soportar el crecimiento y la expansión de células madre, la fracción plaquetaria a partir de sangre placentaria matiene el multipotencial de la misma, es decir, la capacidad de dar lugar a tejidos diferentes de otro origen: en este caso específico de una célula madre mesenquimatosa que da lugar, de acuerdo con los protocolos experimentales, a un tejido adiposo o a un tejido osteogénico.

Las propiedades ventajosas del lisado plaquetario placentario para su uso en un cultivo para la expansión celular se confirman adicionalmente mediante el análisis citofluorimétrico de marcadores madre detectados como presentes o no presentes en células madre mesenquimatosas obtenidas después de un crecimiento de 3 semanas en cultivos que comprenden una fracción plaquetaria a partir de sangre placentaria en comparación con células madre mesenquimatosas obtenidas después de un crecimiento de 3 semanas en cultivos que comprenden una fracción a partir de sangre periférica.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar una fracción plaquetaria, que comprende:

• preparar sangre placentaria,
• centrifugar la sangre placentaria a una rotación que oscila de 300 a 900 g durante un periodo que varía de 5 a 20 minutos;
• centrifugar la sangre placentaria a una rotación que oscila de 50 a 200 g durante un periodo que varía de 5 a 15 minutos.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una etapa de centrifugación llevada a cabo a una rotación en el intervalo de 1500 a 2500 g durante un periodo en el intervalo de 10 a 20 minutos.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende adicionalmente una etapa de activación de la fracción plaquetaria.

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha etapa de activación compone añadir y mezclar de 0,1 a 2 ml de gluconato de calcio y de 0,1 a 2 unidades NIH trombínicas de batroxobina por 5,5 ml de la fracción plaquetaria.

5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4, que comprende adicionalmente una etapa de lisis de la fracción plaquetaria, preferentemente PRP, mediante centrifugación a una rotación de al menos 1700 g, preferentemente a una rotación en el intervalo de 1700 a 2500 g, durante un periodo en el intervalo de 5 a 20 minutos.

6. Una fracción plaquetaria obtenible mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, conteniendo dicha fracción menos de $5x10^3$ linfocitos/ml, preferentemente menos de $1x10^3$ linfocitos/ml.

7. Un plasma pobre en plaquetas obtenible mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2.

8. Un gel plaquetario obtenible mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3 o 4.

9. Un lisado plaquetario obtenible mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5.

10. El lisado plaquetario de acuerdo con la reivindicación 9 adsorbido sobre una matriz biocompatible, preferentemente, dicha matriz biocompatible es parte de una tirita o venda.

11. Un biorreactor que comprende la fracción plaquetaria de acuerdo con la reivindicación 6, el plasma pobre en plaquetas de acuerdo con la reivindicación 7, el gel plaquetario de acuerdo con la reivindicación 8 o el lisado plaquetario de acuerdo con la reivindicación 9.

12. La fracción plaquetaria de acuerdo con la reivindicación 6, el plasma pobre en plaquetas de acuerdo con la reivindicación 7, el gel plaquetario de acuerdo con la reivindicación 8 o el lisado plaquetario de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso como un medicamento.

13. La fracción plaquetaria de acuerdo con la reivindicación 6, el plasma pobre en plaquetas de acuerdo con la reivindicación 7, el gel plaquetario de acuerdo con la reivindicación 8 o el lisado plaquetario de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento de un tejido animal dañado, preferentemente un tejido cutáneo ulcerado.

14. La fracción plaquetaria de acuerdo con la reivindicación 6, el plasma pobre en plaquetas de acuerdo con la reivindicación 7, el gel plaquetario de acuerdo con la reivindicación 8 o el lisado plaquetario de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento de una hemorragia.

15. Uso de la fracción plaquetaria de acuerdo con la reivindicación 6, el plasma pobre en plaquetas de acuerdo con la reivindicación 7, el gel plaquetario de acuerdo con la reivindicación 8 o el lisado plaquetario de acuerdo con la reivindicación 9 para la expansión *in vitro* y la maduración de células eucariotas, preferentemente células eucariotas humanas, más preferentemente células madre eucariotas humanas.

