(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 564 580**

(21) Número de solicitud: 201431376

(51) Int. CI.:

C12N 5/078 (2010.01)
A61K 35/19 (2015.01)
G01N 33/49 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

22.09.2014

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

23.03.2016

(71) Solicitantes:

BIOTECHNOLOGY INSTITUTE, I MAS D, S.L. (100.0%)
San Antonio 15, 5º
01005 VITORIA (Araba/Álava) ES

(72) Inventor/es:

ANITUA ALDECOA, Eduardo

(74) Agente/Representante:

TRIGO PECES, José Ramón

(54) Título: **MÉTODO DE PREPARACIÓN DE UNA COMPOSICIÓN RICA EN PLAQUETAS Y/O FACTORES DE CRECIMIENTO**

(57) Resumen:

Método de preparación de una composición rica en plaquetas y/o factores de crecimiento, utilizable en diversos campos de la medicina o veterinaria. El método comprende los pasos de extraer sangre a un contenedor inicial sin aditivos, centrifugar la sangre en un único proceso de centrifugado para su separación en fracciones, extraer a un contenedor adicional toda o parte de una fracción consistente en plasma rico en plaquetas en estado líquido, donde se permite o no que dicho plasma coagule. El método consigue una reducción muy importante del tiempo de preparación de un plasma con propiedades biológicas deseables para uso médico, un mejor aprovechamiento de los recursos médicos humanos y materiales, y una reducción de la probabilidad de errar en la ejecución del método. Así, se puede obtener un plasma rico en plaquetas desprovisto de residuos de los aditivos anti- y/o pro-coagulantes.

ES 2 564 580 A1

MÉTODO DE PREPARACIÓN DE UNA COMPOSICIÓN RICA EN PLAQUETAS Y/O FACTORES DE CRECIMIENTO

DESCRIPCIÓN

Sector de la técnica

La invención se refiere a un método de preparación de una composición rica en plaquetas y/o factores de crecimiento, a partir de sangre humana o animal.

Estado de la técnica

En el campo de la medicina se conoce el uso de composiciones ricas en plaquetas y/o factores de crecimiento, obtenidas a partir de sangre, para múltiples tipos de aplicaciones de naturaleza muy diferente. Por ejemplo, las composiciones ricas en plaquetas y/o factores de crecimiento se vienen utilizando con éxito para promover la regeneración de tejidos, reducir el dolor de articulaciones y otras partes de la anatomía, ser utilizados como colirio para el tratamiento de dolencias o condiciones post-operatorias oculares, tratar trastornos cutáneos, servir de material de relleno en múltiples aplicaciones médicas, servir de membrana para cubrir una determinada zona del cuerpo o para separar dos zonas del cuerpo, entre otras.

Las composiciones sanguíneas ricas en plaquetas y/o factores de crecimiento se obtienen generalmente mediante el procedimiento siguiente. En primer lugar, se parte de una cierta cantidad inicial de sangre, la cual puede haber sido, por ejemplo en caso de que se vaya a preparar una composición autóloga, extraída del propio paciente sobre el que se aplicará la composición final. La sangre se extrae a tubos o contenedores en cuyo interior se ha dispuesto previamente una sustancia anticoagulante con el fin de evitar que la sangre coagule, para que pueda ser sometida con éxito al resto de pasos del procedimiento. Seguidamente, se realiza la separación de la sangre en fracciones, entre ellas una fracción de plasma rico en plaquetas (PRP), por ejemplo

centrifugando la misma a alta velocidad durante un breve periodo de tiempo. En función de la técnica utilizada para realizar la separación, y de los parámetros concretos de realización de la técnica (por ejemplo, en función de la velocidad y el tiempo de centrifugado), se obtienen variaciones en las fracciones resultantes; por ejemplo, para la preparación de un compuesto rico en plaquetas y/o factores de crecimiento se suelen ejecutar técnicas de separación que permitan obtener tres fracciones resultantes, consistentes en una fracción de glóbulos rojos en la parte inferior del contenedor, una fracción de glóbulos blancos ("buffy coat") situada encima de la fracción de glóbulos rojos, y una fracción de plasma rico en plaquetas (PRP) dispuesta encima de la fracción de glóbulos blancos. A continuación, se separa toda o parte de la fracción de plasma rico en plaquetas a un contenedor aparte (opcionalmente acompañada de la fracción de glóbulos blancos) y se añade una sustancia coagulante, tal como cloruro de calcio, para causar el inicio de la coagulación del plasma y la liberación de factores de crecimiento del interior de las plaquetas (lo que se conoce como "activación" del plasma). En función del tiempo que se deje transcurrir desde la activación del plasma y por tanto del grado de coagulación que alcance la composición, la composición final rica en plaquetas y factores de crecimiento puede presentar una consistencia líquida o gelificada (coagulada). Incluso, si se permite que la composición coagule completamente y después se retraiga el coágulo de fibrina, aparece una composición resultante sólida (el propio coágulo de fibrina) y otra composición resultante líquida (el sobrenadante que aparece cuando el coágulo de fibrina se retrae). Todas estas composiciones, es decir, el gel, el coágulo de fibrina y el sobrenadante líquido presentan sus diferentes aplicaciones médicas. Un ejemplo del método de preparación anterior, para obtener una composición rica en factores de crecimiento, puede encontrarse en la patente US6569204.

