

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 603**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/49** (2006.01)  
**A61K 35/14** (2015.01)  
**A61K 35/16** (2015.01)  
**A61K 35/28** (2015.01)  
**A61K 35/19** (2015.01)  
**A61M 1/38** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2012 E 12757514 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015 EP 2685816**

54 Título: **Sistemas y métodos para agentes terapéuticos biológicos autólogos**

30 Prioridad:

**17.03.2011 US 201161453658 P**

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

**25.04.2016**

73 Titular/es:

**GREYLEDGE TECHNOLOGIES LLC (100.0%)  
Suite 102, US Bank Building  
Vail, CO 81657, US**

72 Inventor/es:

**KARLI, DAVID y  
BOMBARD, DAVID.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 567 603 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Sistemas y métodos para agentes terapéuticos biológicos autólogos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a sistemas, métodos y aparatos para agentes terapéuticos biológicos autólogos, incluyendo, pero sin limitación, el tratamiento y la tecnología con plasma rico en plaquetas (PRP) y concentrado de células de la médula ósea (BMCC).

10

Antecedentes de la invención

Uno de los métodos probados para mejorar la regeneración de los tejidos duros y blandos es la adición de factores de crecimiento humanos a la zona de una herida o incisión quirúrgica. Una manera segura y simple de obtener factores de crecimiento compatibles en una situación clínica es mediante el aislamiento de las plaquetas de la sangre del paciente, denominado "concentrado de plaquetas autólogas".

15

Las plaquetas son células sanguíneas que participan principalmente en la detención de la hemorragia. Sin embargo, también contienen proteínas denominadas factores de crecimiento que ayudan a potenciar la curación y la regeneración de los tejidos. Las mezclas muy concentradas artificiales de plaquetas (concentrados de plaquetas o plasma rico en plaquetas (PRP)) tienen recuentos de plaquetas superiores a los de la sangre natural, y han resultado estimular la regeneración de los tejidos blandos y tejidos duros del organismo.

20

El concentrado de células de la médula ósea (BMCC) puede incluir una serie de células diana, incluyendo las siguientes: células madre (células pluripotentes) (por ejemplo, monocitos), glóbulos blancos, plaquetas, neutrófilos, linfocitos, eosinófilos y basófilos, todos ellos con una variedad de usos en la curación, la regeneración y el tratamiento. Dado que es difícil separar una cualquiera o más de estas fracciones de células de un BMCC, por lo general, todas se insertan o se inyectan en un paciente. En una realización, el BMCC incluye plaquetas y glóbulos blancos, incluyendo una fracción de células madre, donde la fracción de células madre aumenta los efectos de regeneración de las plaquetas.

25

30

Una mejor comprensión de la función de los factores de crecimiento como mediadores bioquímicos de la curación de las heridas ha allanado el camino para una nueva familia de productos terapéuticos bioactivos destinados a acelerar la curación de las heridas. La administración de factores de crecimiento (recombinantes o como plaquetas autólogas) ha surgido como una posible oportunidad comercial para mejorar los resultados clínicos de la reparación de tejidos blandos, hueso y tejido conjuntivo. Sin embargo, la técnica no puede controlar ni manipular las concentraciones de los productos finales hasta un intervalo diana limitado, necesario para estudiar o definir las relaciones de dosis-respuesta y, en última instancia, validar la eficacia terapéutica de estos agentes.

35

Aunque las máquinas de hemoanálisis son capaces de medir las concentraciones plaquetarias típicas, no son adecuadas para la medición de las altas concentraciones de plaquetas que se encuentran en las transfusiones de PRP. Estas máquinas también son de gran tamaño y caras (por ejemplo, 15,000-20,000 dólares/unidad).

40

La solicitud de EE.UU. 2009/0215602 A1 desvela métodos y sistemas de separación de sangre que se proporcionan para el cálculo en mitad del procesamiento de la composición de la sangre. Se transporta la sangre a un dispositivo que tiene un conducto de salida, y se centrifuga el dispositivo para separar un componente sanguíneo de la sangre. Se transporta un flujo del componente sanguíneo desde el dispositivo por el conducto de salida, y se mide ópticamente el componente sanguíneo del conducto de salida. Con dicha medición óptica, se calculan un rendimiento actual del componente sanguíneo, un recuento previo del componente sanguíneo, el volumen de sangre por procesar para recoger una cantidad diana de dicho componente sanguíneo y/o el tiempo de procesamiento necesario para recoger una cantidad diana de dicho componente sanguíneo. La medición óptica también se puede usar para calcular una cantidad de líquido en almacenamiento que se vaya a transportar a un recipiente colector con el componente sanguíneo.

45

50

La patente de EE.UU. 5.958.250 desvela sistemas y métodos de procesamiento de sangre para separar la sangre en sus constituyentes, incluyendo un constituyente de plasma que incluye un volumen de plaquetas. Los sistemas y métodos detectan la densidad óptica del constituyente de plasma y generan un primer resultado que indica la densidad óptica. Un elemento de procesamiento integra el primer resultado relativo al volumen de constituyente de plasma y genera un resultado integrado. El resultado integrado se correlaciona con el volumen de plaquetas. Un segundo elemento de procesamiento genera un tercer resultado basado, al menos parcialmente, en el resultado integrado, que comprende parámetros de conservación del volumen de plaquetas.

55

60

La solicitud de EE.UU. 2003/0066807 A1 desvela un aparato de recogida de plaquetas. El aparato de recogida de plaquetas tiene la función de determinar si existe una tendencia de aumento o reducción del número de plaquetas recogidas mediante el uso de datos, relativos a la concentración de plaquetas, obtenidos con un sensor de la turbidez, un número esperado de plaquetas por recoger o un valor relacionado con el mismo; y la función de reducir

65

la cantidad de plaquetas por recoger en una operación de recogida de plaquetas posterior tras la recogida del plasma que contiene plaquetas a alta concentración en una operación de recogida de plasma, si la función de determinación de la tendencia de aumento/reducción del número de plaquetas recogidas determina que hay tendencia de aumento del número de plaquetas recogidas.

5 Otro reto de la formación de concentraciones de plaquetas y BMC es que los procedimientos de separación y de concentración pueden activar prematuramente las plaquetas, comenzando así la cascada de coagulación. Por lo tanto, existe la necesidad de procedimientos de separación que eviten la activación prematura de las plaquetas.

10 Sumario

A continuación, se resumen las realizaciones ilustrativas de la presente invención que se muestran en las figuras. Estas y otras realizaciones se describen de manera más completa en el apartado de Descripción detallada. Se ha de entender, sin embargo, que no se pretende limitar la invención a las formas descritas en el presente sumario de la invención ni en la descripción detallada.

15 En un aspecto, la presente divulgación describe un método de generación de un concentrado de plasma rico en plaquetas (o un concentrado de plasma rico en células de la médula ósea). El método puede incluir la separación de una muestra de sangre entera (o una muestra de médula ósea) en una fracción de glóbulos rojos, un plasma pobre en plaquetas (o un plasma pobre en células de la médula ósea) y un plasma rico en plaquetas (o plasma rico en células de la médula ósea). El método incluye además la determinación de una concentración de plaquetas (o concentración de células de la médula ósea), antes, durante o después de la separación, a través de al menos una primera medición. El método incluye además la determinación de un primer volumen de fluido en el que se realizó la primera determinación para estudiar o definir una relación de dosis-respuesta en un paciente y determinar si el concentrado rico en células diana tiene una concentración de células diana en un intervalo de concentraciones diana, estando el intervalo de concentraciones diana entre  $0,8-2,0 \times 10^6$  células diana/ $\mu\text{l}$ . El método también incluye el uso de la concentración y del primer volumen para determinar un segundo volumen de plasma pobre en plaquetas (o plasma pobre en células de la médula ósea) que, cuando se mezcla con el plasma rico en plaquetas (o plasma rico en células de la médula ósea), proporcionará una concentración de plaquetas o células de la médula ósea que estará dentro de un intervalo de concentraciones diana. Por último, el método incluye la creación de un concentrado de plasma rico en plaquetas (concentrado de plasma rico en células de la médula ósea) mezclando el segundo volumen de plasma pobre en plaquetas (o plasma pobre en células de la médula ósea) con el plasma rico en plaquetas (o plasma rico en células de la médula ósea).

20 En otro aspecto, la presente divulgación describe un sistema de concentración de células que comprende un componente de separación de sangre, un sistema de medición, un proceso lógico de concentración y flujo, y un componente de mezcla. El componente de separación de sangre tiene una entrada de muestras de sangre y está configurado para separar la muestra de sangre en una fracción de glóbulos rojos y una fracción de plasma. La fracción de plasma incluye una fracción rica en células diana y una fracción pobre en células diana. El sistema de medición mide un número total de células diana en el sistema de concentración de células. El proceso lógico de la concentración y el proceso lógico del flujo determinan un primer volumen de la fracción pobre en células diana para mezclarse con la fracción rica en células diana con el fin de formar un concentrado rico en células diana. El concentrado tiene una concentración de células diana que está dentro de un intervalo de concentraciones diana. El componente de la mezcla está configurado para formar el concentrado rico en células diana mediante la mezcla del primer volumen de la fracción pobre en células diana con la fracción rica en células diana, estando el intervalo de concentraciones diana entre  $0,8-2,0 \times 10^6$  células diana/ $\mu\text{l}$ .

Breve descripción de las figuras

50 Diversos objetos y ventajas y una comprensión más completa de la presente invención se ponen de manifiesto y se aprecian más fácilmente con referencia a la siguiente descripción detallada y a las reivindicaciones adjuntas cuando se toman en combinación con las figuras adjuntas:

55 La FIG. 1 ilustra un diagrama de flujo de las operaciones y los componentes de un sistema para la infusión autóloga de concentrados de plasma rico en plaquetas o concentrados de células de la médula ósea que tienen intervalos de concentraciones especificados.

La FIG. 2 ilustra un método de generación de un concentrado de PRP de una concentración de plaquetas específica.

60 La FIG. 3 ilustra otro método de generación de un concentrado de PRP de una concentración de plaquetas específica.

65 La FIG. 4 ilustra otro método de generación de un concentrado de PRP de una concentración de plaquetas específica.

La FIG. 5 ilustra un método de generación de un concentrado rico en BMC de una concentración de BMC específica.

La FIG. 6 ilustra otro método de generación de un concentrado de BMC de una concentración de BMC específica.

5 La FIG. 7 ilustra otro método más de generación de un concentrado de BMC de una concentración de BMC específica.

La FIG. 8 ilustra una representación de un diagrama de bloques de otro sistema de generación de una concentración y/o un volumen de plaquetas o células de la médula ósea (BMC) diana.

10 La FIG. 9 ilustra un aparato de concentración de PRP o BMC.

La FIG. 10 ilustra una realización de un envase que comprende los componentes del aparato que se pueden desechar.

15 La FIG. 11 ilustra cómo se puede usar una jeringa para proporcionar una muestra de sangre entera o de médula ósea al aparato de la FIG. 9.

La FIG. 12 ilustra un usuario interactuando con el aparato de la FIG. 9, por ejemplo, a través de una realización de pantalla táctil de la interfaz de usuario.

20 La FIG. 13 ilustra cómo se puede usar una jeringa para retirar el contenido del primer recipiente ilustrado en las FIG. 9-13.

25 La FIG. 14 muestra una representación esquemática de una realización de una máquina en la forma ilustrativa de un sistema informático en el que se puede ejecutar un conjunto de instrucciones para hacer que un dispositivo realice o ejecute uno cualquiera o más de los aspectos y/o de las metodologías de la presente divulgación.

#### Descripción detallada

30 Desde hace tiempo, existe la necesidad en la técnica de sistemas, métodos y aparatos capaces de generar intervalos de concentraciones limitados de PRP y BMCC. Con dicho tipo de concentraciones conocidas, se mejorarán enormemente los estudios clínicos de los efectos de las diferentes concentraciones en los pacientes.

35 Para los fines de la presente divulgación, las células de la médula ósea (BMC) y los concentrados de células de la médula ósea (BMCC) incluyen, pero sin limitación, uno cualquiera o más de los siguientes: células madre (células pluripotentes) (por ejemplo, monocitos), glóbulos blancos, plaquetas, neutrófilos, linfocitos, eosinófilos y basófilos. De hecho, las BMC incluyen cualquiera de las células que se encuentran en una muestra de médula ósea, y un BMCC incluye cualquiera de las células que se encuentran en una muestra de médula ósea, pero a concentraciones superiores a las naturales. A lo largo de la presente divulgación, una fracción rica en BMC se refiere a una sustancia o a un fluido que tiene una mayor concentración de una cualquiera o más de células diana o deseadas en comparación con la concentración natural en un organismo humano. Una fracción pobre en BMC se refiere a una sustancia o a un fluido que tiene una menor concentración de una cualquiera o más células diana o deseadas en comparación con la concentración natural en un organismo humano.

45 Los concentrados de la presente divulgación pueden comprender una o más de las células, las señales y los armazones. Estos componentes se pueden recoger y generar a partir de muchas fuentes. Por ejemplo, en un sistema autólogo, el paciente se trata usando componentes extraídos del propio paciente.

50 Para los fines de la presente divulgación, las "células" incluyen las células madre mesenquimales (MSC) que proceden de la médula ósea, la grasa, la sangre, la membrana sinovial u otros tejidos. Las células también incluyen células pluripotentes de la médula ósea, de la sangre y de otras fuentes. Las células incluyen además células tisulares naturales que se pueden estimular para crecer y proliferar a través de señales.

55 Para los fines de la presente divulgación, las "señales" se refieren a proteínas de factor de crecimiento humano, y se pueden obtener de plaquetas o de fuentes autocrinas (célula-célula). Además, para los fines de la presente divulgación, los "armazones" se refieren a una matriz mecánica fabricada a partir de una fibrina a base de sangre que se puede usar para administrar y proporcionar una plataforma para el crecimiento de tejido *in vivo*. Como se desvela en el presente documento, suele haber una fibrina basada en sangre que crea un armazón mediante la inducción de una cascada de coagulación en la sangre, que convierte el fibrinógeno en fibrina y que crea una matriz de fibrina mecánica. Las células y/o las proteínas de factor de crecimiento se pueden implantar o "sembrar" en un armazón, de manera que el armazón soporta la formación de tejido tridimensional a partir de la semilla.

65 La sangre entera es sangre humana de una donación de sangre convencional. La sangre entera se puede combinar con un anticoagulante durante un proceso de extracción, pero, en cambio, generalmente no se procesa. La expresión "Sangre entera" en mayúsculas significa un producto estandarizado específico para la transfusión o un procesamiento posterior. La expresión "sangre entera" en minúsculas abarca cualquier sangre extraída sin modificar.

La citometría de flujo (FCM) es una técnica para el recuento y el examen de partículas microscópicas tales como células y cromosomas, mediante su suspensión en una corriente de fluido y haciéndolas pasar por un aparato de detección electrónico. Permite el análisis multiparamétrico simultáneo de las características físicas y/o químicas de hasta miles de partículas por segundo.

Para los fines de la presente divulgación, "separación" significa separar químicamente componentes, pero no necesariamente la separación física. Por ejemplo, la centrifugación separa un fluido en capas que se aíslan principalmente entre sí basándose en la masa de partículas. Sin embargo, puede haber cierta superposición entre las capas, y se incluye en el uso realizado en la presente divulgación del término separación. Al mismo tiempo, si dichas capas se repartieran luego en diferentes recipientes, esto también se consideraría separación.

La FIG. 1 ilustra un diagrama de flujo de las operaciones y los componentes de un sistema para la infusión autóloga de concentrados de plasma rico en plaquetas o concentrados de células de la médula ósea que tienen intervalos de concentraciones especificados. La FIG. 1 se describirá en combinación con las FIG. 2-4, que describen métodos de la misma. Se extrae una muestra 102 de sangre entera o una muestra 102 de células de la médula ósea (BMC) de un paciente 104 (Bloques 202, 302, 402, 502, 602, 702). La muestra 102 entra en un componente 106 de separación de glóbulos rojos (RBC) (primer componente de separación), que separa los RBC de una fracción de plasma de la muestra 102 (Bloques 204, 304, 404, 504, 604, 704). Los RBC se pueden almacenar en un recipiente 108 de almacenamiento o evacuación de RBC (Bloques 206, 306, 406, 506, 606, 706).

La fracción de plasma se puede separar luego en un componente de separación 110 de la fracción de PRP o de BMC (segundo componente de separación). El segundo componente de separación 110 separa la fracción de plasma en una fracción de plasma pobre en plaquetas (PPP) y una fracción de plasma rico en plaquetas (PRP), o una fracción pobre en BMC y una fracción rica en BMC (Bloques 210, 310, 410, 510, 610, 710). La fracción de PPP o pobre en BMC se puede almacenar en un recipiente de almacenamiento o evacuación 112 de la fracción de PPP o pobre en BMC.

La fracción de PRP o rica en BMC se puede mezclar con una parte alícuota de la fracción de PPP o pobre en BMC en un componente de mezcla 114 (Bloques 212, 312, 412, 512, 612, 712). Como alternativa, en lugar de retirar toda la fracción de PPP o pobre en BMC y luego volver a mezclar una parte alícuota de la fracción retirada, se puede retirar una primera parte alícuota de la fracción de PPP o pobre en BMC del recipiente de almacenamiento o evacuación 112 de la fracción de PPP o pobre en BMC, dejando una segunda parte alícuota con la fracción de PRP o rica en BMC.