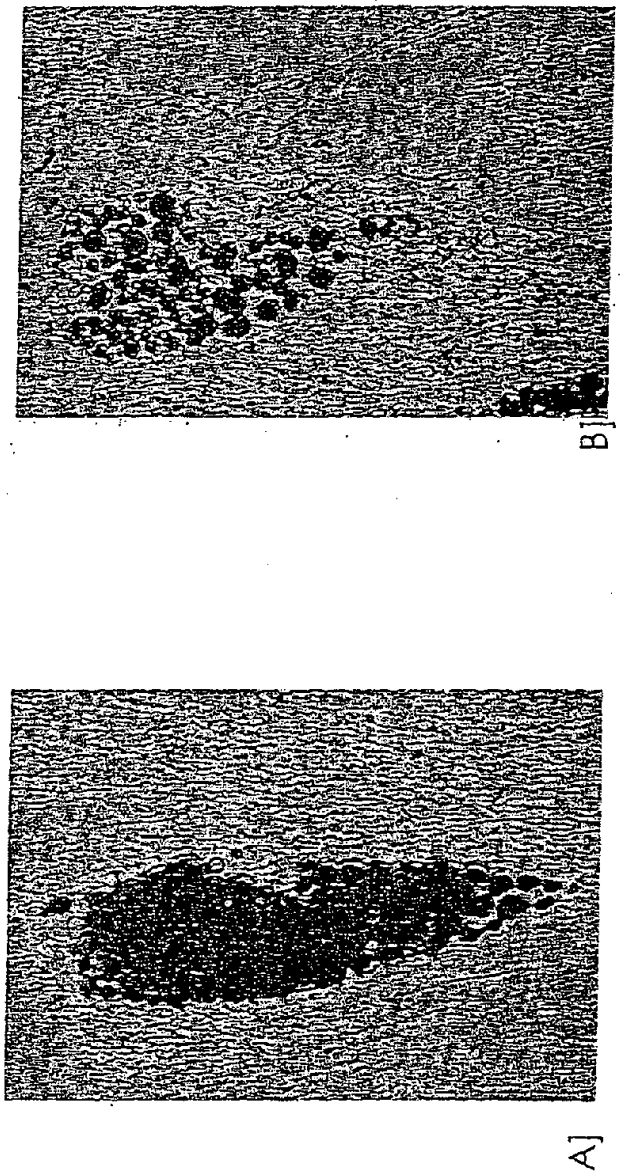
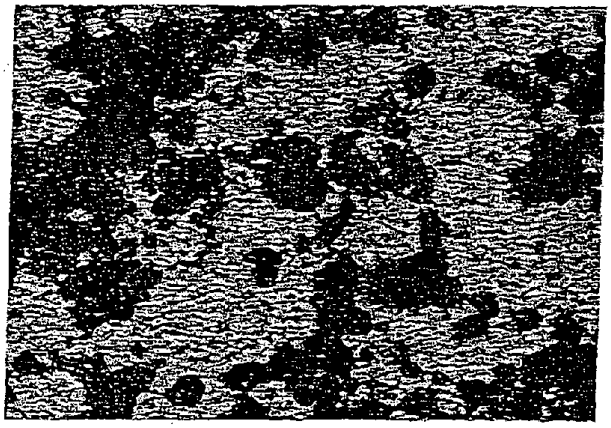
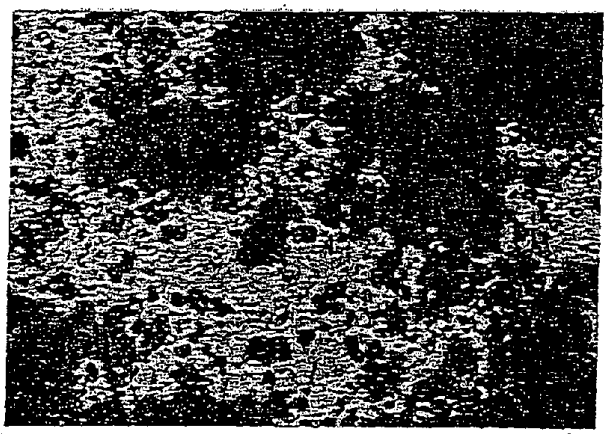


FIG. 1



B]

FIG. 2



A]