El tiempo total de preparación de una composición rica en plaquetas y/o factores de crecimiento autólogo, desde que se extrae la sangre del paciente hasta que se obtiene la composición final con la textura deseada, generalmente oscila entre 30 y 60 minutos. Este tiempo resulta en la práctica demasiado largo, obligando al paciente a esperar en el quirófano o sala médica a que la composición esté preparada, lo cual

causa incomodidad en el paciente, además de un aprovechamiento poco eficiente de los recursos humanos y materiales médicos. Por ejemplo, en el caso de que se esté preparando una composición rica en factores de crecimiento para ser insertada en un alveolo post-extracción (cavidad que queda en el hueso maxilar de un paciente tras la extracción de una pieza dental) con el fin de regenerar el tejido óseo del alveolo, es mucho mayor el tiempo de preparación de la composición que el tiempo del procedimiento quirúrgico propiamente dicho de extracción de la pieza dental, debiendo el paciente permanecer a la espera por lo menos de 10 a 30 minutos desde que se le extrae la pieza hasta que la composición está lista para ser aplicada.

La presente invención tiene como objetivo un método de preparación de una composición rica en plaquetas y/o factores de crecimiento que presente un tiempo total de ejecución menor que los métodos convencionales. Reducir el tiempo de preparación de una composición es ventajoso por múltiples motivos, entre otros para conseguir un más eficaz aprovechamiento de los recursos, una mayor productividad, y un menor coste de preparación. Además, en el caso de que la invención se aplique a la preparación de una composición autóloga de aplicación inmediata, mediante la invención se pretende reducir el tiempo de espera del paciente desde que se extrae sangre para preparar la composición hasta que la composición está lista para ser aplicada de nuevo en el paciente, mejorando las condiciones de tratamiento y confort del paciente.

Descripción breve de la invención

Con el fin de superar los inconvenientes del estado de la técnica, se propone un método de preparación de una composición rica en plaquetas y/o factores de crecimiento, utilizable en diversos campos médicos tales como la cirugía oral, dermatología, oftalmología, ortopedia, veterinaria, neurología y otros. El método según la invención comprende los pasos de: introducir sangre de origen humano o animal en un contenedor inicial desprovisto de aditivos; centrifugar el contenedor inicial con sangre durante un tiempo determinado y a una velocidad

determinada, causando la separación de la sangre del contenedor inicial en fracciones, incluyendo dichas fracciones una fracción de glóbulos rojos y una fracción de plasma rico en plaquetas líquido; y extraer a un contenedor adicional al menos parte de la fracción de plasma rico en plaquetas obtenida tras centrifugar el contenedor con sangre.

Es decir, de acuerdo con la invención se extrae sangre a un contenedor inicial desprovisto de aditivos (por ejemplo de sustancias anticoagulantes), y se realiza una única fase de centrifugado (arranque, centrifugado, frenado y parada de la máquina centrífuga) a una velocidad y con una duración determinadas para obtener varias fracciones en el contenedor inicial, siendo una de ellas una fracción de plasma rico en plaquetas en estado líquido. Seguidamente, se extrae toda o parte de dicha fracción de plasma sanguíneo líquido a un contenedor adicional, donde se permite o no que coagule, y se inyecta o aplica en forma líquida.

Mediante el procedimiento descrito, se consigue una reducción muy significativa del tiempo total de preparación de los diferentes tipos de composiciones ricas en plaquetas, es decir, de las composiciones gelificadas, sólidas o líquidas, obteniéndose tiempos de preparación de entre 10 y 20 minutos aproximadamente. La reducción del tiempo total viene a ser la suma de varias reducciones parciales. Por una parte, el plasma sanguíneo coagula más rápidamente por no haber sido mezclada la sangre con un anticoagulante en el contenedor inicial. Por otra parte, dado que en el contenedor inicial no se incluye un anticoagulante, no es necesario añadir un activador al plasma extraído al contenedor adicional para que dicho plasma se coagule, sino que dicho plasma coagula por efecto de la trombina natural de la propia sangre; en consecuencia, se evita el tener que añadir un activador, ahorrándose entre otros el tiempo de adición del activador.