El componente de mezcla 114 se puede controlar mediante un proceso lógico y control 116 de la concentración y del flujo. El proceso lógico y control 116 de la concentración y del flujo determina un volumen de la parte alícuota que se añade a la fracción de PRP o rica en BMC basándose en una determinación del número total de plaquetas o BMC que había en la muestra 102 de sangre entera o muestra de BMC (Bloques 208, 308, 408, 508, 608, 708). Dicha determinación se puede realizar midiendo una concentración de plaquetas o BMC 120, 122, 124 en varios puntos del proceso mediante un componente de medición 118 de la concentración de plaquetas o de BMC. Por ejemplo, se puede medir la concentración 120 en la muestra de sangre entera o de BMC (Bloques 408, 708). La concentración 122 se puede medir tras la separación de los RBC, midiendo así la concentración de plaquetas o de BMC en un plasma (Bloques 208, 508). Como otra alternativa, una concentración 124 se puede medir una vez separada la fracción de PRP o rica en BMC en el segundo componente de separación 110 (Bloques 308, 608). Esta concentración 124 se mide en la fracción de PRP o rica en BMC. Las tres concentraciones 120, 122, 124 deben ser mediciones idénticas, aunque pueden variar, ya que las separaciones no son ideales, de manera que algunas plaquetas o BMC pueden terminar en la fracción de RBC o la fracción de PPP o pobre en BMC. Dado que las plaquetas y las células de la médula ósea se pueden separar, se puede añadir una etapa de agitación previa a la medición de cualquiera de la primera, segunda o tercera concentración 120, 122, 124.

Las concentraciones 120, 122, 124 se pueden multiplicar por el volumen 102 de la muestra, el volumen de plasma o el volumen de la fracción de PRP o rica en BMC, respectivamente, para determinar un número total de plaquetas o BMC en la fracción de PRP o rica en BMC. El proceso lógico y control 116 de la concentración y del flujo divide este número total entre una concentración diana (por ejemplo,  $0,8-2,0 \times 10^9$  plaquetas/ $\mu$ l o  $1,0-1,5 \times 10^9$  plaquetas/ $\mu$ l) para obtener un volumen diana total que deba alcanzar la mezcla. La cantidad de fracción de PPP o pobre en BMC que se mezcla con la fracción de PRP o rica en BMC es la diferencia entre el volumen diana total y el volumen de la fracción de PRP o rica en BMC (para una explicación más detallada, véanse las ecuaciones 1-6).

La mezcla de la parte alícuota de la fracción de PPP o de la parte alícuota de la fracción pobre en BMC y la fracción de PRP o rica en BMC se puede almacenar en un recipiente 126 de almacenamiento de concentrado de PRP o rico en BMC. Esta mezcla también se puede denominar concentrado de PRP o rico en BMC, y puede tener una concentración diana de plaquetas o BMC y/o un volumen diana. El concentrado de PRP o rico en BMC se encuentra entonces disponible para volver a infundirse en el paciente 104 (Bloques 216, 316, 416, 516, 616, 716). El concentrado de PRP o de BMC puede ser compatible con la sangre entrecruzada con un banco de sangre.

- 5 En una alternativa, se puede añadir un anticoagulante opcional 128 a la muestra 102 de sangre entera o muestra 102 de BMC antes de la primera separación con el fin de ayudar a evitar que se activen las plaquetas (Bloques 222, 322, 422, 522, 622, 722). Del mismo modo, se puede añadir una solución 130 al concentrado de PRP o rico en BMC para invertir el anticoagulante 128 antes o después de que el concentrado haya llegado al recipiente 126 de almacenamiento de concentrado de PRP o rico en BMC.
- 10 Otra realización puede agitar opcionalmente el concentrado antes o después de que el concentrado llegue al recipiente 126 de almacenamiento de la fracción de PRP o rica en BMC a través de un componente de agitación 132. Esta agitación puede ayudar a mezclar el concentrado y/o a iniciar la activación de las plaquetas en el concentrado. El componente de agitación 132 puede estar separado de o integrado en el recipiente 126 de almacenamiento de concentrado de PRP o rico en BMC. La agitación puede implicar la agitación en una realización.
- 15 Se puede usar una interfaz de usuario 134 para interconectarse con, controlar y monitorizar el proceso a través del proceso lógico y control 116 de la concentración y del flujo. La interfaz de usuario 134 puede permitir a un usuario (por ejemplo, un médico, un profesional de enfermería o un técnico) controlar los parámetros del procedimiento, así como proporcionar entradas, tales como una concentración diana y/o un volumen diana del concentrado de PRP o rico en BMC.
- 20 En una realización, se realiza otra medición y otro análisis de la concentración de PRP o de BMC del concentrado antes de la infusión en el paciente 104 (Bloques 214, 314, 414, 514, 614, 714). Si el concentrado se encuentra en el intervalo diana de concentraciones, entonces, el concentrado se puede proporcionar al paciente 104 (Bloques 216, 316, 416, 516, 616, 716). Sin embargo, si la concentración no se encuentra dentro del intervalo diana, entonces, el concentrado se puede volver a mezclar con la fracción de RBC (Bloques 218, 318, 418, 518, 618, 718) y volver a pasarse a través del proceso que comienza con la separación de los RBC (Bloques 204, 304, 404, 504, 604, 704), hasta que el concentrado de PRP o rico en BMC se encuentre en el intervalo diana. Cuando se determina la concentración 120 de plaquetas o de BMC de la muestra 102 (Bloques 408, 708), puede haber una determinación opcional de plaquetas totales (Bloque 424) o del número total de BMC (Bloque 724) antes de la primera separación (Bloques 404, 704).
- 25
- 30 En una realización, se puede añadir un anticoagulante opcional 128, tal como ACDA, a la muestra 102 de sangre entera o de BMC antes de que comience cualquier procedimiento de separación. Dado que el procedimiento de separación, así como el simple movimiento de las plaquetas entre los recipientes, centrifugadores o cualquier otro componente del sistema implica la agitación de las plaquetas, y la agitación puede iniciar la activación no deseada (coagulación) de las plaquetas, el anticoagulante 128 ayuda a preservar las plaquetas en un estado no activado hasta que estén listas para volverse a infundir en el paciente 104. En una realización, se pueden añadir 3 ml de anticoagulante a 50 ml de sangre entera, o se pueden añadir 5 ml de anticoagulante a 50 ml de BMC. En el caso de una muestra 102 de BMC, se puede lavar abundantemente una jeringa de aspiración antes de pasar la muestra 102 de BMC al componente de separación 106. Por ejemplo, una jeringa de aspiración se puede lavar abundantemente con heparina (por ejemplo, 1.000 U/ml).
- 35
- 40 En una realización, una muestra 102 de sangre entera o de BMC es de entre 60 y 250 ml, mientras que en otra, la muestra 102 es de entre 60 y 120 ml. La sangre entera puede obtenerse de un catéter intravenoso. Las BMC se pueden recoger por aspiración con aguja de una cavidad articular de la cara anterior o posterior de la cadera, del hombro o de la rodilla, aunque también se contemplan otros métodos y fuentes para la obtención de BMC.
- 45
- Si bien los sistemas y los métodos tratados en el presente documento describen sistemas y métodos autólogos (se vuelven a infundir en el paciente 104 del que se obtuvieron), en otras realizaciones, el paciente fuente y el paciente que se infunde pueden ser diferentes.
- 50 Una muestra 102 de BMC se puede someter a una etapa de retirada inicial para la retirada de componentes de alto peso molecular tales como partículas óseas. A continuación, se puede filtrar la muestra 102 de BMC para retirar cualquier partícula de grasa y/o de gran tamaño restante (Bloques 526, 626, 726). En un ejemplo, se puede usar un filtro de 170-260 µm.
- 55 El componente 106 de separación de glóbulos rojos (RBC) separa la muestra 102 en una fracción de RBC y una fracción de no RBC o fracción de plasma. En el caso de una muestra 102 de sangre entera, la fracción de no RBC puede incluir células nucleadas o glóbulos blancos (WBC), plaquetas y suero. En el caso de una muestra 102 de BMC, la fracción de no RBC puede incluir plasma, plaquetas y WBC (incluyendo células pluripotentes).
- 60 El componente 106 de separación de RBC puede llevar a cabo un "giro suave" mediante un centrifugador en una realización. En una realización, el giro suave puede implicar la centrifugación a 2.500-3.000 rpm durante 8-15 minutos cuando se trate de sangre entera, y de 2.400 rpm durante 10 minutos cuando la fuente sean BMC, aunque dichas especificaciones ilustrativas no son limitantes. En la centrifugación, la fracción de plasma es la fracción de la muestra 102 que se acumula sobre la fracción de RBC o más cerca del centro del centrifugador (los RBC son los componentes más pesados de una muestra de RBC). Los RBC se acumulan debajo de la fracción de plasma, ya que tienden a ser más pesados. Dentro de la fracción de plasma, la centrifugación también puede causar una
- 65

separación adicional entre principalmente las partículas de plasma y una "capa leucocitaria", que puede incluir células nucleadas, plaquetas, plasma y WBC. La capa leucocitaria tiende a encontrarse entre el plasma y la fracción de RBC.

5 El componente 106 de separación de RBC puede usar, como alternativa, una variedad de otros componentes y métodos de separación que incluyen, pero sin limitación, la separación de acuerdo con la separación de canales de microfluidos, la separación a base de polímero, levitación acústica, diversas tecnologías de "laboratorio en un chip" o "laboratorio en un CD" (disco compacto), citometría de flujo, dielectroforesis, impedancia láser, citometría de flujo y el uso de fluorescentes u otros marcadores. La separación de canales de microfluidos implica el paso de un fluido a través de canales de diámetros variables, de modo que las partículas de diferentes tamaños solo pueden caber por ciertos canales y, por lo tanto, las partículas se pueden separar en función de por qué canales pueden pasar. La levitación acústica implica el uso de señales acústicas para separar los componentes de un fluido. El método a base de polímero implica la adición de un polímero a la fracción de plasma que hace que las plaquetas se separen del plasma. El componente de separación 106 de RBC se debe seleccionar para minimizar la activación de las plaquetas y maximizar el rendimiento de las mismas.

La fracción de RBC se puede dirigir a un recipiente 108 de almacenamiento de RBC para la posterior transfusión o evacuación a través de una válvula o una bomba. La fracción de plasma se puede dirigir a un recipiente diferente o a una parte del sistema en la que se vaya a producir una separación adicional. En algunas realizaciones, la fracción de RBC puede permanecer en el primer componente de separación 106, una vez retirada la fracción de plasma, y dado que el primer componente de separación 106 puede ser desechable, la fracción de RBC se puede dejar en el primer componente de separación 106 para su retirada. En dicha realización, no se implementa un recipiente 108 separado de almacenamiento o evacuación de RBC.

25 En el caso de una fracción de plasma derivada de médula ósea, se puede usar un proceso de filtración para filtrar aún más el plasma (por ejemplo, un filtro de malla de -200 µm). Por ejemplo, se puede usar cualquier jeringa anticoagulada lavada abundantemente para empujar la fracción de plasma a través de un filtro.

Una vez que la fracción de RBC se separa de la fracción de plasma, el plasma puede pasar al componente de separación 110 de la fracción de plasma rico en plaquetas (PRP) o de la fracción rica en BMC (el segundo componente de separación). El segundo componente de separación 110 separa el plasma en una fracción de plasma pobre en plaquetas (PPP) y una fracción de plasma rico en plaquetas (PRP) o una fracción pobre en BMC y una fracción rica en BMC. En muchos casos, la fracción de PPP o la fracción pobre en BMC son las fracciones de mayor tamaño. La fracción de PPP tiende a tener una concentración baja o insignificante de plaquetas.

35 En algunas realizaciones, el segundo componente de separación 110 es el componente de separación 106 de RBC (también conocido como primer componente de separación) y que, de aquí en adelante, se denominará componente de separación 106/110. Por ejemplo, se puede usar un solo centrifugador para separar la muestra 102 en una fracción de RBC, una fracción de PRP o fracción rica en BMC, y una fracción de PPP o fracción pobre en BMC. Esto puede implicar retirar primero la fracción de plasma del componente de separación 106/110 y volver a hacer pasar luego la fracción de plasma al componente de separación 106/110 o dejar la fracción de plasma en el componente de separación 106/110, mientras que primero se separa y se retira la fracción de RBC, y luego se separa la fracción de plasma. Como alternativa, las tres fracciones se pueden separar simultáneamente.

45 En otras realizaciones, el primer componente de separación 106 y el segundo componente de separación 110 son componentes separados y diferentes. Por ejemplo, se pueden usar dos centrifugadores. Sin embargo, el primer y segundo componente de separación 106, 110 también pueden ser diferentes tipos de componentes. En un caso, se puede usar un centrifugador como primer componente de separación 106, y se puede usar un conjunto de poros de microfluidos de diferente diámetro como segundo componente de separación 110. También son posibles muchas otras variaciones.

50 Cuando el segundo componente de separación 110 es un centrifugador o cuando ambos componentes de separación 106, 110 son el mismo centrifugador, se puede realizar una segunda centrifugación o "centrifugación fuerte" de la fracción de plasma. La centrifugación fuerte puede implicar una centrifugación de 2.800-3.200 rpm durante 5-8 minutos, cuando la fuente sea sangre entera, y de 3.400 rpm durante 6 minutos cuando la fuente sea BMC, aunque estos parámetros ilustrativos no son limitantes. La centrifugación fuerte separa el plasma en una fracción de PPP y una fracción de PRP, o una fracción pobre en BMC y una fracción rica en BMC, cuando la fracción de PPP o la fracción pobre en BMC tiende a ser una capa superior de mayor tamaño que comprende partículas más ligeras y solo una pequeña concentración de plaquetas o BMC. Debajo de esta capa, se encuentra una "capa leucocitaria" o "sedimento" de menor tamaño que comprende las plaquetas o BMC más pesadas, que se acumulan hacia un radio exterior del centrifugador

El componente de separación 106 de la fracción de PRP o la fracción rica en BMC puede usar, como alternativa, una variedad de otros componentes y métodos de separación que incluyen, pero sin limitación, la separación de acuerdo con la separación de canales de microfluidos, la separación a base de polímero, levitación acústica,

diversas tecnologías de “laboratorio en un chip” o “laboratorio en un CD” (disco compacto), citometría de flujo, dielectroforesis, impedancia láser, citometría de flujo y el uso de fluorescentes u otros marcadores

5 Una vez separada la fracción de plasma, la fracción de PPP o pobre en BMC se puede dirigir a un recipiente de almacenamiento o evacuación 112 de la fracción de PPP o pobre en BMC. Por ejemplo, se pueden usar una o más válvulas y bombas para dirigir el flujo de fluido.

10 En una realización, en lugar de retirar la fracción de PPP o pobre en BMC, solo se retira una parte alícuota de esta fracción al recipiente de almacenamiento o evacuación 112. La selección del volumen de dicha parte alícuota se discutirá más adelante en relación con el proceso lógico y control 116 de la concentración y del flujo, y el componente de mezcla 114.

15 El componente de mezcla 114 puede agitar la mezcla de PRP y PPP o de fracción rica en BMC y pobre en BMC con el fin de suspender las células en el fluido. Como alternativa, la mera acción de forzar las dos sustancias hacia el mismo recipiente puede conseguir una mezcla satisfactoria.

20 Con el fin de conseguir la concentración diana, el volumen de la parte alícuota de fracción de plasma PPP o pobre en BMC para mezclarse con la fracción de plasma PRP o rico en BMC se determina de la siguiente manera. Para facilitar la lectura, la presente descripción solo se refiere a las plaquetas, pero es igualmente aplicable a las BMC. En primer lugar, se determina el número total de plaquetas,  $P_{total}$ , de la muestra 102. Esto se realiza mediante: (a) la medición o estimación de una concentración de plaquetas,  $PC_0$  (por ejemplo, las concentraciones de plaquetas 120, 122, 124) y (b) la multiplicación de la concentración de plaquetas,  $PC_0$ , por un volumen,  $V_0$ , del fluido en el que se midió la concentración de plaquetas. Esto se muestra en la siguiente ecuación (1):

$$(1) \quad P_{total} = PC_0 \times V_0$$

25 Hay al menos tres ubicaciones o momentos durante el proceso en los que se pueden determinar la concentración  $PC_0$  y el volumen  $V_0$ . En primer lugar, la primera concentración 120 se puede medir de la muestra 102 de sangre entera. En segundo lugar, la segunda concentración 122 se puede medir una vez separado el primer componente de separación 106 de la muestra 102 en una fracción de RBC y una fracción de plasma. La segunda concentración 122 se puede medir bien antes o después de pasar la fracción de RBC al recipiente de almacenamiento o evacuación 108 de RBC. De cualquier manera, la segunda concentración 122 se toma de la fracción de plasma, no de la fracción de RBC. En tercer lugar, la tercera concentración 124 se puede medir una vez separada la fracción de plasma en una fracción de RBC y una fracción de PPP.

35 La concentración  $PC_0$  se pasa al proceso lógico y control 116 de la concentración y del flujo, en el que se usa para determinar un número total de plaquetas en el volumen  $V_0$  de fluido que se midió. El componente de medición 118 de la concentración de plaquetas o de BMC también puede medir el volumen  $V_0$  (por ejemplo, a través de un medidor de flujo) en el que se midió la concentración  $PC_0$ . Como alternativa, la concentración  $PC_0$  se puede medir dentro de un espacio que tenga un volumen  $V_0$  conocido. Por ejemplo, la muestra 102, o la fracción de plasma o el PRP pueden tener volúmenes conocidos. En otra realización, un usuario (por ejemplo, un médico, un profesional de enfermería o un técnico) puede introducir el volumen  $V_0$  en la interfaz de usuario 134, que proporciona el volumen  $V_0$  al proceso lógico y control 116 de la concentración y del flujo. Por lo tanto, el proceso lógico y control 116 de la concentración y del flujo puede utilizar tanto la concentración  $PC_0$  como el volumen  $V_0$  del fluido, medidos para obtener el número total de plaquetas  $P_{TOTAL}$  de acuerdo con la Ecuación 1.

45 Para lograr una concentración de PRP diana (por ejemplo, definida por el usuario),  $PC_t$ , se mezcla alguna parte alícuota de la fracción de PPP con la fracción de PRP. Un intervalo ilustrativo de las concentraciones de PRP diana  $PC_t$  es de  $0,8-2,0 \times 10^6$  plaquetas/ $\mu$ l o  $1,0-1,5 \times 10^6$  plaquetas/ $\mu$ l. Una concentración de PRP diana ilustrativa,  $PC_t$ , es de  $1,5 \times 10^6$  plaquetas/ $\mu$ l. En una realización, esto implica la retirada de parte de la fracción de PPP tras mezclar el resto de la fracción de PPP y de la fracción de PRP. En otra realización, se retira la fracción de PPP, y luego se vuelve a mezclar una parte de la fracción de PPP con la fracción de PRP. En ambos casos, la cantidad de la fracción de PPP que se mezcla con la fracción de PRP se puede determinar mediante el cálculo de un volumen diana para la mezcla  $V_t$ . Este valor se da de la siguiente manera:

$$(2) \quad V_t = \frac{P_{total}}{PC_t}$$

55 El volumen de destino,  $V_t$ , es igual al número de plaquetas,  $P_{total}$ , dividido entre la concentración de PRP diana,  $PC_t$ . La ecuación (2) se puede simplificar mediante la ecuación de sustitución (1) para  $P_{total}$  en la siguiente Ecuación (2):

$$(3) \quad V_t = \frac{PC_0 \times V_0}{PC_t}$$



Para obtener la concentración de PRP diana,  $PC_t$ , se mezcla  $V_{PPP}$  de una parte alícuota de la fracción de PPP con la fracción de PRP, que tiene un volumen  $V_{PRP}$  (medido con un medidor de flujo, por ejemplo), de manera que la combinación equivale al volumen diana  $V_t$ . Esto puede escribirse como la ecuación (4), y se resuelve para  $V_{PPP}$  de la parte alícuota en las siguientes ecuaciones (5) y (6):

$$(4) \quad V_t = V_{PPP} + V_{PRP}$$

$$(5) \quad V_{PPP} + V_{PRP} = \frac{PC_0 \times V_0}{PC_t}$$

$$(6) \quad V_{PPP} = \frac{PC_0 \times V_0}{PC_t} - V_{PRP}$$

- 5 Así pues, cuando se retira una parte de la fracción de PPP, se retira parte de la fracción de PPP hasta que el volumen de la fracción de PPP restante y de la fracción de PRP sea igual a  $V_t$ . Dicho de otra manera, se retira una parte de la fracción de PPP hasta que la fracción de PPP restante tenga un volumen igual al  $V_{PPP}$  de la Ecuación 6.
- 10 Cuando se retira toda la fracción de PPP, y luego se vuelve a añadir una parte alícuota que tiene volumen  $V_{PPP}$  con la fracción de PRP,  $V_{PRP}$ , la parte alícuota de la fracción de PPP se puede seleccionar de manera que el volumen combinado de la parte alícuota de la fracción de PPP,  $V_{PPP}$ , y el volumen de la fracción de PRP,  $V_{PRP}$ , sea igual al volumen diana  $V_t$ .
- 15 La Ecuación (6) puede verse afectada por el hecho de que algunas plaquetas son retiradas con los RBC por el primer componente de separación 106, y con la fracción de PPP por el segundo componente de separación 110, sin embargo, dichos números se pueden considerar insignificantes cuando las separaciones se llevan a cabo con cuidado.
- 20 Como se ha señalado anteriormente, la deducción de la Ecuación 6 se describió en relación con el PRP, pero es igualmente aplicable al plasma rico en BMC. En particular, la Ecuación 7 muestra la Ecuación 6 aplicada cuando la médula ósea es la fuente y un concentrado de plasma rico en BMC es el objetivo final.

$$(7) \quad V_{BMC-} = \frac{BMCC_0 \times V_0}{BMCC_t} - V_{BMC+}$$

- 25 La concentración de las BMC,  $BMCC_0$ , se puede medir de la muestra 102 de BMC, después de que el primer componente de separación 106 haya separado la muestra 102 de BMC en una fracción de RBC y una fracción de plasma, o después de que el segundo componente de separación 110 haya separado la fracción de plasma en una fracción pobre en BMC y una fracción rica en BMC. La concentración diana de BMC es  $BMCC_t$ . El volumen de la fracción rica en BMC es  $V_{BMC+}$  y el volumen de la parte alícuota de la fracción pobre en BMC que se mezcla con la fracción rica en BMC es  $V_{BMC-}$ . Una vez más, la parte alícuota de la fracción pobre en BMC,  $V_{BMC-}$ , se puede añadir a la fracción rica en BMC o dejar con la fracción rica en BMC cuando se retira el resto de la fracción pobre en BMC. Las Ecuaciones 6 y 7 también se pueden adaptar al uso con cualquier célula sanguínea diana tal como glóbulos blancos (por ejemplo, monocitos), plaquetas, células de la médula ósea y células "madre" o "pluripotentes".
- 35 Durante dicho proceso, el proceso lógico y control 116 de la concentración y del flujo puede proporcionar instrucciones a un usuario humano a través de la interfaz de usuario 134, indicándole qué cantidad de la fracción de PPP o fracción pobre en BMC se mezcla con la fracción de PRP o fracción rica en BMC. Como alternativa, el proceso lógico y control 116 de la concentración y del flujo puede proporcionar un valor para el volumen diana  $V_t$  a un usuario a través de la interfaz de usuario 134. En otra realización, el proceso lógico y control 116 de la concentración y del flujo puede controlar automáticamente el componente de mezcla 114 y controlar el volumen de la fracción de PPP o pobre en BMC que se mezcla con la fracción de PRP o rica en BMC. Por ejemplo, el proceso lógico y control 116 de la concentración y del flujo puede controlar una válvula y una bomba que bien retiren una cierta cantidad de la fracción de PPP o vuelvan a añadir una cierta cantidad de la fracción de PPP con la fracción de PRP o rica en BMC.
- 40 La interfaz de usuario 134 puede mostrar la información que describe las mediciones que está realizando el componente de medición 118 de la concentración de plaquetas o de BMC. La interfaz de usuario 134 puede ser parte o independiente del proceso lógico y control 116 de la concentración y del flujo. Esta información también se puede almacenar en una memoria o transferirse a través de telemetría a un sistema central de mantenimiento de registros.
- 50

La interfaz de usuario 134 también puede ser usada por un usuario (por ejemplo, médico, profesional de enfermería o técnico) para establecer una concentración de PRP o BMC PC<sub>t</sub> o BMCC<sub>t</sub> y un volumen diana V<sub>t</sub>. La interfaz de usuario 134 también se puede usar para solicitar y mostrar los resultados de un análisis de la concentración del concentrado de PRP o rico en BMC. Dicho análisis se puede realizar una vez formado el concentrado, pero antes de la administración del mismo a un paciente, para garantizar la creación de la concentración deseada.

El componente de medición 118 de la concentración de plaquetas o de BMC puede incluir una variedad de máquinas y métodos de hemoanálisis. Por ejemplo, la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) puede determinar la concentración de una célula madre, pluripotente específica, en un fluido basándose en marcadores de superficie celular de anticuerpos. Otras realizaciones ilustrativas del componente de medición 118 de la concentración incluyen las de microscopía óptica, dispersión de la luz óptica e impedancia eléctrica. La microscopía óptica implica un componente de reconocimiento de patrones y formas controlado por ordenador, y un proceso lógico que cuente y diferencie las partículas por forma y tamaño. En algunos casos, este método no se puede realizar de forma continua y, por lo tanto, puede requerir el muestreo de distintas partes de un fluido. En una realización, se puede implantar el muestreo de una capa fina de líquido. La dispersión de la luz óptica puede usar una corriente orientada hidrodinámica de fluido, y el método puede contar diferentes tipos de células y moléculas, especialmente cuando se usan marcadores de fluorescencia o anticuerpos. La impedancia eléctrica puede usar un vapor orientado hidrodinámico de fluido.

En algunas realizaciones, cualquiera de estos componentes de medición 118 de la concentración se puede combinar con un componente de separación de partículas. Por ejemplo, se podría usar un dispositivo de canales de microfluidos para separar las partículas de una fracción de PRP, mientras que un dispositivo de dispersión de luz mide un número de partículas en cada corriente de fluido. La combinación de un dispositivo de separación de partículas y un dispositivo de recuento de partículas puede ser beneficiosa cuando el dispositivo de recuento de partículas no sea capaz de distinguir entre los diferentes tipos de células o partículas dentro de la misma corriente.

En una realización, se puede realizar el hemoanálisis en el concentrado de PRP o rico en BMC (Bloques 214, 314, 414, 514, 614, 714). Este hemoanálisis puede ser además de o como alternativa a una o más etapas de hemoanálisis previas. Por ejemplo, en una realización, el hemoanálisis se puede realizar en la muestra de sangre entera o en la muestra de BMC y en el concentrado. En otra realización, el hemoanálisis se puede realizar después de la primera separación, así como en el concentrado.

En una realización, se pueden preparar trombina autóloga o una matriz de fibrina autóloga de parte o toda la fracción de PPP o pobre en BMC del recipiente de almacenamiento o evacuación 112 de la fracción de PPP o pobre en BMC (Bloques 220, 320, 420, 520, 620, 720). Los efectos del anticoagulante 128 se pueden invertir, por ejemplo, mediante la adición de CaCl (por ejemplo, se puede añadir una solución al 10 % de CaCl a la fracción de PPP o pobre en BMC). La fracción de PPP o pobre en BMC y cualquier sustancia usada para invertir el anticoagulante 128 se puede agitar (por ejemplo, durante aproximadamente 1 minuto) dando lugar a la formación de un coágulo de fibrina. Durante o después de la formación del coágulo, se puede añadir una fracción de PPP adicional o parte de la fracción pobre en BMC a la mezcla. Se puede realizar una agitación adicional, y se puede dar tiempo a la mezcla para que el coágulo se siga formando. Una vez completada la coagulación, se puede retirar el coágulo y comprimir manualmente (o volver a centrifugar para comprimir).

En el caso de la formación de trombina autóloga, la proteína protrombina se escinde en el proceso de inversión del anticoagulante y se produce trombina. La retirada del coágulo deja suero y una concentración baja de trombina. La trombina se puede combinar con el PRP implantado para iniciar y regular la liberación de factores de crecimiento de plaquetas para estimular respuestas regenerativas.

Cuando el fibrinógeno del PPP se activa mediante la inversión con calcio del anticoagulante o la adición de la trombina autóloga para inducir la escisión del fibrinógeno en fibrina, se forma una matriz o un almacén de fibrina. La matriz o el almacén se pueden implantar para actuar como un almacén al que las células naturales o implantadas se pueden unir y proliferar para formar tejido nuevo.

El coágulo se puede transferir a un destino de implantación en el paciente 104. El destino de implantación puede ser una articulación o una zona en la que se desee la regeneración, o cualquier otro sitio seleccionado del paciente 104. Tras retirar el coágulo, el PPP o pobre en BMC restante se puede usar para mejorar la activación plaquetaria mediante la combinación con el concentrado de PRP o rico en BMC ya sea *in vitro* (creando una membrana de PRP) o *in vivo* (creando un PRP activado). Aunque la trombina o la matriz de fibrina se pueden aplicar de manera autóloga, también se puede implantar en otro paciente que no sea el paciente 104.

La trombina o la matriz de fibrina autólogas se pueden retirar con una jeringa e implantarse en el paciente 104. En una alternativa, se puede crear de forma autónoma una matriz de fibrina o gel de plaquetas autólogo (APG) a partir de PPP activado y una parte del concentrado de PRP. Otros productos incluyen PPP activado que contiene trombina autóloga. Los procedimientos manuales o autónomos se pueden llevar a cabo en la sala de operaciones o en el lugar de tratamiento deseado.

El PPP puede incluir una fracción de sangre acelular que comprenda ~55 % del volumen sanguíneo, contenido de agua del 91 % y proteínas residuales. Aunque el PPP preferentemente está desprovisto de plaquetas, en la práctica, se puede observar una pequeña fracción de plaquetas residuales.

5 En algunas realizaciones, el componente de medición 118 de la concentración de plaquetas o de BMC también puede medir las concentraciones de otros componentes sanguíneos tales como la concentración de glóbulos blancos. Otras concentraciones que se pueden medir incluyen las de los glóbulos rojos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos. Estas mediciones alternativas se pueden usar en realizaciones en las que también se estén concentrando concentraciones de células sanguíneas distintas de las plaquetas y de las BMC hasta una concentración diana o intervalo de concentraciones diana.

15 A veces, la mezcla del componente de mezcla 114 no es suficiente para suspender las plaquetas en el concentrado de PRP o de BMC. En estos casos, o para potenciar la activación de las plaquetas, un componente de agitación 132 opcional puede agitar el concentrado de PRP o de BMC. Cuando se usan BMC, el sedimento se puede reconstituir (aumento del contenido de líquido) en uno de los tres medios para facilitar la infusión en el paciente 104: aspirado de médula ósea acelular; plasma sanguíneo; o PRP.

20 Uno o más del primer y segundo componente de separación 108, 110, el componente de medición 118 de la concentración de plaquetas o de BMC, el proceso lógico y control 116 de la concentración y del flujo, y el componente de flujo 114 se pueden desechar después de su uso para mejorar la esterilidad dentro del sistema 300. Todos los recipientes de almacenamiento 108, 112, 126 también pueden ser desechables.

25 El sistema 100 puede adoptar una variedad de formas, incluyendo una forma miniaturizada tal como un sistema de sobre-mesa o de sujeción manual u otras implantaciones portátiles. La portabilidad puede incluir ser de sujeción manual, de peso ligero y/o estar soportado por un carro. El sistema 100 también podría estar diseñado para que se pudieran administrar infusiones continuas o intermitentes de PRP a un paciente durante un período de tiempo. En una realización, el sistema 100 se puede implantar total o parcialmente como uno o más dispositivos de sistemas microelectromecánicos (MEMS) y/o como un laboratorio en un chip.

30 Los sistemas y métodos desvelados en el presente documento también pueden alcanzar una serie de objetivos adicionales a través de varias realizaciones alternativas. En una realización, la esterilidad del producto sanguíneo se mantiene, por ejemplo, a través de la inclusión de uno o más componentes desechables. En una realización, se recoge sangre de un paciente antes de una operación y se usa para preparar un producto de PRP final para la operación. En una realización, se crea una membrana de PRP. Como alternativa, se usa PRP activado para crear PRP dentro de una matriz de fibrina autóloga. En otra realización, el sistema 100 puede crear un concentrado de PRP o de BMC en 30 minutos.

40 Los sistemas y métodos pueden incorporar, o estar incorporados en, las tecnologías y componentes existentes usados en la transfusión automatizada y en las máquinas de hemoanálisis. Además del recuento, de la medición y del análisis de los glóbulos rojos, los glóbulos blancos, las plaquetas u otros componentes de la sangre, los analizadores automatizados de la hematología también pueden medir la cantidad de hemoglobina o reguladores químicos de la sangre y de cada glóbulo rojo.

45 Los sistemas y métodos descritos en el presente documento se pueden aplicar a tejido lesionado o patológico para estimular y/o potenciar la reparación o la regeneración. Los métodos de implantación pueden incluir la aplicación percutánea (inyección) o intraoperatoria (quirúrgica). Otras realizaciones pueden incluir un sistema de administración continua o periódica implantado o parcialmente implantado para proporcionar dosis definidas a lo largo del tiempo.

50 Otras fuentes de muestras ilustrativas que se pueden usar en lugar de la sangre entera y la médula ósea incluyen la grasa, la membrana sinovial y otros tejidos.

La FIG. 2 ilustra un método de generación de un concentrado de PRP de una concentración de plaquetas específica. El método 200 incluye la obtención de una muestra de sangre entera en la operación 202 de obtención de la muestra y, opcionalmente, la adición de un anticoagulante en la operación 222 de adición de anticoagulante. A continuación, una primera operación de separación 204 separa la muestra en una fracción de glóbulos rojos (RBC) y una fracción de plasma. La fracción de RBC se puede desechar o reperfundir en un paciente en una operación de desechado o reperfusión 206.

60 El número total de plaquetas,  $P_{total}$ , de la fracción de plasma se puede determinar en la operación de determinación 208. Esta operación 208 utiliza al menos una medición tal como una concentración medida por un aparato de hemoanálisis. La concentración de plaquetas,  $PC_0$ , se puede multiplicar por un volumen  $V_0$  del líquido, medido por un medidor de flujo, por ejemplo, desde el que se realizó la medición de la concentración. El volumen  $V_0$ , veces de concentración  $PC_0$ , da un número total de plaquetas,  $P_{total}$ . A continuación, se separa más la fracción de plasma a través de la segunda operación de separación 210 (por ejemplo, separación de canales de microfluidos o centrifugación), en la que se generan una fracción de plasma rico en plaquetas (PRP) (alta concentración de plaquetas) y una fracción de plasma pobre en plaquetas (PPP) (concentración de plaquetas insignificante).

La fracción de PRP y una parte alícuota de la fracción de PPP,  $V_{PPP}$ , se mezclan en la operación de mezcla 212. El volumen de la parte alícuota,  $V_{PPP}$ , se puede basar en una concentración de plaquetas diana,  $PC_t$ , y el número total de plaquetas,  $P_{total}$  (por ejemplo, Ecuación 6). La operación de mezcla 212 forma un concentrado de PRP que luego se puede suministrar a un paciente en la operación 216 de suministro de concentrado de PRP al paciente. La fracción de PPP restante también se puede usar para formar una preparación de trombina autóloga para su implantación en un paciente en una operación 220 de preparación de trombina autóloga.

Opcionalmente, tras la formación del concentrado de PRP en la operación de mezcla 212, se puede comprobar la concentración de plaquetas para garantizar que la concentración de plaquetas esté un intervalo diana (o dentro de un margen de error de una concentración de plaquetas diana) en una decisión opcional 214. Si la decisión 214 determina que el concentrado de PRP está en el intervalo diana o dentro de un margen de error de la concentración diana, entonces, se puede suministrar el concentrado de PRP a un paciente. En caso contrario, entonces, se puede volver a mezclar el concentrado con la fracción de RBC y se puede repetir el proceso partiendo de la primera operación de separación 204.