Además de ser más rápido, el método según la invención es ventajoso con respecto a métodos convencionales en que requiere menos componentes o elementos para ser ejecutado. Así, no se invierte tiempo añadiendo aditivos al contenedor inicial. Además, no requiere el uso de anticoagulantes, ni es imprescindible añadir un activador del plasma para

iniciar la coagulación del mismo y la liberación de factores de crecimiento, sino que dichos efectos se producen de forma natural por la propia acción de la trombina presente en el plasma. Al requerirse menos componentes, el método no solamente es más rápido sino que resulta más sencillo y con menor probabilidad de errar en su ejecución. Otra ventaja importante del método según la invención es que, al no requerirse aditivos, es posible utilizar contenedores sin fecha de caducidad o alargar la fecha de caducidad de los dispositivos utilizados en el método de preparación.

Además, el método según la invención permite conseguir una composición rica en plaquetas y/o factores de crecimiento desprovista de residuos de aditivos anti-coagulantes y/o pro-coagulantes.

La utilización del método según la invención permite por tanto un mejor aprovechamiento de los recursos clínicos humanos y materiales, una mayor productividad, y un menor tiempo de espera y mayor confort para el paciente, especialmente en caso de que el paciente haya sido sometido a un procedimiento quirúrgico tras el cual va a aplicarse la composición preparada según el método de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Se propone un método de preparación de una composición rica en plaquetas y/o factores de crecimiento para uso generalmente médico, que presenta un tiempo de ejecución más corto que procedimientos conocidos en el estado de la técnica, como se analizará y probará en detalle más adelante.

El método propuesto comprende los pasos de:

- introducir sangre de origen humano o animal en un contenedor inicial desprovisto de aditivos;

- centrifugar el contenedor inicial con sangre durante un tiempo determinado y a una velocidad determinada, causando la separación de la sangre del contenedor inicial en fracciones,

incluyendo dichas fracciones una fracción de glóbulos rojos y una fracción de plasma rico en plaquetas líquido;

- extraer a un contenedor adicional al menos parte de la fracción de plasma rico en plaquetas obtenida tras centrifugar el contenedor con sangre.

Como se ha mencionado, el primer paso consiste en introducir sangre en un contenedor inicial, donde dicho contenedor inicial está desprovisto de aditivos, es decir, desprovisto por ejemplo de aditivos anticoagulantes. La procedencia de dicha sangre puede variar en función de la realización concreta del método. Por ejemplo, en caso de preparación de una composición rica en plaquetas y/o factores de crecimiento autóloga, dicha sangre puede ser sangre extraída del propio paciente destinado a recibir la composición; preferentemente, la sangre de dicho paciente es extraída directamente al contenedor inicial para reducir en mayor medida el tiempo de ejecución y las manipulaciones de la sangre.

El contenedor inicial es preferentemente un contenedor cerrado al vacío, produciéndose la transferencia de sangre a dicho contenedor inicial por medio de una diferencia de presión de manera que la sangre es absorbida por efecto del vacío en dicho contenedor inicial. Sin embargo, se contemplan modos de realización alternativos para dicho contenedor inicial, por ejemplo que el contenedor no se encuentra al vacío e sea abierto para introducir la sangre y cerrado una vez introducida la sangre. En todos los casos, el contenedor inicial está desprovisto de aditivos. Es decir, el contenedor inicial en definitiva no contiene ningún agente externo introducido en el contenedor. Por ejemplo, no se ha introducido expresamente ningún agente externo anticoagulante.

El segundo paso del procedimiento, como se ha explicado, consiste en centrifugar el contenedor inicial, el cual contiene sangre sin aditivos, durante un tiempo determinado y a una velocidad determinada, causando la separación de la sangre del contenedor inicial en fracciones. Dichas fracciones incluyen una fracción de glóbulos rojos (RBC) en la zona

inferior del contenedor inicial y una fracción de plasma rico en plaquetas (PRP) en la zona superior, generalmente separadas por una fracción intermedia de glóbulos blancos (WBC o “buffy coat”). La fracción de plasma rico en plaquetas (PRP) según la invención se encuentra en estado líquido. Dicha fracción de PRP se caracteriza también por presentar un gradiente de concentración de plaquetas, de forma que la concentración de plaquetas es mayor en la parte de la fracción más próxima a la fracción de glóbulos rojos que en la parte menos próxima a la fracción de glóbulos rojos.

El tercer paso del procedimiento consiste en extraer a un contenedor adicional al menos parte de la fracción de plasma rico en plaquetas obtenida tras centrifugar el contenedor con sangre. En este sentido, a continuación se describen diversos ejemplos de modos de realización contemplados.

En lo que respecta al tipo de contenedor adicional utilizado, dicho contenedor adicional puede ser un contenedor blanco, es decir, un tubo sin ningún aditivo sino simplemente un recipiente o receptáculo donde alojar el plasma. Con ello se consigue una coagulación relativamente más lenta del plasma, que puede convenir en ciertos casos. Alternativamente, el contenedor adicional puede ser un tubo con al menos un procoagulante, es decir, un contenedor que contiene una sustancia procoagulante, combinación de sustancias procoagulantes, o propiedades superficiales procoagulantes derivadas de los materiales de fabricación del contenedor adicional o de la geometría de sus paredes interiores. Por ejemplo, el contenedor adicional puede estar fabricado de vidrio o puede presentar un recubrimiento procoagulante tal como vidrio, silicona, caolinita, cerita, o bentonita. La pared interior del contenedor puede estar tratada con gas ionizado para acelerar la coagulación del plasma. La superficie interna puede presentar una rugosidad que permite acelerar la coagulación del plasma. Las propiedades superficiales procoagulantes pueden estar presentes en toda o parte de la superficie de las paredes interiores del contenedor adicional. El utilizar un contenedor procoagulante permite acelerar la coagulación del plasma en aquellas circunstancias en las que pueda resultar conveniente para la técnica

médica o quirúrgica en la que vaya a ser utilizada la composición.

Se contempla también que el contenedor inicial y/o el contenedor adicional puede ser un tubo con propiedades superficiales anticoagulantes derivadas de los materiales de fabricación del contenedor o de la geometría de sus paredes interiores. Por ejemplo, el contenedor inicial y/o adicional puede estar fabricado de o recubierto con más polímeros hidrofóbicos tales como polietileno, polipropileno, Politetrafluoroetileno, polivinilcloruro, polietilentereftalato, polisiloxano, poliestireno, policarbonato, copolímero de olefina cíclica. La superficie interna del contenedor puede estar tratada con gas ionizado para producir propiedades hidrofóbicas. El utilizar un contenedor anticoagulante permite retrasar la coagulación de la sangre o del plasma en aquellas circunstancias en las que pueda resultar conveniente para la técnica médica o quirúrgica en la que vaya a ser utilizada la composición. Retrasar la coagulación de la sangre permite alargar el tiempo de espera antes de centrifugar la sangre para obtener el plasma, si ello fuera necesario. Las propiedades superficiales anticoagulantes pueden estar presentes en toda o parte de la superficie de las paredes interiores del contenedor adicional, influyendo este aspecto también en el grado de retraso de la coagulación. Por ejemplo, se realizó una prueba en la que se extrajo sangre a tres contenedores iniciales sin aditivos, uno de ellos un tubo blanco, otro consistente en un tubo blanco provisto de un recubrimiento hidrofóbico en toda su superficie interna, y el tercero consistente en un tubo blanco provisto de un recubrimiento hidrofóbico hasta solamente una altura de 2 mm desde el fondo del tubo. Se comprobó que los tiempos de coagulación de la sangre en los tres contenedores adicionales fueron respectivamente de 15, 25 y 35 minutos.

En otro ejemplo se ha extraído sangre en tubo sin aditivo y se ha esperado un tiempo antes de centrifugar la sangre para obtener un plasma rico en plaquetas y evaluar la obtención de plasma en estado líquido. La Tabla 1 a continuación muestra la posibilidad de obtener plasma líquido después de la centrifugación. El tiempo de coagulación ha sido de 5 ± 2 minutos.

Tabla 1. Efecto del tipo del material de fabricación del tubo inicial en la obtención de plasma en estado líquido después de la centrifugación de la sangre.

Tiempo de espera antes de centrifugar	Centrifugar a 580 G durante 8 minutos		Fraccionar plasma líquido	
	polipropileno	poliestireno	polipropileno	poliestireno
3 min	Sí	Sí	Sí	Sí
5 min	Sí	Sí	No	Sí
8 min	Sí	Sí	No	Sí
	Sí	Sí	No	Sí
	Sí	Sí	No	Sí
10 min	Sí	Sí	No	Sí

En lo que respecta a la cantidad de plasma extraído del contenedor inicial, como se ha mencionado se contempla que pueda extraerse al contenedor adicional la fracción de plasma completa o bien solamente parte de la fracción de plasma.