Dado que la sedimentación puede hacer que el concentrado se separe, al menos parcialmente, en una capa de PPP y una capa de PRP, se puede usar opcionalmente una operación de agitación para suspender las plaquetas antes de la infusión.

La FIG. 3 ilustra otro método de generación de un concentrado de PRP de una concentración de plaquetas específica. El método 300 es casi idéntico al método 200, a excepción de que la operación de determinación 308 tiene lugar en la fracción de PRP después de la segunda operación de separación 310, en lugar de entre la primera y segunda operación de separación 304, 310. En algunas realizaciones, la primera y segunda operación de separación 304, 310 se pueden realizar en una sola operación mediante un solo componente de separación (por ejemplo, un centrifugador que crea una fracción de RBC, una fracción de PRP y una fracción de PPP).

La FIG. 4 ilustra otro método de generación de un concentrado de PRP de una concentración de plaquetas específica. El método 400 es casi idéntico a los métodos 200 y 300, con la excepción principal de que la operación de determinación 408 tiene lugar en la muestra de sangre entera, antes de cualquiera de las operaciones de separación 404, 410.

Otra distinción de los métodos 200 y 300 es que la determinación del número total de plaquetas en la muestra de sangre entera basada en al menos una operación de medición 408 se puede llevar a cabo en paralelo con una operación 422 de adición opcional de anticoagulante a la muestra de sangre entera. Como alternativa, ambas operaciones 408, 422 se pueden llevar a cabo en momentos superpuestos o no superpuestos entre una operación 402 de obtención de la muestra de sangre entera y la primera operación de separación 404.

Una última distinción es que, después de una operación 418 de remezcla opcional de la fracción de glóbulos rojos con el concentrado de PRP, el método 400 puede incluir una operación 424 de determinación opcional del número total de plaquetas. Esta operación 424 puede determinar un número total de plaquetas en la mezcla de RBC y el concentrado de PRP tras volverse a mezclar, en el caso de que el concentrado de PRP no esté comprendido en un intervalo de concentraciones diana de acuerdo con una decisión 414. En algunas realizaciones, la primera y segunda operación de separación 404, 410 se pueden realizar en una sola operación mediante un solo componente de separación (por ejemplo, un centrifugador que cree una fracción de RBC, una fracción de PRP y una fracción de PPP).

La FIG. 5 ilustra un método de generación de un concentrado rico en BMC de una concentración de BMC específica. El método 500 incluye la obtención de una muestra de BMC en la operación 502 de obtención de la muestra y, opcionalmente, la adición de un anticoagulante en la operación 522 de adición de anticoagulante. A continuación, una primera operación de separación 504 separa la muestra en una fracción de glóbulos rojos (RBC) y una fracción de plasma. La fracción de RBC se puede desechar o reperfundir en un paciente en una operación 506 de desechado o reperfusión.

El número total de BMC,  $BMC_{total}$ , de la fracción de plasma se determina en la operación de determinación 508. Esta operación 508 utiliza al menos una medición tal como una concentración medida por un aparato de hemoanálisis. La concentración de BMC,  $BMC_0$ , se puede multiplicar por un volumen,  $V_0$ , del líquido, medido por un medidor de flujo, por ejemplo, desde el que se realizó la medición de la concentración. El volumen  $V_0$ , veces de concentración  $BMC_0$ , da un número total de BMC,  $BMC_{total}$ . A continuación, se separa más la fracción de plasma a través de una segunda operación de separación 510 (por ejemplo, separación de canales de microfluidos o centrifugación), en la que se generan una fracción de plasma rico en BMC (alta concentración de BMC) y una fracción de plasma pobre en BMC (concentración de BMC insignificante).

La fracción rica en BMC y una parte alícuota,  $V_{BMC-}$ , de la fracción pobre en BMC se mezclan en la operación de mezcla 512. El volumen de la parte alícuota,  $V_{BMC-}$ , se puede basar en una concentración de BMC diana,  $BMCC_t$ , y un número total de BMC,  $BMC_{total}$  (por ejemplo, Ecuación 7). La operación de mezcla 512 forma un concentrado de BMC que se puede suministrar a un paciente en la operación 516 de suministro de concentrado de BMC al paciente.

La fracción pobre en BMC restante también se puede usar para formar una preparación de trombina autóloga para su implantación en un paciente en una operación en una operación 520 de preparación de trombina autóloga.

5 Opcionalmente, tras formarse el concentrado de BMC en la operación de mezcla 512, se puede comprobar la concentración de BMC para asegurarse de que la concentración de BMC se encuentra en un intervalo diana (o dentro de un margen de error de una concentración de BMC diana) en una decisión opcional 514. Si la decisión 514 determina que el concentrado de BMC se encuentra en el intervalo diana o dentro de un margen de error de la concentración diana, entonces, el concentrado de BMC se puede suministrar a un paciente. En caso contrario, entonces, se puede volver a mezclar el concentrado con la fracción de BMC y se puede repetir el proceso partiendo de la primera operación de separación 504.

15 Como la sedimentación puede hacer que el concentrado se separe, al menos parcialmente, en una capa pobre en BMC y una capa rica en BMC, se puede usar opcionalmente una operación de agitación para suspender las BMC antes de la infusión. El método también puede incluir una operación 524 de filtración opcional de la fracción de plasma después de la primera operación de separación 504. La operación 524 de filtración opcional puede retirar cualquier resto de grasa y/o partículas grandes. En un ejemplo, se puede usar un filtro de 170-260 µm.

20 La FIG. 6 ilustra otro método de generación de un concentrado de BMC de una concentración de BMC específica. El método 600 es casi idéntico al método 500, a excepción de que la operación de determinación 608 tiene lugar en la fracción de BMC después de la segunda operación de separación 610, en lugar de entre la primera y segunda operación de separación 604, 610.

25 La FIG. 7 ilustra otro método más de generación de un concentrado de BMC de una concentración de BMC específica. El método 700 es casi idéntico a los métodos 500 y 600, con la excepción principal de que la operación de determinación 708 tiene lugar en toda la muestra de médula ósea, antes de cualquiera de las operaciones de separación 704, 710.

30 Otra distinción de los métodos 500 y 600 es que la determinación del número total de BMC de la muestra de médula ósea basada en al menos una operación de medición 708 se puede llevar a cabo en paralelo con una operación 722 de adición opcional de anticoagulante a la muestra de médula ósea. Como alternativa, ambas operaciones 708, 722 se pueden llevar a cabo en cualquier momento superpuesto o no superpuesto entre la operación de obtención 702 de una muestra de médula ósea y la primera operación de separación 704.

35 Una última distinción es que, después de una operación 718 de remezcla opcional de la fracción de glóbulos rojos con el concentrado de BMC, el método 700 puede incluir una operación 724 de determinación opcional del número total de BMC. Esta operación 724 puede determinar un número total de BMC en la mezcla de RBC y el concentrado de BMC tras volverse a mezclar, en el caso de que el concentrado de BMC no esté comprendido en un intervalo de concentraciones diana de acuerdo con una decisión 714. E

40 La FIG. 8 ilustra una representación de diagrama de bloques de otro sistema 800 para la generación de una concentración y/o un volumen diana de plaquetas o de células de la médula ósea (BMC). El sistema 800 obtiene o se proporciona con una muestra 802 de sangre entera o de BMC de un paciente 804. La muestra se puede mezclar opcionalmente con un anticoagulante 806 antes de entrar en un separador 808 (por ejemplo, canales de microfluidos o centrifugador, por nombrar dos).

45 El separador 808 puede separar la muestra 802 en dos fracciones: una fracción de glóbulos rojos (RBC) y una fracción de plasma. El separador 808 también puede separar la muestra 802 en tres fracciones: una fracción de RBC, una fracción pobre en células diana y una fracción rica en células diana. Las células diana son las que se desea que estén en una determinada concentración en el concentrado final. Por ejemplo, las plaquetas, los glóbulos blancos, las células de la médula ósea, las células pluripotentes y las células similares a las células madre son algunas células diana ilustrativas. Cualquier célula que se encuentre en una muestra de médula ósea puede ser una célula diana. La fracción pobre en células diana es aquella que tiene una concentración insignificante de células diana, mientras que la fracción rica en células diana tiene una concentración superior a la natural de células diana.

50 Cuando cada fracción sale del separador 808, un medidor de flujo 810 puede medir un volumen de fluido que salga del separador 808. Estos datos se pueden pasar a un componente de proceso lógico y control 812 de la concentración y del flujo. El proceso lógico y control 812 de la concentración y del flujo controla un primer componente de mezcla controlable 818 para controlar un flujo de fluido. El proceso lógico y control 812 del flujo también determina un número total de células diana multiplicando una concentración de células diana que salen del separador 808 por un volumen de fluido que sale de la separación 808. El proceso lógico y control 812 de flujo determina además cómo se van a mezclar los fluidos y en qué cantidades con el fin de obtener una concentración diana de las células diana.

65 Los datos que representan caudales, concentraciones, volúmenes y otros parámetros se pueden mostrar a un usuario a través de la interfaz de usuario 814.

La concentración de diversas partículas y células de cada fracción se mide con un hemoanalizador 818. El hemoanalizador 818 se puede realizar en una variedad de dispositivos y métodos tales como la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), la microscopía óptica, la dispersión de la luz óptica y la impedancia eléctrica, por nombrar algunas. Las concentraciones medidas por el hemoanalizador 816 se pasan al proceso lógico y control 812 de la concentración y del flujo, que usa estas mediciones para determinar un número total de células diana en el fluido. A partir de este número total de células diana, el proceso lógico y control 812 de la concentración y del flujo puede determinar instrucciones de un primer componente de mezcla controlable 818 (por ejemplo, la bomba o la válvula, o una combinación de ambas).

El primer componente de mezcla controlable 818 dirige la fracción de RBC a un recipiente 820 de almacenamiento o evacuación de RBC. También dirige la fracción pobre en diana a un recipiente 822 de almacenamiento o evacuación de la fracción pobre en diana. Por último, dirige la fracción rica en diana a un recipiente 824 de almacenamiento de fracción rica en diana. El orden en que estas tres fracciones se dirigen a sus respectivos recipientes 820, 822, 824 no es limitante y, por tanto, se prevé cualquier combinación u orden.

El proceso lógico y control 812 de la concentración y del flujo también da instrucciones a un segundo componente de mezcla controlable (por ejemplo, bomba, válvula, o combinación de ambos) para añadir una parte alícuota de la fracción pobre en diana a toda la fracción rica en diana en el recipiente 824 de almacenamiento de fracción rica en diana. El volumen de la parte alícuota se selecciona de modo que la combinación del recipiente 824 de almacenamiento de fracción rica en diana tenga una concentración o un intervalo de concentraciones de la célula diana que coincida con una concentración diana o un intervalo de concentraciones diana.

Cuando se alcanza esta concentración diana o intervalo de concentraciones diana, hay un concentrado de células diana en el recipiente 824 de almacenamiento de fracción rica en diana, y se puede proporcionar al paciente 804 (o a otro paciente). La fracción pobre en diana restante que queda en el recipiente 822 de almacenamiento o evacuación de fracción pobre en diana también se puede proporcionar al paciente 804 (o a otro paciente) como una trombina o una matriz de fibrina autólogas.

La FIG. 9 ilustra un aparato 900 de concentración de PRP o BMC. El aparato 900 incluye un centrifugador de disco 902 para la separación de una muestra de sangre entera o de BMC. El centrifugador de disco 902 puede separar la muestra en una fracción de glóbulos rojos (RBC) (capa exterior), un plasma rico en plaquetas (PRP) o una fracción rica en BMC (capa intermedia), y una fracción de plasma pobre en plaquetas (PPP) o fracción pobre en BMC (capa interna). La muestra de sangre entera o de médula ósea se puede proporcionar al centrifugador a través de una abertura 918, que puede aceptar la aguja de una jeringa, por ejemplo. La abertura 918 se puede configurar de manera que se encuentre cerrada, a menos que se coloque en la abertura la aguja de una jeringa, permitiendo así que el fluido pase al centrifugador de disco 902, pero que no se escape por la abertura.

Primero se puede retirar la fracción de PPP o pobre en BMC, y puede pasar por un medidor de flujo 904 y un módulo analizador 906 de la hematología a un primer recipiente 910. El fluido puede pasar por el medidor de flujo 904 o el módulo analizador 906 de la hematología en cualquier orden, aunque, como se ilustra, el flujo pasa primero por el medidor de flujo 904. El medidor de flujo 906 proporciona el volumen de la fracción de PPP o pobre en BMC. La retirada y el flujo de la fracción de PPP o pobre en BMC pueden ser controlados por una válvula/bomba 908 controladas por ordenador.

Una vez que la fracción de PPP o pobre en BMC se ha retirado del centrifugador de disco 902, la fracción de PRP o rica en BMC se convierte en la capa inferior o más interna, y se puede retirar seguidamente. La fracción de PRP o rica en BMC pasa a través del medidor de flujo 906, proporcionando un volumen de la fracción de PRP o rica en BMC al proceso lógico del aparato 900 (por ejemplo, un procesador). La fracción de PRP o rica en BMC también puede pasar a través de un módulo analizador 906 de la hematología que mida un número total de plaquetas o BMC de la fracción de PRP o rica en BMC. Dado este volumen y número total de plaquetas o BMC, el proceso lógico del aparato puede determinar una concentración de plaquetas o de BMC de la fracción de PRP o rica en BMC cuando el número total de plaquetas o de BMC calcula el volumen de la fracción de PRP o fracción rica en BMC. La fracción de PRP o fracción rica en BMC se puede dirigir a un segundo recipiente 912. La retirada y el flujo de la fracción de PRP o rica en BMC pueden ser controlados por una válvula/bomba 908 controladas por ordenador.

La fracción de RBC puede permanecer en el centrifugador de disco y, como el centrifugador es desechable, no hay que realizar ninguna acción adicional en relación con la fracción de RBC. El proceso lógico del aparato 900 puede determinar una parte alícuota de la fracción de PPP, o de la fracción pobre en BMC, que se mezcle con la fracción de PRP o rica en BMC para alcanzar una concentración diana de plaquetas o de BMC. En una realización, un usuario puede establecer la concentración diana a través de una interfaz de usuario 916 (véase la FIG. 12). Una segunda válvula/bomba 914 controlada por ordenador puede permitir que la parte alícuota pase del primer recipiente 910 al segundo recipiente 912 para formar el concentrado de PRP o de BMC. Se puede activar un mecanismo de agitación opcional (no ilustrado) para mejorar la mezcla del concentrado de PRP o de BMC dentro del segundo recipiente 912.

La fracción de PPP o fracción pobre en BMC restante y el concentrado de PRP o de BMC se pueden retirar de los recipientes 910, 912 por las respectivas aberturas 920 y 922, a las que se puede acceder a través de la aguja de una jeringa en una realización (véase la FIG. 13). Al mismo tiempo, los recipientes 910, 912 pueden ser separables y extraíbles de manera que cada uno se pueda mover a una ubicación del paciente o de almacenamiento para un uso posterior.

Aunque se haya descrito la FIG. 9, en la que el fluido se retira del centrifugador de disco 902 desde la mitad del centrifugador 902, en otras realizaciones, el fluido puede salir del centrifugador de disco desde otros puntos. Por ejemplo, el fluido puede salir de un radio exterior del centrifugador en algunas realizaciones. Además, el orden de retirada de las diferentes fracciones se puede variar. En algunas realizaciones, una impresora 924 puede proporcionar copias impresas de los datos desde el aparato 900.

Para garantizar la esterilidad, las partes del aparato 900 que entran en contacto con la sangre o la médula ósea pueden ser modulares y desechables. La FIG. 10 ilustra una realización de un paquete 1000 que comprende los componentes del aparato 900 que pueden ser desechables. Estos pueden incluir uno cualquiera o más de los siguientes componentes ilustrados: el centrifugador 902, la abertura del centrifugador 918, el módulo 906 analizador de la hematología, la primera válvula/bomba 908 controlada por ordenador, y el primer y el segundo recipiente 910, 912. Además, las partes desechables del aparato 900 pueden incluir una trayectoria de fluido 924 entre el centrifugador 902 y la válvula/bomba 908 controlada por ordenador, y una trayectoria de fluido 926 que conecta el primer y el segundo recipiente 910, 912. Dos cualquiera o más de estos componentes pueden estar interconectados para simplificar y facilitar la instalación, la remoción y el transporte, y el paquete interconectado 1000 se puede reemplazar por un paquete 1000 similar o idéntico.

La FIG. 11 ilustra cómo se puede usar una jeringa 928 para proporcionar una muestra de sangre entera o de médula ósea al aparato 900 de la FIG. 9 por la inserción a través de la abertura 918.

La FIG. 12 ilustra un usuario que interactúa con el aparato 900 de la FIG. 9, por ejemplo, a través de una realización de pantalla táctil de la interfaz de usuario 916.

La FIG. 13 ilustra cómo se puede usar una jeringa 930 para retirar el contenido del primer recipiente 910 ilustrado en las FIG. 9-13. Como se ha descrito, el primer recipiente 910 puede contener una fracción de PPP o una fracción pobre en BMC, y la jeringa se puede usar para extraer una parte o todo el contenido del primer recipiente 910.

Aunque las FIG. 9-13 hayan descrito el primer recipiente 910 como el que normalmente almacena la fracción de PPP o pobre en BMC, y el segundo recipiente 912 como el que almacena la fracción de PRP o rica en BMC, o el concentrado de PRP o de BMC, un experto en la materia reconocerá que los dos recipientes 910, 912 son intercambiables y, por tanto, no se limitan a una parte de la derecha o de la izquierda del aparato 900.

Los sistemas y métodos descritos en el presente documento se pueden implantar en una máquina tal como un sistema informático, además de los dispositivos físicos específicos descritos en el presente documento. La FIG. 14 muestra una representación esquemática de una realización de una máquina en la forma ilustrativa de un sistema informático 1400, en el que se puede ejecutar un conjunto de instrucciones para hacer que un dispositivo realice o ejecute uno o más de los aspectos y/o de las metodologías de la presente divulgación. Los componentes de la FIG. 14 solo son ejemplos, y no limitan el alcance del uso ni de la funcionalidad de ningún hardware, software, componente lógico embebido, o combinación de dos o más de dichos componentes que dan lugar a realizaciones particulares.

El sistema informático 1400 puede incluir un procesador 1401, una memoria 1403 y un almacenamiento 1408 que se comunican entre sí, y con otros componentes, a través de un bus 1440. El bus 1440 también puede conectar un visualizador 1432, uno o más dispositivos de entrada 1433 (que pueden incluir, por ejemplo, un teclado numérico, un teclado, un ratón, un lápiz óptico, etc.), uno o más dispositivos de salida 1434, uno o más dispositivos de almacenamiento 1435 y varios medios de almacenamiento tangibles 1436. Todos estos elementos pueden interconectarse directamente, o por medio de una o más interfaces o adaptadores al bus 1440. Por ejemplo, los diversos medios de almacenamiento tangibles 1436 pueden interconectarse con el bus 1440 a través de la interfaz 1426 del medio de almacenamiento. El sistema informático 1400 puede tener cualquier forma física adecuada, incluyendo, pero sin limitación, uno o más circuitos integrados (IC), placas de circuito impreso (PCB), dispositivos de mano móviles (como teléfonos móviles o PDA), ordenadores portátiles, sistemas informáticos distribuidos, redes informáticas o servidores.

El/los procesador/es 1401 (o unidad/es de procesamiento central (CPU/s)) contiene/n opcionalmente una unidad de memoria cache 1402 para el almacenamiento local temporal de instrucciones, datos o direcciones informáticas. El/los procesador/es 1401 están configurados para ayudar en la ejecución de las instrucciones legibles por ordenador. El sistema informático 1400 puede proporcionar funcionalidad como resultado del/de los procesador/es 1401 de ejecución del software incorporados en uno o más medios de almacenamiento tangibles legibles por ordenador, tales como la memoria 1403, el almacenamiento 1408, los dispositivos de almacenamiento 1435 y/o el medio de almacenamiento 1436. Los medios legibles por ordenador pueden almacenar el software que da lugar a

realizaciones particulares, y el/los procesador/es 1401 puede/n ejecutar el software. La memoria 1403 puede leer el software de uno o más otros medios legibles por ordenador (tal como el/los dispositivo/s de almacenamiento masivo 1435, 1436) o de una o más de otras fuentes a través de una interfaz adecuada, tal como la interfaz de red 1420. El software puede hacer que el/los procesador/es 1401 lleven a cabo uno o más procesos, o una o más etapas de uno o más procesos, descritos o ilustrados en el presente documento. La realización de dichos procesos o etapas puede incluir la definición de las estructuras de datos almacenados en la memoria 1403 y la modificación de las estructuras de datos dirigidas por el software.

La memoria 1403 puede incluir diversos componentes (por ejemplo, medios legibles por máquina) incluyendo, pero sin limitación, un componente de memoria de acceso aleatorio (por ejemplo, RAM 1404) (por ejemplo, una memoria RAM estática "SRAM", una memoria RAM dinámica "DRAM, etc.), un componente de solo lectura (por ejemplo, ROM 1405), y cualquier combinación de los mismos. La ROM 1405 puede actuar para comunicar datos e instrucciones de forma unidireccional al/a los procesador/es 1401, y la RAM 1404 puede actuar para comunicar datos e instrucciones de forma bidireccional con el/los procesador/es 1401. La ROM 1405 y la RAM 1404 pueden incluir cualquier medio legible por ordenador tangible adecuado descrito a continuación. En un ejemplo, un sistema básico de entrada/salida 1406 (BIOS), incluyendo las rutinas básicas que ayudan a transferir información entre los elementos dentro del sistema informático 1400, tal como durante el arranque, pueden estar almacenados en la memoria 1403.

El almacenamiento fijo 1408 está conectado de forma bidireccional al/a los procesador/es 1401, opcionalmente a través de la unidad 1407 de control del almacenamiento. El almacenamiento fijo 1408 ofrece una capacidad de almacenamiento de datos adicional, y también puede incluir cualquier medio legible por ordenador tangible adecuado descrito en el presente documento. El almacenamiento 1408 se puede usar para almacenar el sistema operativo 1409, EXEC 1410 (ejecutables), datos 1411, solicitudes API 1412 (programas de aplicación), y similares. A menudo, aunque no siempre, el almacenamiento 1408 es un medio de almacenamiento secundario (tal como un disco duro) que es más lento que el almacenamiento principal (por ejemplo, la memoria 1403). El almacenamiento 1408 también puede incluir una unidad óptica de disco, un dispositivo de memoria en estado sólido (por ejemplo, sistemas basados en FLASH), o una combinación de cualquiera de los anteriores. La información contenida en el almacenamiento 1408 puede, en los casos apropiados, incorporarse como memoria virtual en la memoria 1403.

En un ejemplo, el/los dispositivo/s de almacenamiento 1435 pueden estar interconectados de forma portátil con el sistema informático 1400 (por ejemplo, a través de un conector de puerto externo (no mostrado)) a través de una interfaz 1425 de dispositivo de almacenamiento. En particular, el/los dispositivo/s de almacenamiento 1435 y un medio legible por máquina asociado pueden proporcionar el almacenamiento no volátil y/o volátil de las instrucciones legibles por máquina, estructuras de datos, módulos de programa y/u otros datos para el sistema informático 1400. En un ejemplo, el software puede residir, total o parcialmente, dentro de un medio legible por máquina en el/los dispositivo/s de almacenamiento 1435. En otro ejemplo, el software puede residir, total o parcialmente, dentro del/de los procesador/es 1401.

El bus 1440 conecta una amplia variedad de subsistemas. En el presente documento, la referencia a un bus puede abarcar una o más líneas de señales digitales que cumplan una función común, en su caso. El bus 1440 puede ser cualquiera de varios tipos de estructuras de bus, incluyendo, pero sin limitación, un bus de memoria, un controlador de memoria, un bus periférico, un bus local, y cualquier combinación de los mismos, que use cualquiera de una variedad de arquitecturas de bus. A modo de ejemplo y no a modo de limitación, dichas arquitecturas incluyen un bus de arquitectura normalizada industrial (ISA), un bus de ISA mejorada (EISA), un bus de arquitectura de microcanales (MCA), un bus local de asociación de normas vídeo-electrónicas (VLB), un bus de interconexión de componentes periféricos (PCI), un bus PCI-exprés (PCI-X), un bus de puerto de gráficos acelerados (AGP), un bus de hiper-transporte (HTX), un bus de tecnología avanzada adjunta en serie (SATA), y cualquier combinación de los mismos.

El sistema informático 1400 también puede incluir un dispositivo de entrada 1433. En un ejemplo, un usuario del sistema informático 1400 puede introducir órdenes y/u otra información en el sistema informático 1400 a través del/de los dispositivo/s de entrada 1433. Los ejemplos del/de los dispositivo/s de entrada 1433 incluyen, pero sin limitación, un dispositivo de entrada alfa-numérico (por ejemplo, un teclado), un dispositivo señalador (por ejemplo, un ratón o una almohadilla táctil), un panel táctil, una palanca de mando, un mando de juegos, un dispositivo de entrada de audio (por ejemplo, un micrófono, un sistema de respuesta de voz, etc.), un escáner óptico, un dispositivo de captura de imágenes paradas o de vídeo (por ejemplo, una cámara), y cualquiera de sus combinaciones. El/los dispositivo/s 1433 pueden estar interconectados al bus 1440 a través de cualquiera de una variedad de interfaces de entrada 1423 (por ejemplo, la interfaz de entrada 1423), incluyendo, pero sin limitación, serie, paralelo, puerto de juegos, USB, FIREWIRE, THUNDERBOLT, o cualquier combinación de los anteriores.

En realizaciones particulares, cuando el sistema informático 1400 está conectado a la red 1430, el sistema informático 1400 puede comunicarse con otros dispositivos, específicamente, con dispositivos móviles y sistemas de empresa, conectados en red 1430. Las comunicaciones desde y hacia el sistema informático 1400 se pueden enviar a través de la interfaz de red 1420. Por ejemplo, la interfaz de red 1420 puede recibir comunicaciones entrantes (tales como peticiones o respuestas de otros dispositivos) en forma de uno o más paquetes (tales como paquetes de



- 5 Protocolo de Internet (IP)) de la red 1430, y el sistema informático 1400 puede almacenar las comunicaciones entrantes en la memoria 1403 para su procesamiento. De manera similar, el sistema informático 1400 puede almacenar las comunicaciones salientes (tales como peticiones o respuestas a otros dispositivos) en forma de uno o más paquetes en la memoria 1403 y comunicarlas a la red 1430 desde la interfaz de red 1420. El/los procesador/es 1401 puede/n acceder a estos paquetes de comunicación almacenados en la memoria 1403 para su procesamiento.
- 10 Los ejemplos de la interfaz de red 1420 incluyen, pero sin limitación, una tarjeta de interfaz de red, un módem y cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de una red 1430 o segmento de la red 1430 incluyen, pero sin limitación, una red de área amplia (WAN) (por ejemplo, la Internet, una red de empresa), una red de área local (LAN) (por ejemplo, una red asociada con una oficina, un edificio, un campus u otro espacio geográfico relativamente pequeño), una red telefónica, una conexión directa entre dos dispositivos de computación, y cualquier combinación de los mismos. Una red, tal como la red 1430, puede emplear un modo por cable y/o inalámbrico de comunicación. En general, se puede usar cualquier topología de red.
- 15 La información y los datos se pueden visualizar a través de un visualizador 1432. Los ejemplos de visualizador 1432 incluyen, pero sin limitación, una pantalla de cristal líquido (LCD), una pantalla de cristal líquido orgánico (OLED), un tubo de rayos catódicos (CRT), una pantalla de plasma, y cualquier combinación de los mismos. El visualizador 1432 puede interactuar con el/los procesador/es 1401, la memoria 1403 y el almacenamiento fijo 1408, así como con otros dispositivos tales como el/los dispositivo/s de entrada 1433, a través del bus 1440. El visualizador 1432 está conectado al bus 1440 a través de una interfaz de vídeo 1422, y el transporte de datos entre el visualizador 1432 y el bus 1440 se puede controlar a través de los gráficos de control 1421.
- 20 Además de un visualizador 1432, el sistema informático 1400 puede incluir uno o más otros dispositivos de salida periféricos 1434 que incluyen, pero sin limitación, un altavoz de audio, una impresora, y cualquier combinación de los mismos. Dichos dispositivos de salida periféricos pueden estar conectados al bus 1440 a través de una interfaz de salida 1424. Los ejemplos de una interfaz de salida 1424 incluyen, pero sin limitación, un puerto en serie, una conexión en paralelo, un puerto USB, un puerto FIREWIRE, un puerto THUNDERBOLT, y cualquier combinación de los mismos.
- 25 Además, o como alternativa, el sistema informático 1400 puede proporcionar funcionalidad como resultado del proceso lógico cableado o incorporado de otro modo en un circuito, que puede funcionar en lugar de o junto con el software para ejecutar uno o más procesos, o una o más etapas de uno o más procesos, descritos o ilustrados en el presente documento. La referencia al software en la presente divulgación puede abarcar el proceso lógico, y la referencia al proceso lógico puede abarcar el software. Además, la referencia a un medio legible por ordenador puede comprender un circuito (tal como un IC) de almacenamiento del software para la ejecución, un proceso lógico realizado en circuito para la ejecución, o ambos, según proceda. La presente divulgación engloba cualquier combinación adecuada de hardware, software, o ambos.
- 30 Los expertos en la materia entenderán que la información y las señales pueden representarse usando cualquiera de una variedad de diferentes tecnologías y técnicas. Por ejemplo, los datos, las instrucciones, los comandos, la información, las señales, los bits, los símbolos y los chips a los que se puede hacer referencia a lo largo de la descripción anterior pueden representarse por voltajes, corrientes, ondas electromagnéticas, partículas o campos magnéticos, partículas o campos ópticos, o cualquier combinación de los mismos.
- 35 Los expertos apreciarán además que los diversos bloques lógicos, módulos, circuitos y etapas algorítmicas ilustrativos descritos en relación con las realizaciones desveladas en el presente documento pueden implantarse como hardware electrónico, software informático, o combinaciones de ambos. Para ilustrar claramente esta intercambiabilidad del hardware y del software, se han descrito anteriormente diversos componentes ilustrativos, bloques, módulos, circuitos y etapas, en general, en términos de su funcionalidad. El hecho de que dicha funcionalidad se implante como hardware o como software depende de las limitaciones de la aplicación y del diseño en particular impuestas sobre el sistema global. Los expertos pueden implantar la funcionalidad descrita de diversas maneras para cada aplicación en particular, pero dichas decisiones de implantación no deberían interpretarse como causantes de un alejamiento del alcance de la presente invención.
- 40 Los diversos bloques lógicos, módulos y circuitos ilustrativos descritos en relación con las realizaciones desveladas en el presente documento pueden implantarse o realizarse con un procesador de propósito general, un procesador de señales digitales (DSP), un circuito integrado específico de aplicación (ASIC), una matriz de puertas programable por campo (FPGA) u otro dispositivo lógico programable, proceso lógico transistor o de puertas diferenciadas, componentes de hardware diferenciados, o cualquier combinación de los mismos diseñada para realizar las funciones descritas en el presente documento. Un procesador de propósito general puede ser un microprocesador, pero como alternativa, el procesador puede ser cualquier procesador, controlador, microcontrolador o máquina de estado convencional. Un procesador también puede implantarse como una combinación de dispositivos informáticos, por ejemplo, una combinación de un DSP y un microprocesador, una pluralidad de microprocesadores, uno o más microprocesadores junto con un núcleo DSP, o cualquier otra de dichas configuraciones.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

5 Las etapas de un método o algoritmo descrito en relación con las realizaciones desveladas en el presente documento se pueden realizar directamente en el hardware, en un módulo de software ejecutado por un procesador, o en una combinación de ambos. Un módulo de software puede residir en la memoria RAM, la memoria flash, la memoria ROM, la memoria EPROM, la memoria EEPROM, registros, disco duro, un disco extraíble, un CD-ROM, o cualquier otra forma de medio de almacenamiento conocida en la técnica. Un medio de almacenamiento ilustrativo se acopla al procesador de manera que el procesador pueda leer la información de, y escribir información en, el medio de almacenamiento. Como alternativa, el medio de almacenamiento puede estar integrado en el procesador. El procesador y el medio de almacenamiento pueden residir en un ASIC. El ASIC puede residir en un terminal de usuario. Como alternativa, el procesador y el medio de almacenamiento pueden residir como componentes diferenciados en un terminal de usuario.

10 En conclusión, la presente invención proporciona, entre otras cosas, sistemas y métodos que producen, de forma autónoma o semi-autónoma, un concentrado de PRP o de BMC que tiene una concentración diana de plaquetas o de BMC. Los expertos en la materia pueden reconocer fácilmente que es posible realizar numerosas variaciones y sustituciones en la invención, en su uso y su configuración para lograr sustancialmente los mismos resultados que se han obtenido mediante las realizaciones descritas en el presente documento. Por ejemplo, los productos sanguíneos se pueden mover por el sistema 100 y 800, o a otros sistemas, de forma bien manual o autónoma. Como otro ejemplo, se pueden usar métodos de separación de componentes sanguíneos, además de la centrifugación, (por ejemplo, la separación de canales de microfluidos o la separación de impedancia eléctrica). Por consiguiente, no se pretende limitar la invención a las formas ilustrativas desveladas. Muchas variaciones, modificaciones y construcciones alternativas están dentro del alcance y del espíritu de la invención desvelada.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de generación de un concentrado de plasma rico en plaquetas o un concentrado de plasma rico en células de la médula ósea que comprende:

- 5 separar una muestra de sangre entera o una muestra de médula ósea en una fracción de glóbulos rojos, un plasma pobre en plaquetas o un plasma pobre en células de la médula ósea, y un plasma rico en plaquetas o un plasma rico en células de la médula ósea;
- 10 determinar una concentración de plaquetas o una concentración de células de la médula ósea antes, durante o después de la separación a través de al menos una primera medición;
- 15 determinar un primer volumen de fluido en el que se realizó la primera determinación para estudiar o definir una relación de dosis-respuesta en un paciente y determinar la concentración si la concentración de plaquetas o la concentración de células de la médula ósea tiene una concentración de células diana en un intervalo de concentraciones diana, estando el intervalo de
- 20 concentraciones diana entre  $0,8-2,0 \times 10^6$  células diana/ $\mu$ l;
- usar la concentración y el primer volumen para determinar un segundo volumen de plasma pobre en plaquetas o plasma pobre en células de la médula ósea que, cuando se mezcla con el plasma rico en plaquetas o el plasma rico en células de la médula ósea, proporcionará una concentración de plaquetas o células de la médula ósea que estará dentro de un intervalo de concentraciones diana; y
- 25 crear un concentrado de plasma rico en plaquetas o concentrado de plasma rico en células de la médula ósea, mezclando el segundo volumen de plasma pobre en plaquetas o de plasma pobre en células de la médula ósea con el plasma rico en plaquetas o plasma rico en células de la médula ósea.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la separación incluye:

- 25 separar los glóbulos rojos de la muestra de sangre entera para formar una fracción de plasma; y separar la fracción de plasma en una fracción pobre en plaquetas y una fracción rica en plaquetas.