En el caso de extraerse la fracción completa, se dispone de mayor cantidad de plasma lo cual permite preparar una mayor cantidad de composición terapéutica final; esto puede ser interesante, por ejemplo, para preparar un volumen relativamente elevado de una composición gelificada rica en factores de crecimiento destinado a ser infiltrado en un espacio relativamente grande, por ejemplo en una articulación de rodilla. Incluso, para incrementar el volumen de la composición obtenida, es posible extraer a un mismo contenedor adicional el plasma proveniente de varios contenedores iniciales preparado según el método de la invención.

En caso de que se extraiga al contenedor adicional solamente una parte de la fracción de plasma del contenedor inicial, es posible conseguir una composición final más específica para una determinada aplicación; por ejemplo, puede interesar extraer solamente la parte de la fracción que se encuentra más próxima a la fracción de glóbulos blancos y que por tanto presente una mayor concentración de plaquetas. En este sentido, se contempla asimismo que distintas partes de la fracción de plasma puedan extraerse a diferentes contenedores adicionales. Ello hace posible que, a partir de una misma dosis inicial de sangre, puedan obtenerse composiciones diferentes destinadas a aplicaciones o técnicas médicas diferentes, en ocasiones comprendidas o ejecutadas en una misma

cirugía y destinadas a cumplir un objetivo distinto dentro de dicha cirugía. Por ejemplo, en un modo de realización de la invención, se extrae una parte de plasma a un primer contenedor adicional blanco y se extrae otra parte de plasma a un segundo contenedor adicional que contiene al menos un procoagulante. Ello permite coagular antes una parte del plasma y coagular después la otra parte del plasma, o lo que es lo mismo, en un determinado instante del procedimiento, disponer de un plasma más coagulado y otro menos coagulado.

Por ejemplo, se contempla que el método según la invención comprenda el paso de permitir que el plasma contenido en el primer contenedor adicional coagule hasta formar un gel (sustancia semisólida densa) de plasma rico en factores de crecimiento, es decir, un gel que contiene factores de crecimiento liberados de las plaquetas, y el paso adicional de permitir que el plasma contenido en el segundo contenedor adicional coagule hasta formarse y retraerse un coágulo de fibrina en forma de membrana en el segundo contenedor adicional (para lo cual puede resultar conveniente que el segundo contenedor adicional sea plano, por ejemplo en forma de bandeja). El plasma en primer contenedor adicional (contenedor blanco) puede tardar, por ejemplo, unos 10 minutos para coagularse pero tiene la ventaja de retraerse en un tiempo mínimo de 60 minutos, es decir, de mantener su consistencia de plasma. En cambio, el plasma en el segundo contenedor adicional (contenedor con sustancia procoagulante) puede tardar entre 3-5 minutos en coagularse, es decir, menos que el plasma del primer contenedor adicional, iniciar su retracción en 4-6 minutos y haberla terminado en unos 8-10 minutos adicionales. Por tanto, en un tiempo muy similar y notablemente breve, por ejemplo en torno a 20-30 minutos desde el comienzo de la centrifugación, se dispondrá de un gel en un contenedor, y de un coágulo de fibrina que comienza a retraerse en un segundo contenedor. Preferentemente, los procesos de coagulación descritos se realizan a una temperatura ambiente o a una temperatura de 37ºC.

Continuando con este ejemplo, el método según la invención preferentemente comprende los pasos adicionales de rellenar un alveolo de un paciente (por ejemplo un alveolo post-extracción de una pieza

dental) con gel de plasma rico en factores de crecimiento proveniente del primer contenedor adicional, y cubrir el alveolo con la membrana o una porción de la membrana formada en el segundo contenedor adicional. Así, mediante una única extracción de sangre se pueden fabricar dos composiciones diferentes, y en un tiempo muy reducido de en torno a 10 minutos. La persona versada en la materia comprenderá la importancia de estos resultados y de cuán significativo es el ahorro de tiempo para el paciente y para el profesional médico. A modo de ejemplo, no obstante, se proporciona en la Tabla 2 a continuación un resumen comparativo de los tiempos de preparación de un coágulo de fibrina según la técnica convencional descrita en la introducción del presente documento y la técnica del presente modo de realización que permite preparar tanto un gel como una membrana de coágulo de fibrina.

Tabla 2. Resumen comparativo de tiempos de preparación de una composición según una técnica convencional y una técnica según la invención.