3. El método de la reivindicación 2, en el que la separación incluye:

- 30 la centrifugación de la muestra de sangre entera para formar la fracción de plasma hacia un radio interior de un centrifugador y una fracción de glóbulos rojos hacia un radio exterior del centrifugador;
- retirar la fracción de glóbulos rojos;
- 35 centrifugar la fracción de plasma para formar una fracción de plasma pobre en plaquetas hacia el radio interior del centrifugador y una fracción de plasma rica en plaquetas hacia el radio exterior del centrifugador.

4. El método de la reivindicación 3, en el que la medición se realiza en la muestra de sangre entera o la muestra de médula ósea o la fracción de plasma tras la primera centrifugación, y en la fracción de plasma rica en plaquetas o la fracción de plasma rica en células de la médula ósea tras la segunda centrifugación.

5. Un sistema de concentración de células que comprende:

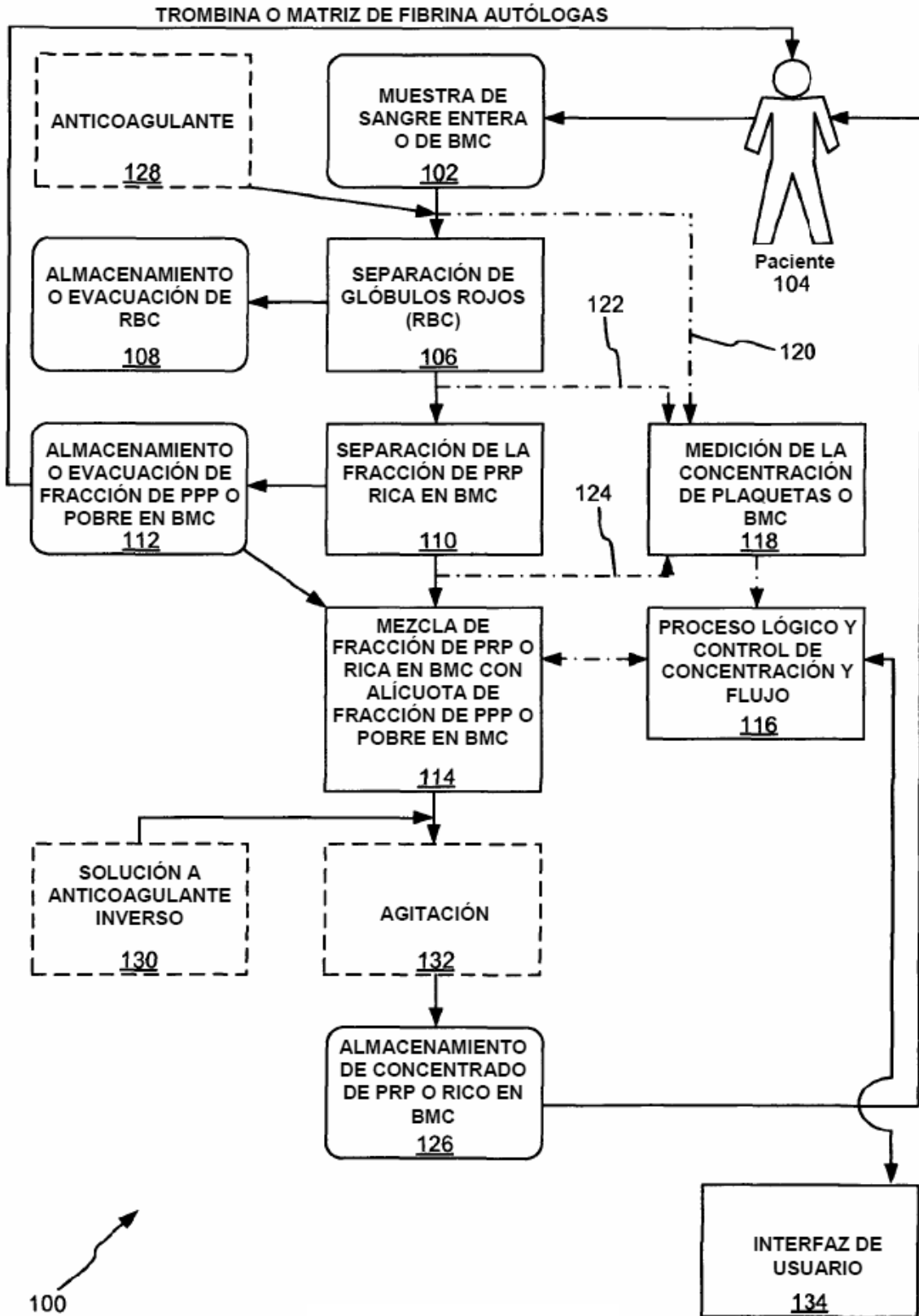
- 45 un componente de separación de sangre que tiene una entrada de muestras sanguíneas y que está configurado para separar la muestra sanguínea en una fracción de glóbulos rojos y una fracción de plasma, donde la fracción de plasma comprende una fracción rica en células diana y una fracción pobre en células diana;
- 50 un sistema de medición que mide un número total de células diana del sistema de concentración de células; proceso lógico de concentración y proceso lógico de flujo que determina un primer volumen de la fracción pobre en células diana para mezclarla con la fracción rica en células diana con el fin de formar un concentrado rico en células diana que tenga una concentración de células diana que se encuentre en un intervalo de concentraciones diana para estudiar o definir una relación de dosis-respuesta en un paciente, y proceso lógico de decisiones que determina si el concentrado rico en células diana tiene una concentración de células diana dentro del intervalo de concentraciones diana; y
- 55 un componente de mezcla configurado para formar el concentrado rico en células diana mezclando el primer volumen de la fracción pobre en células diana con la fracción rica en células diana, siendo el intervalo de concentraciones diana de  $0,8$  a  $2,0 \times 10^6$  células diana/ $\mu$ l.

6. El sistema de concentración de células de la reivindicación 5, en el que el sistema de medición comprende:

- 60 un componente de medición de la concentración que mide una concentración de células diana del sistema de concentración de células; y
- un componente medidor del flujo que mide un segundo volumen en el que se midió la concentración.

7. El sistema de concentración de células de la reivindicación 6, en el que el componente de medición de la concentración está adaptado para medir una concentración de células diana en la fracción rica en células diana, y el segundo volumen es el de la fracción rica en células diana.

8. El sistema de concentración de células de la reivindicación 6, en el que el componente de medición de la concentración está adaptado para realizar una función seleccionada del grupo que consiste en: microscopía óptica, dispersión de luz óptica e impedancia eléctrica.
- 5 9. El sistema de concentración de células de la reivindicación 5, en el que el componente de separación de sangre está adaptado para realizar una función seleccionada del grupo que consiste en:
- centrifugación, impedancia láser, citometría de flujo, dielectroforesis, separación de canales de microfluidos, impedancia eléctrica y uso de marcadores fluorescentes.
- 10 10. El sistema de concentración de células de la reivindicación 5, en el que las células diana se seleccionan del grupo que consiste en: células pluripotentes, glóbulos blancos, glóbulos rojos, plaquetas, neutrófilos, monocitos, linfocitos, eosinófilos y basófilos.



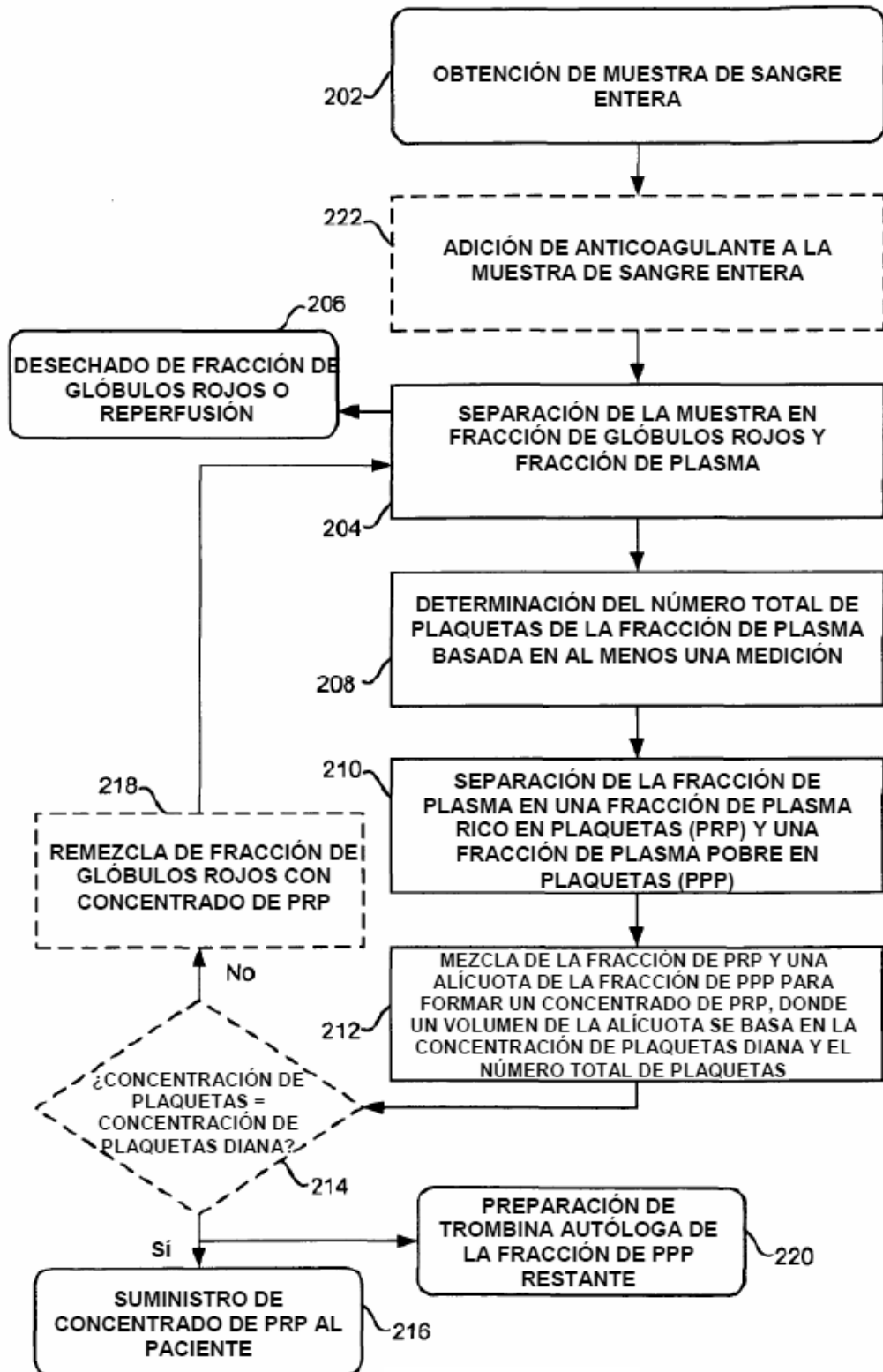


FIGURA 2

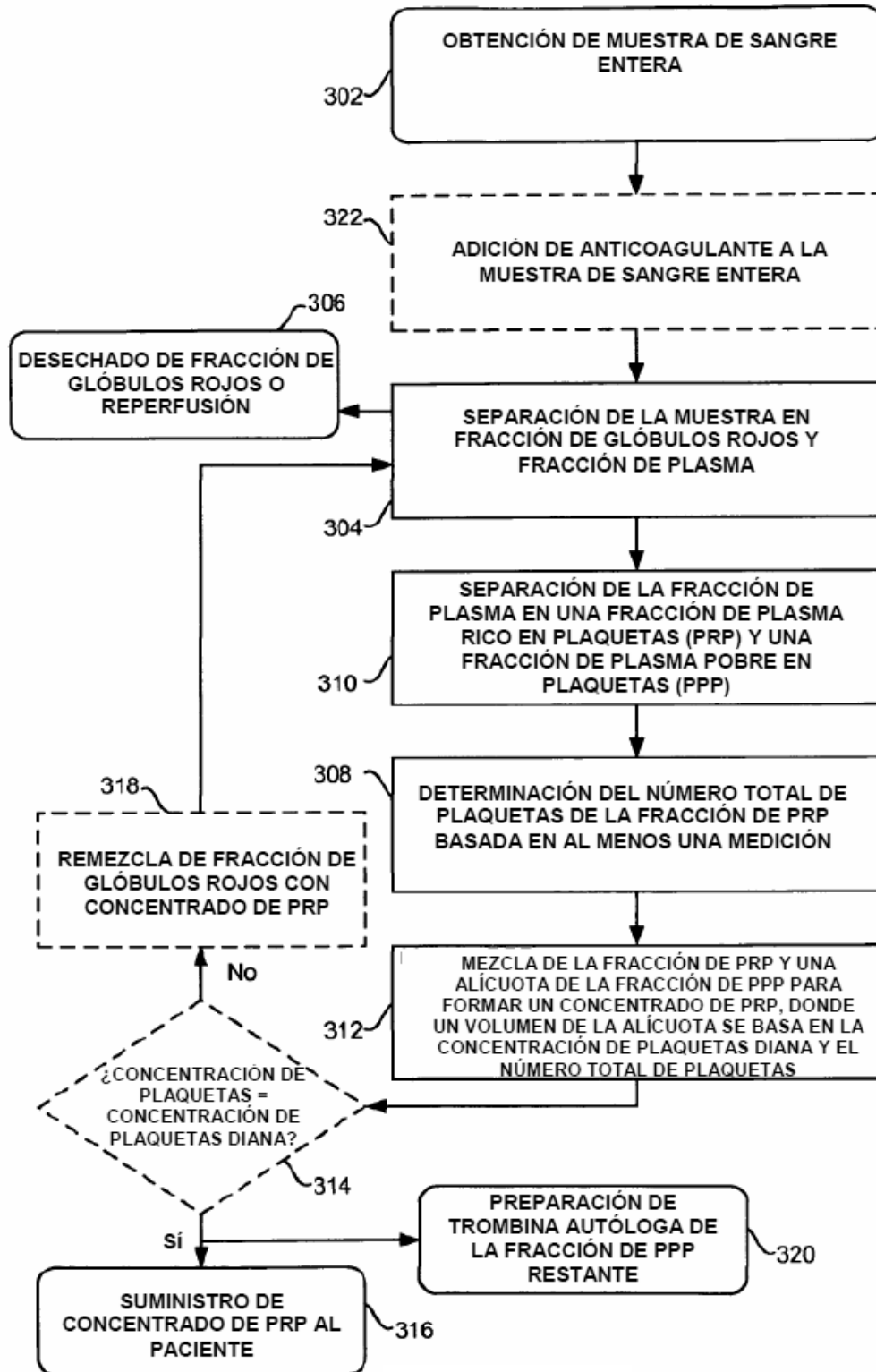


FIGURA 3

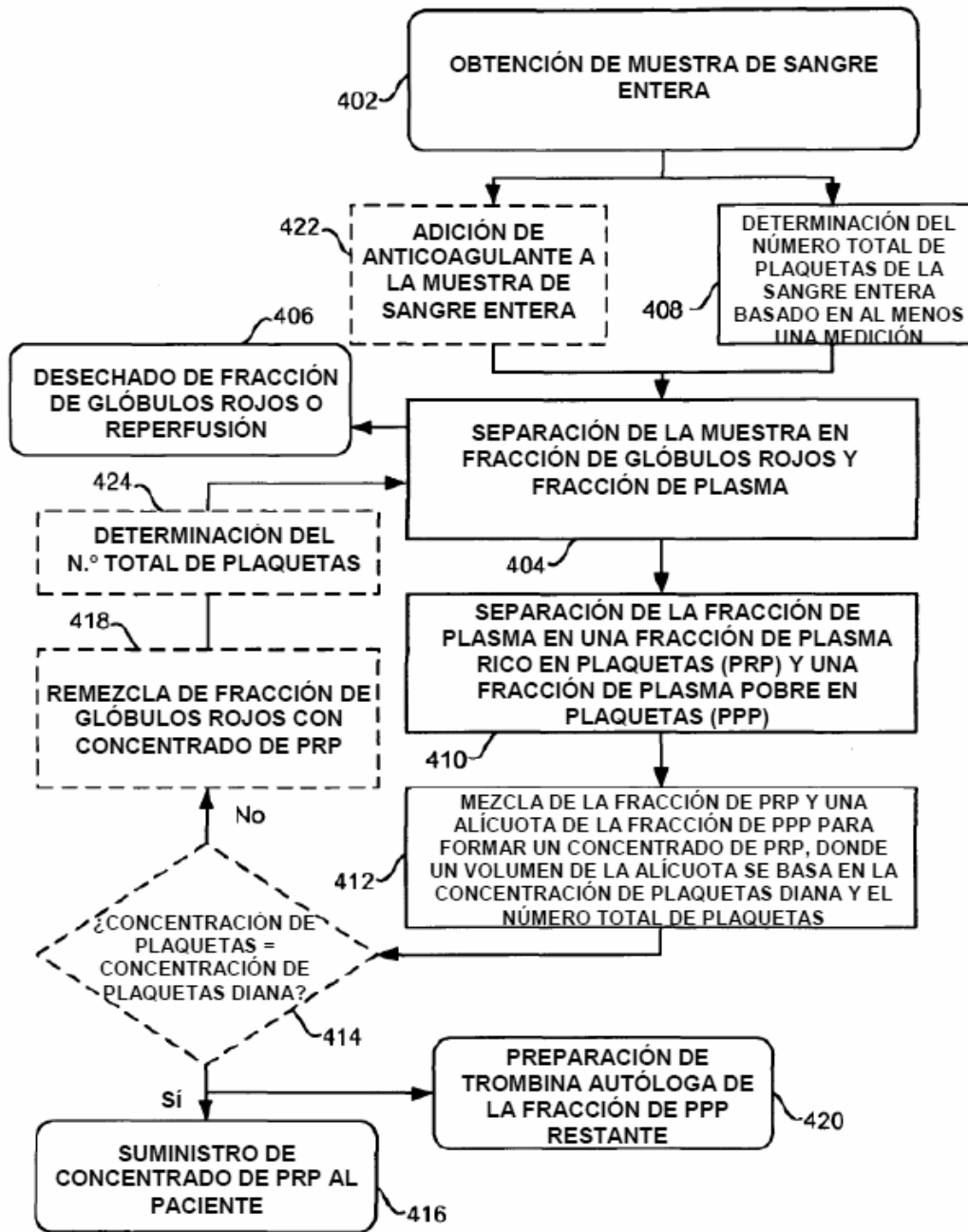


FIGURA 4



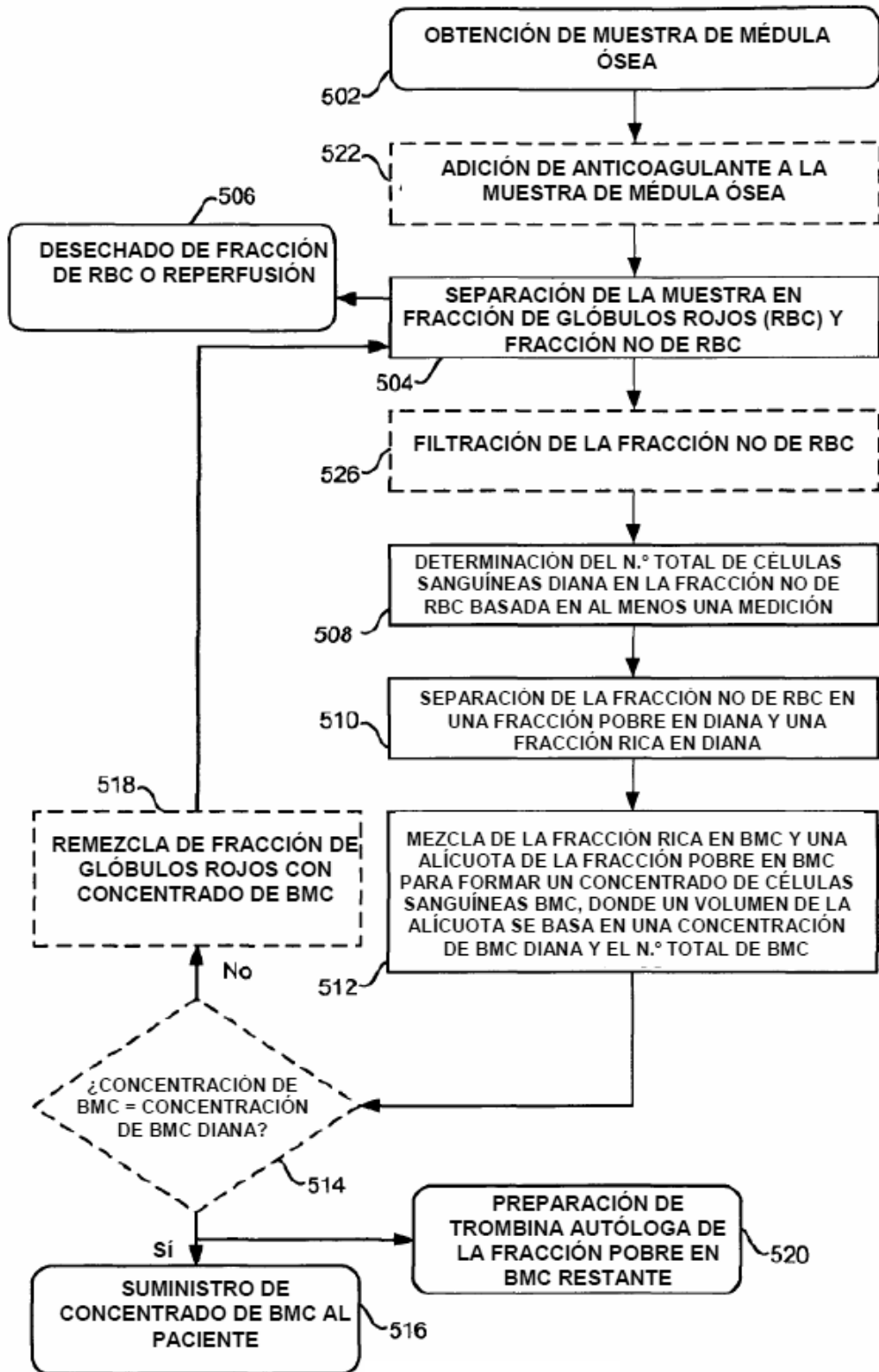


FIGURA 5

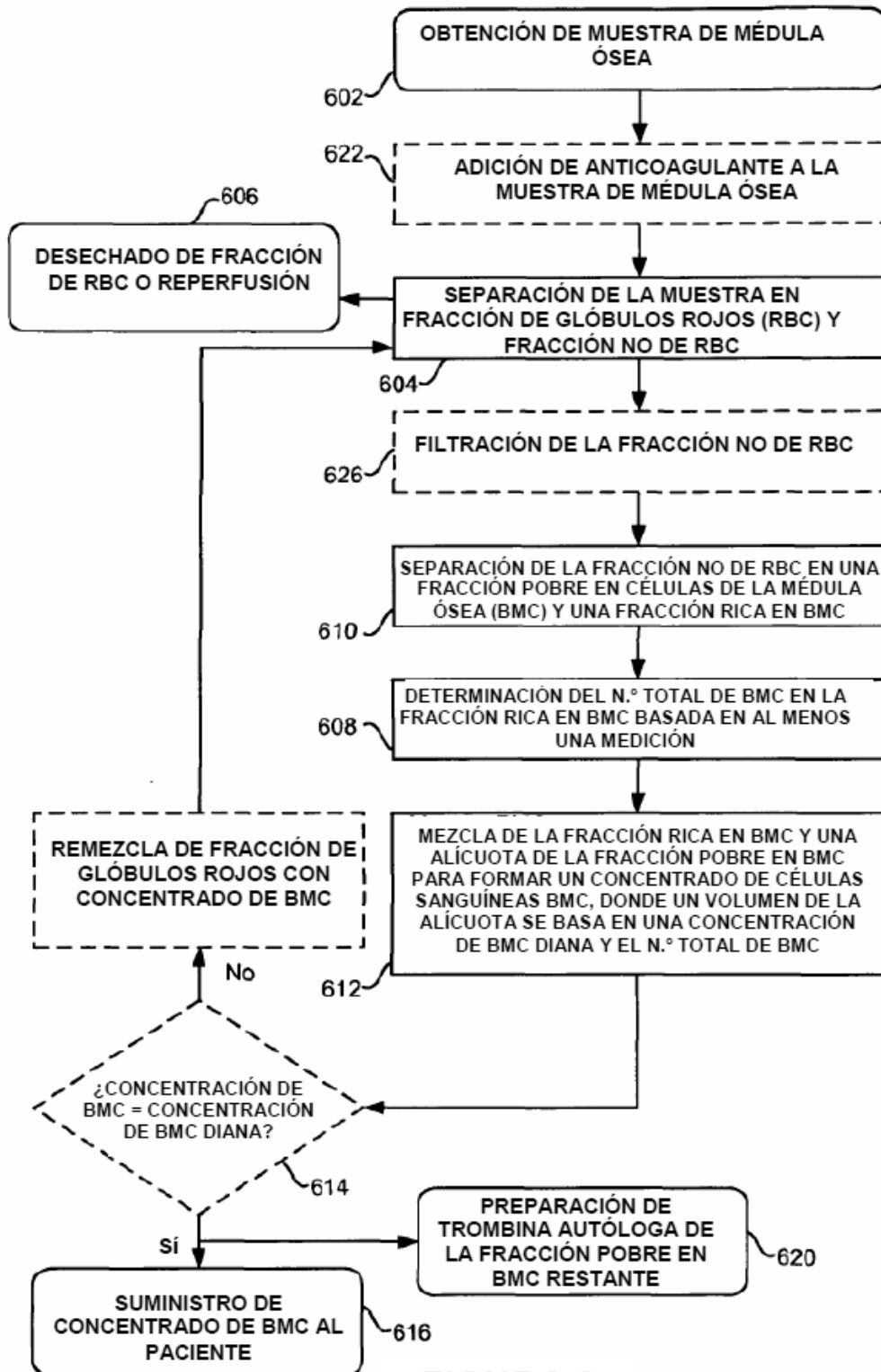


FIGURA 6

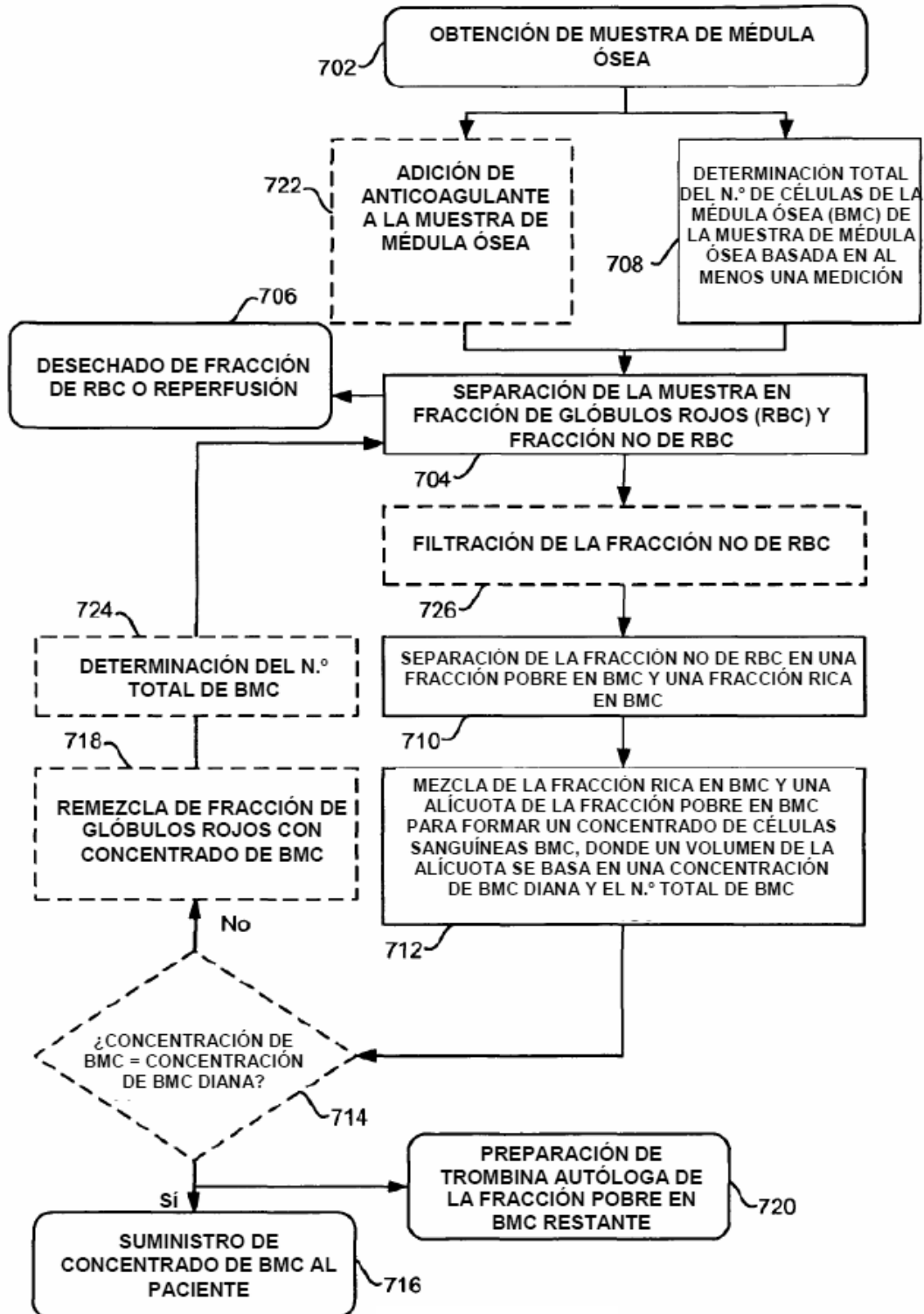


FIGURA 7

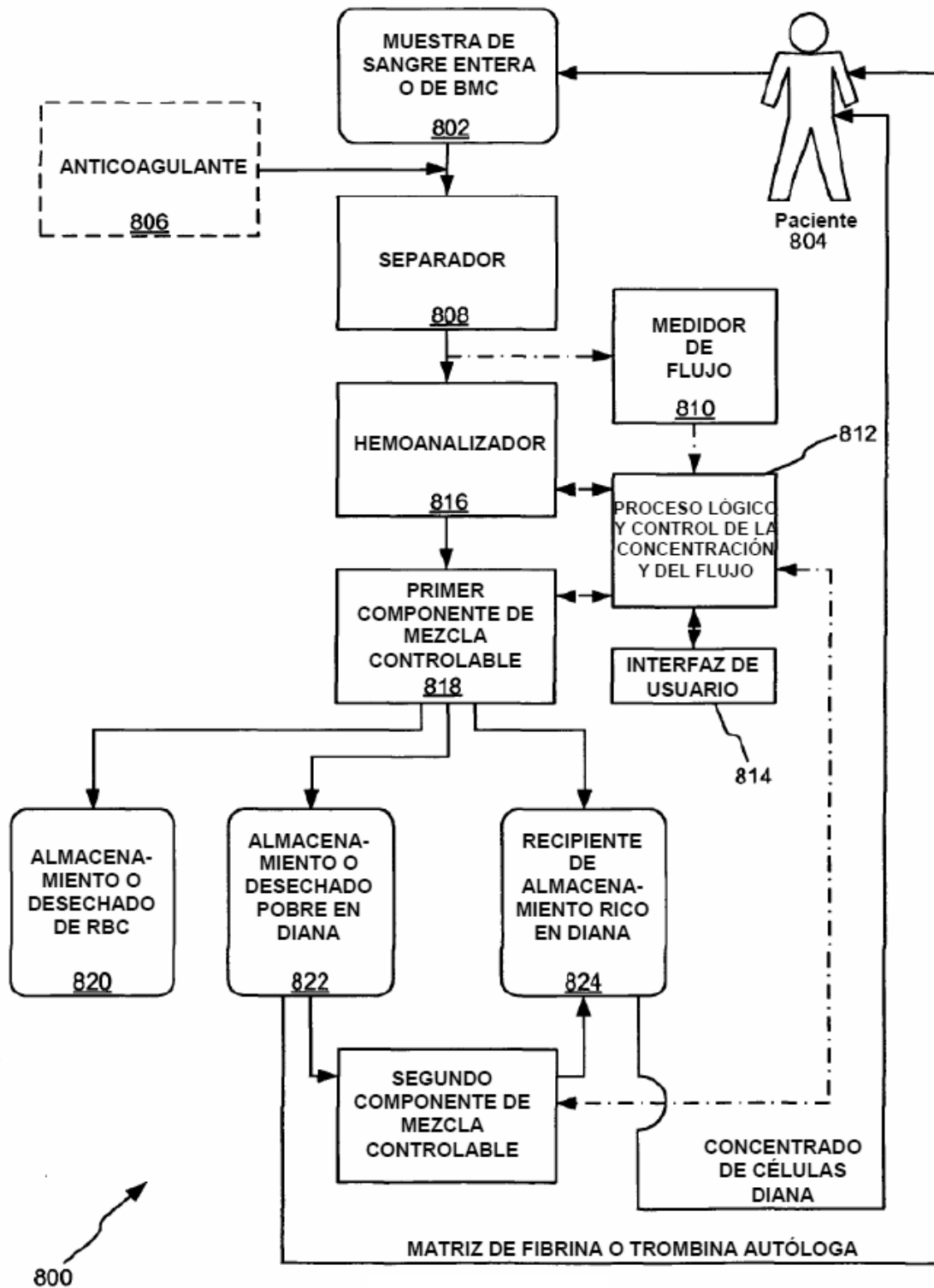