Composición preparada	Gel según método convencional	Gel en contenedor blanco	Membrana en contenedor procoagulante
Tiempo de centrifugación	8 min (a 580 g)	8 min (a 580 g)	8 min (a 580 g)
Tiempo de fraccionamiento	1-2 min	1-2 min	1-2 min
Volumen $CaCl_2$ (µL) para activar plasma	50	0	0
Temperatura (ºC)	25/37	25/37	25/37
Tiempo de coagulación	15-20 min	10±2 min (25ºC) 8±3 min (37ºC)	4±1 min (25ºC) 3±1 min (37ºC)
Tiempo de obtención de coágulo bien retraído	60 min	-	17±4 min (25ºC) 12±3 min (37ºC)
TIEMPO TOTAL	**84-90 min**	**17-22 min (25ºC)** **14-21 min (37ºC)**	**25-36 min (25ºC)** **20-29 min (37ºC)**

Como puede observarse en la tabla, el tiempo total de preparación de una membrana de coágulo de fibrina según la técnica convencional, en las condiciones de centrifugado, activación y temperatura descritas en la tabla, es de 84-90 minutos. En cambio, el tiempo total de preparación de

un gel de plasma rico en factores de crecimiento según la invención es de 17 a 22 minutos si se realiza la coagulación a 25ºC y de 14 a 21 minutos si se realiza a 37ºC. A su vez, el tiempo total de preparación de la membrana de coágulo de fibrina es de 25 a 36 minutos si se realiza la coagulación a 25ºC y de 20 a 29 minutos si se realiza a 37ºC.

En un modo de realización opcional, el método de preparación de la composición comprende el paso adicional de añadir al menos un activador de plaquetas al contenedor adicional. Por activador se entiende una sustancia o agente –o combinaciones de ellos- iniciador de la coagulación y causante de la liberación de factores de crecimiento de las plaquetas. Mediante la adición de un activador se consigue acelerar más la obtención de fórmulas terapéuticas de plasma rico en plaquetas/factores de crecimiento. Por ejemplo, cuando es necesaria una coagulación rápida del plasma en el lugar de aplicación, para evitar su disipación o dispersión de dicha zona de aplicación, por ejemplo al inyectar el plasma en la piel para rejuvenecimiento, o al inyectarlo en músculo u otras zonas corporales.

En un modo de realización concreto, el activador es un compuesto de iones de calcio, tal como el cloruro de calcio o el gluconato cálcico. Los iones de calcio permiten la activación de las plaquetas y la formación de complejos enzimáticos imprescindibles para la coagulación del plasma. El uso de compuestos de iones de calcio reduce el tiempo de coagulación a sólo unos pocos minutos (p. ej. tan sólo 3 minutos), consiguiéndose acortar en aún mayor medida el tiempo necesario para la obtención de fórmulas terapéuticas del plasma.

En otros modos de realización, el activador puede ser colágeno, agonista de receptor de Trombina (TRAP), Adenosín difosfato trombina. Estos activadores de plaquetas pueden ser beneficiosos en acelerar el tiempo de coagulación y también acelerar la retracción del coagulo.

Preferentemente, la centrifugación de la sangre se realiza a una velocidad de entre 300 y 1200 G. De forma especialmente ventajosa, la centrifugación de la sangre se realiza a una velocidad de entre 480 y

1000 G. Por ejemplo, en un modo de realización preferente del método de preparación, la centrifugación de la sangre se realiza a una velocidad de 580 G durante un tiempo de 8 minutos.

Experimentos: primero se ha sacado sangre periférica en tubos que no contienes anticoagulante e inmediatamente se han procesado según los parámetros indicados a continuación. Posteriormente, se ha evaluado si hay una separación de la sangre en plasma y serie roja y también se ha evaluado la posibilidad de fraccionar/separar el plasma de la serie roja.

Tabla 3. Valores de centrifugación para obtener plasma en forma líquida para su posterior fraccionamiento.

Parámetro	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5
Fuerza giratoria	350 G	480 G	580 G	700 g	1000 G
Tiempo de centrifugación	8 min	8 min	8 min	8 min	8 min
Separación de plasma de la serie roja	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Fraccionamiento	Sí	Sí	Sí	Sí	No (había coagulado en el tubo)
Volumen de plasma obtenido	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml	

Tabla 4. Modificación del tiempo de centrifugado con respecto a la Tabla 2.

Parámetro	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 2	Ensayo 2	Ensayo 2
Fuerza giratoria	580 G	1000 G	1000 G	1000 G	1000 G
Tiempo de centrifugación	15 min	4 min	3 min	2 min	1 min
Separación de plasma de la sería roja	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Fraccionamiento	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Volumen de plasma obtenido	4 ml	3,5 ml	3,5 ml	2,5 ml	1,5 ml

REIVINDICACIONES

1. Método de preparación de una composición rica en plaquetas y/o factores de crecimiento, que se caracteriza por que comprende los pasos de:

- Introducir sangre de origen humano o animal a un contenedor inicial desprovisto de aditivos;

- centrifugar el contenedor inicial con sangre, causando la separación de la sangre del contenedor inicial en fracciones, incluyendo dichas fracciones una fracción de glóbulos rojos y una fracción de plasma rico en plaquetas líquido;

- extraer a un contenedor adicional al menos parte de la fracción de plasma rico en plaquetas obtenida tras centrifugar el contenedor con sangre.

2. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el contenedor inicial está al vacío.

3. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el contenedor inicial está a presión atmosférica.

4. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el contenedor inicial presenta propiedades superficiales procoagulantes.

5. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el contenedor inicial presenta propiedades superficiales anticoagulantes.

6. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que en el paso de extraer al menos parte de la fracción de plasma rico en plaquetas se extrae toda la fracción de plasma rico en plaquetas a dicho contenedor adicional.

7. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que la

composición rica en plaquetas y/o factores de crecimiento está desprovista de residuos de aditivos anti-coagulantes y/o pro-coagulantes.

8. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que en el paso de extraer al menos parte de la fracción de plasma rico en plaquetas se extrae una parte de plasma a un primer contenedor adicional y otra parte de plasma a un segundo contenedor adicional.

9. Método según la reivindicación 8, que se caracteriza por que el primer contenedor adicional es un contenedor desprovisto de aditivos y el segundo contenedor adicional es un tubo con al menos un procoagulante y/o con propiedades superficiales procoagulantes.

10. Método según la reivindicación 1, que comprende el paso adicional de añadir al menos un activador de plaquetas al contenedor adicional.

11. Método según la reivindicación 10, que se caracteriza por que el activador es un compuesto de iones de calcio.

12. Método según la reivindicación 11, que se caracteriza por que el compuesto es cloruro de calcio o gluconato cálcico.

13. Método según la reivindicación 10, que se caracteriza por que el activador comprende al menos uno de colágeno, agonista de receptor de trombina, Adenosín difosfato y trombina.

14. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que la centrifugación de la sangre se realiza a una velocidad de entre 300 y 1200 G.

15. Método según la reivindicación 14, que se caracteriza por que la centrifugación de la sangre se realiza a una velocidad de entre 480 y 1000 G.

16. Método según la reivindicación 15, que se caracteriza por que la

centrifugación de la sangre se realiza a una velocidad de 580 G durante un tiempo de 8 minutos.

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201431376

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 22.09.2014

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) **Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
X	WO 2010130851 A2 (BIOTECHNOLOGY INST I MAS D SL et al.) 18/11/2010, ver todo el documento.	1-16
X	WO 2014126970 A1 (LACERTA TECHNOLOGIES INC) 21/08/2014, ver páginas 4 a 6, ejemplos 2 y 4, y reivindicaciones 1 y 2.	1-4, 10-13
A		5-9, 14-16
A	US 2003198687 A1 (BENNETT KEITH et al.) 23/10/2003, ver todo el documento.	1-16

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	**Examinador**	**Página**
19.10.2015	**B. Pérez Esteban**	1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N5/078 (2010.01)
A61K35/19 (2015.01)
G01N33/49 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, A61K, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPIAP, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTUS4, TXTUS5, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, TXTCA1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 19.10.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	3, 8, 9, 14, 15	**SI**
	Reivindicaciones	1, 2, 4-7, 10-13, 16	**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones		**SI**
	Reivindicaciones	1-16	**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2010130851 A2 (BIOTECHNOLOGY INST I MAS D SL et al.)	18.11.2010
D02	WO 2014126970 A1 (LACERTA TECHNOLOGIES INC)	21.08.2014
D03		
D04	US 2003198687 A1 (BENNETT KEITH et al.)	23.10.2003

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente describe y reivindica un método de preparación de una composición rica en plaquetas y factores de crecimiento que comprende los pasos de introducir sangre en un contenedor desprovisto de aditivos, centrifugarlo para separar la sangre en fracciones (glóbulos rojos, y plasma rico en plaquetas), y extraer a otro contenedor esta última fracción. Reivindica también el método en el que el contenedor inicial está a vacío o no, en el que este contenedor presenta propiedades superficiales pro- o anticoagulantes, en el que la fracción de plasma, bien se extrae a un tubo en su totalidad o bien se divide en dos partes, extrayéndose una de ellas a un contenedor sin aditivos, y la otra a otro contenedor con un procoagulante, y el método en el que añade un activador de plaquetas (cloruro o gluconato cálcico, entre otros). Finalmente, reivindica la velocidad de centrifugación de la sangre, que está entre 300 y 1200 G.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

Se ha encontrado en el estado de la técnica un documento que describe el método objeto de la solicitud tal y como está reivindicado, por lo que las reivindicaciones 1, 2, 4 a 7, 10 a 13 y 16 de la solicitud no son nuevas según el artículo 6 de la Ley 11/1986 de Patentes.