FIGURA 8

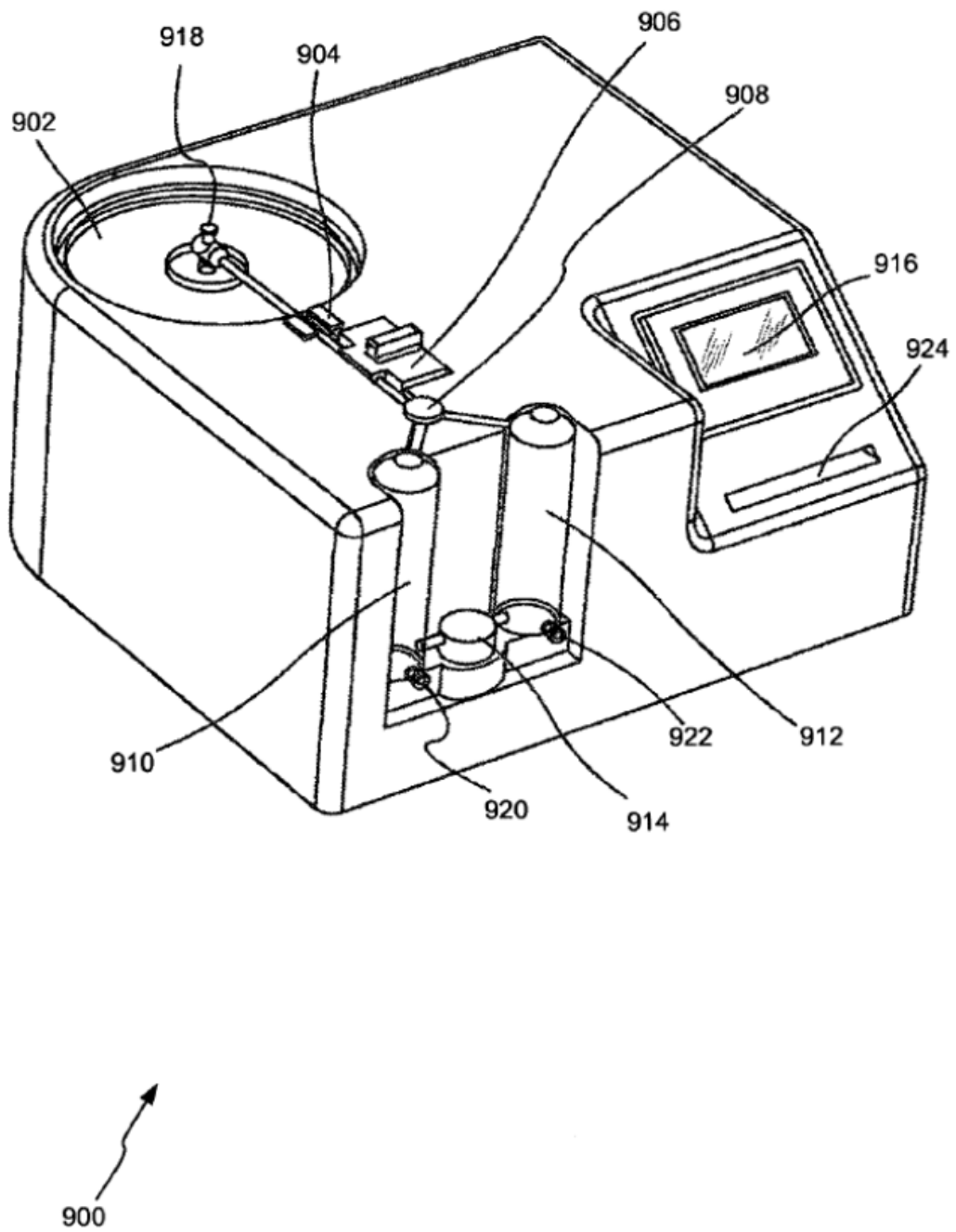


FIGURA 9

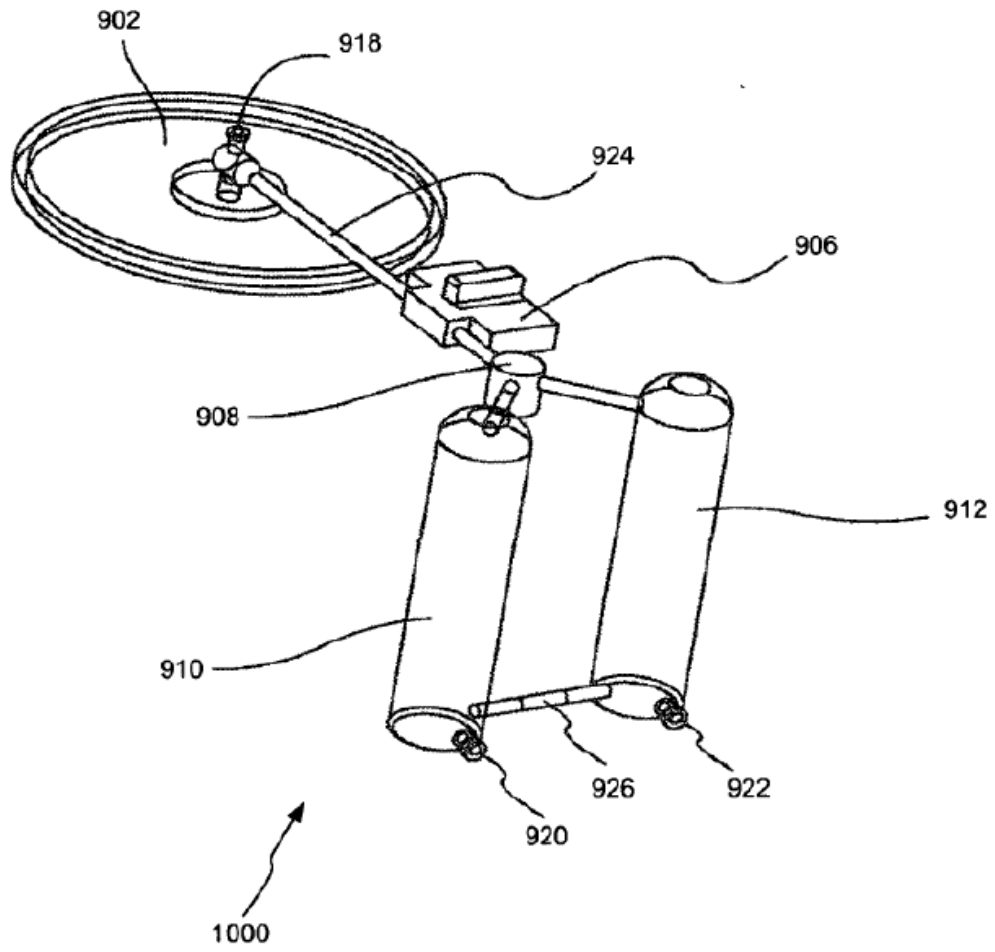


FIGURA 10

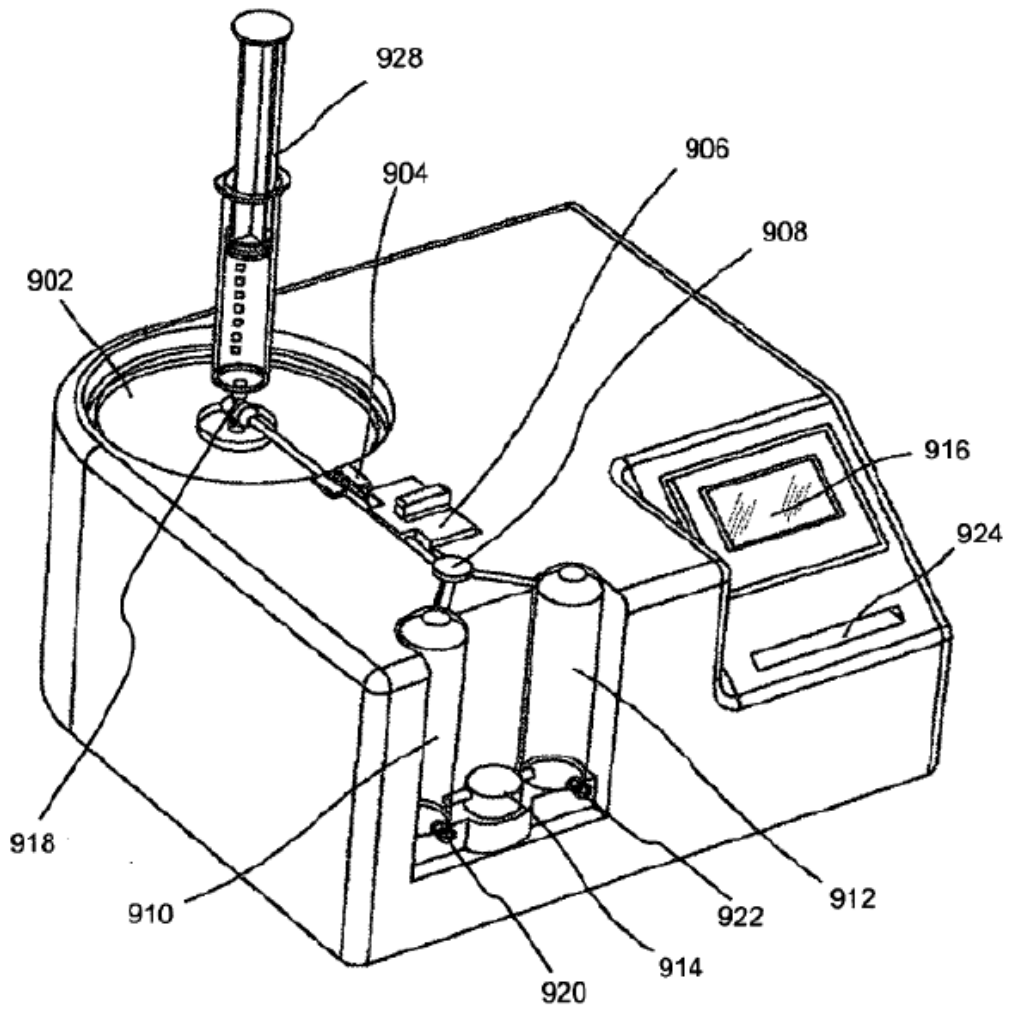


FIGURA 11

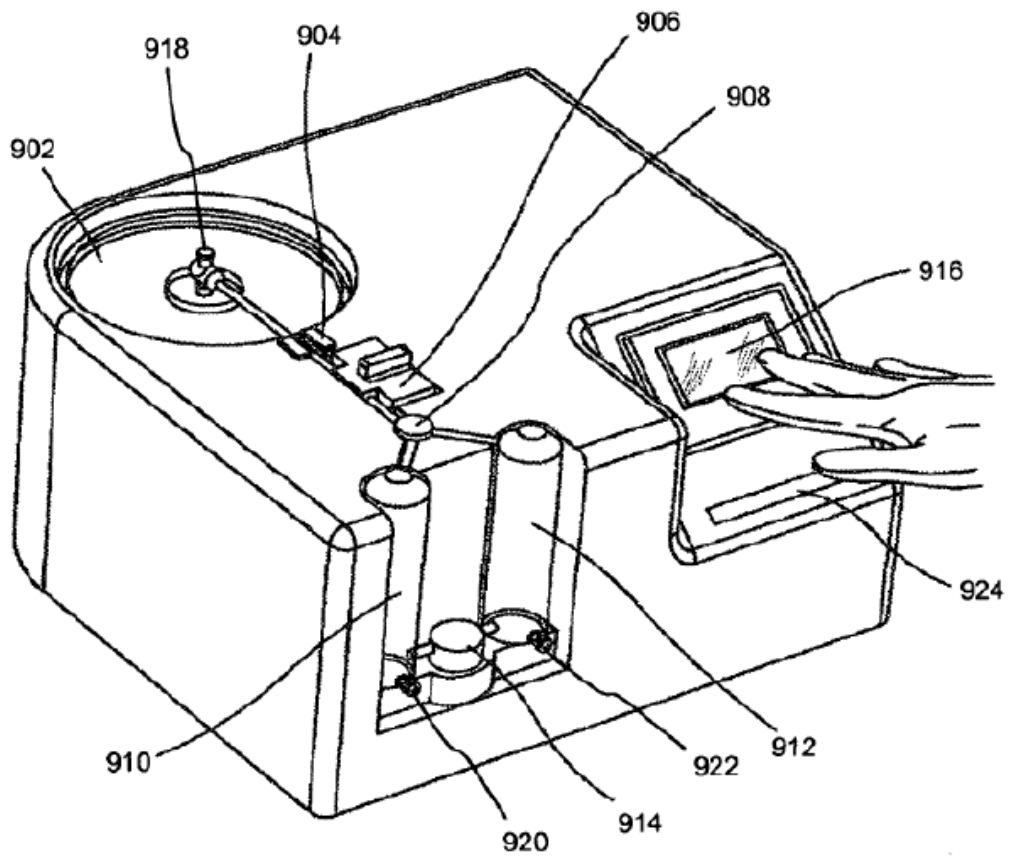


FIGURA 12



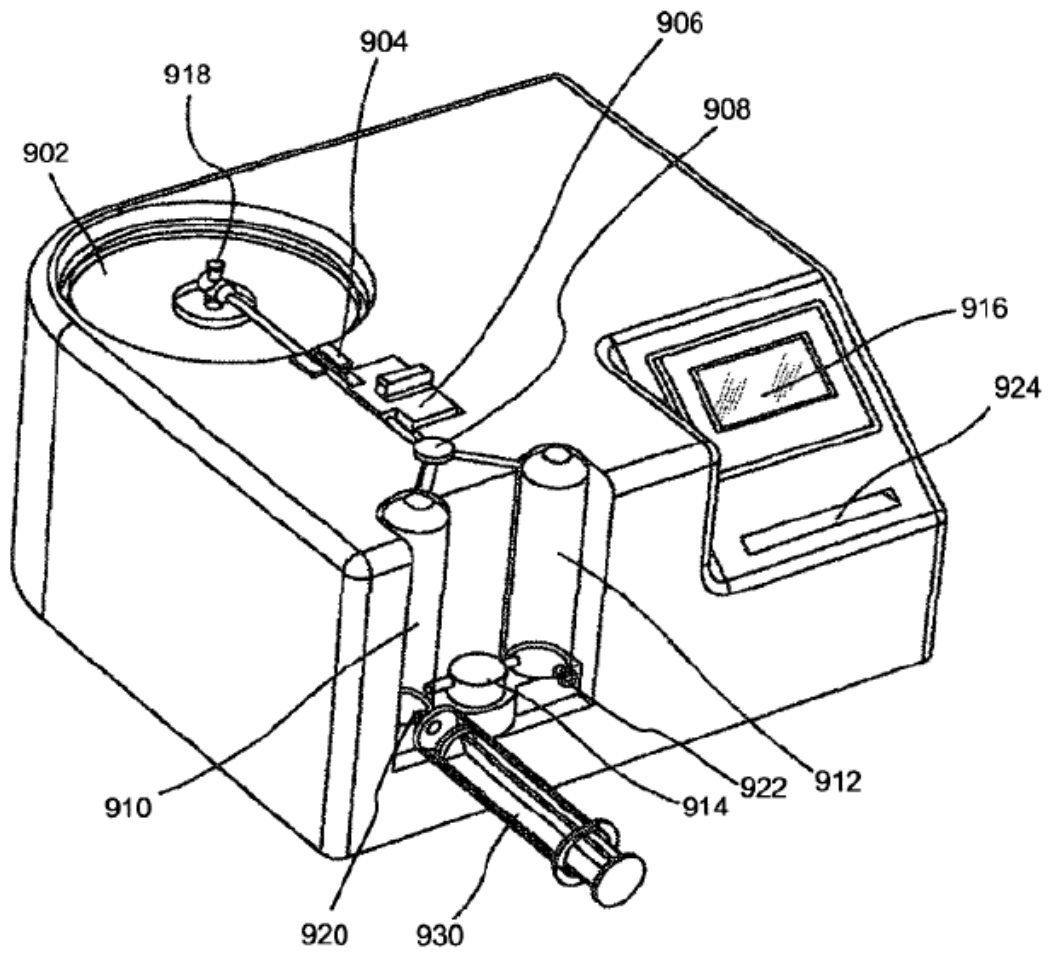


FIGURA 13

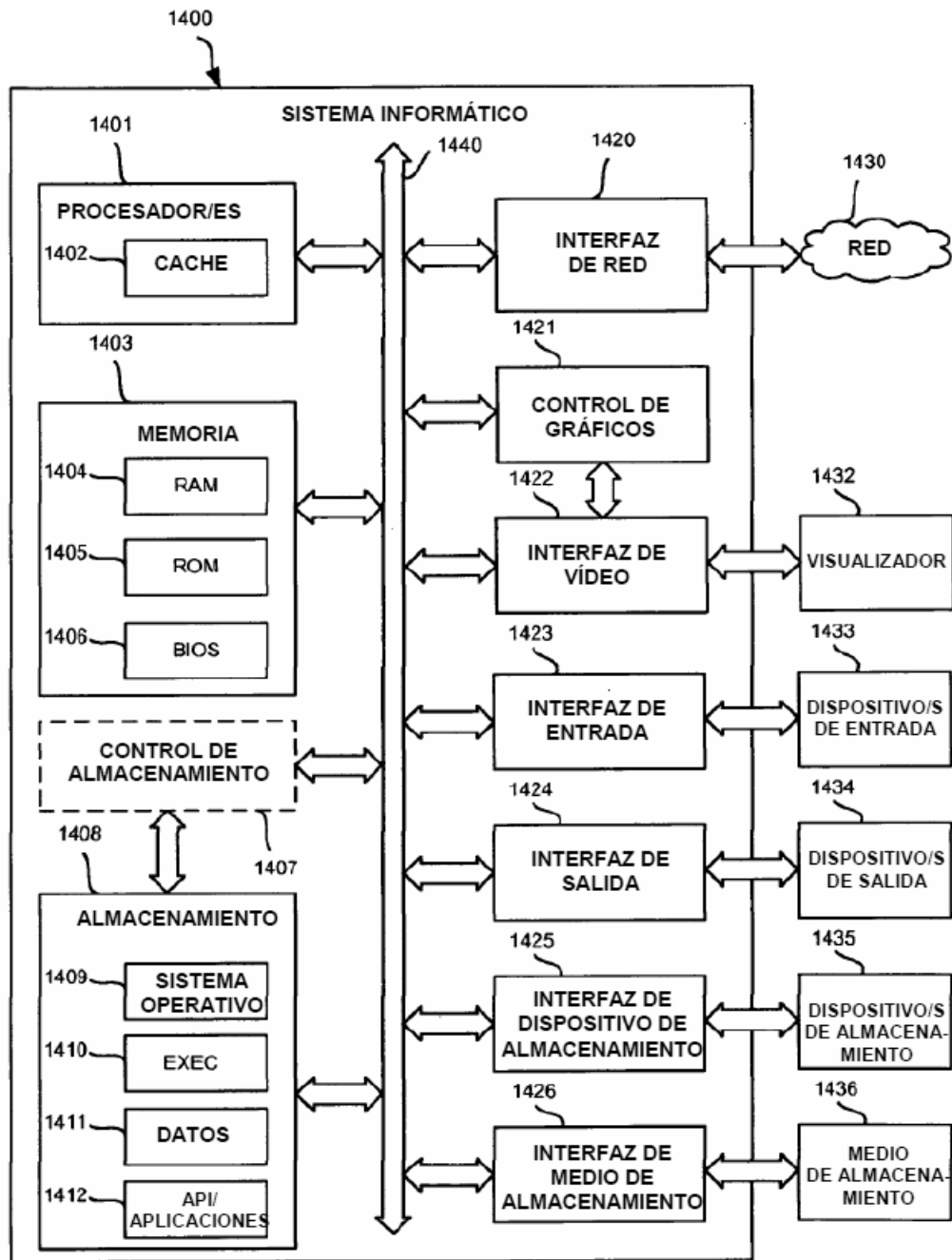


FIGURA 14