Además, ese mismo documento, y otros del estado de la técnica, divulgan métodos similares al de la invención y afectan la actividad inventiva las reivindicaciones 1 a 16 de la solicitud según el artículo 8 de la Ley 11/1986 de Patentes, como se detalla a continuación.

El documento D01 se considera el más cercano del estado de la técnica. En él se describe un procedimiento de preparación de un plasma rico en plaquetas que coincide en su mayoría con el método de la solicitud. Así, en los ejemplos de procedimiento 1, 2 y 5, se dispone de sangre en un contenedor sin aditivos, que se centrifuga para separar las fracciones y posteriormente extraer la fracción de plasma a otro contenedor, con o sin acelerante de la coagulación, dependiendo de los ejemplos. Esta información, por tanto, afecta la novedad de las reivindicaciones 1, 6 y 7.

En la página 3, líneas 5 y siguientes, y en la página 5, líneas 15 y siguientes del documento D01, se indica que el primer contenedor está cerrado al vacío, lo que afecta la novedad de la reivindicación 2. El mero hecho de que este primer contenedor no esté a vacío, sino a presión atmosférica, no aporta actividad inventiva a la reivindicación 3 de la solicitud, por lo que el documento D01 también afecta la actividad inventiva de la reivindicación 3 de la solicitud.

En la página 7, línea 5, se indica que el primer contenedor puede estar realizado en plástico o vidrio, lo que, como se indica en la página 10, líneas 20, 21 y 32 a 35 de D01, así como en la propia solicitud de patente, supone que tiene propiedades anticoagulantes o procoagulantes, respectivamente, por lo que las reivindicaciones 4 y 5 de la solicitud tampoco tienen novedad. En los ejemplos de procedimiento 1 y 5, el plasma se extrae a un segundo contenedor de vidrio (procoagulante), o a uno de plástico con acelerante de la coagulación, con el fin de obtener un coágulo retraído, con consistencia semisólida, mientras que en el ejemplo de procedimiento 2, el plasma se extrae a un segundo contenedor de plástico sin acelerante de la coagulación, y se obtiene un producto con consistencia líquida. Conocida esta información, el experto en la materia encontrará evidente extraer parte de la fracción de plasma a un tubo que no favorezca la coagulación, y otra parte a otro tubo que facilite la formación del coágulo, de modo que las reivindicaciones 8 y 9 de la presente solicitud no tienen actividad inventiva, a la luz de lo divulgado en D01, que afecta igualmente la novedad de la reivindicación 10.

Respecto a los activadores de la coagulación de las reivindicaciones 10 a 13 de la presente solicitud, aparecen descritos en la página 10, líneas 12 a 17 del documento D1. Por tanto, este documento afecta también la novedad de estas reivindicaciones 10 a 13.

En la página 8, líneas 19 a 28, y en las reivindicaciones 12 y 13, encontramos las velocidades de centrifugación empleadas en el método descrito en D01, que anulan la novedad de la reivindicación 16 de la solicitud, y afectan la actividad inventiva de las reivindicaciones 14 y 15, ya que las velocidades de centrifugación de estas reivindicaciones no suponen una aportación que supere un problema técnico no resuelto ya con las velocidades de centrifugación empleadas en el documento D01.

En resumen, el documento D01 afecta la novedad de las reivindicaciones 1, 2, 4 a 7, 10 a 13 y 16, y la actividad inventiva de las reivindicaciones 3, 8, 9, 14 y 15 de la presente solicitud, según los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes, respectivamente.

En el documento D02 se describe también un procedimiento para aislar plasma rico en plaquetas mediante centrifugación de la sangre sin añadir aditivos anticoagulantes. Como en la solicitud, también en D02 se propone el uso de activadores de la coagulación, incluyendo el empleo de tubos de vidrio, o los activadores de las reivindicaciones 11 a 13 de la solicitud. Por tanto, la información divulgada en este documento afecta la novedad de la reivindicación 1, y la actividad inventiva de las reivindicaciones 2 a 4 y 10 a 13 de la solicitud.

En el documento D03 se divulga otro método para aislar plasma rico en plaquetas que, como el de la presente solicitud, supone una mejora en cuanto a complejidad, tiempo y dinero. No se indica si la centrifugación de la sangre se realiza en ausencia de aditivos, por lo que este documento no afecta la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud, según los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes, respectivamente. Se cita en este informe como información general del estado de la técnica cercana a la solicitud.