

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 793**

51 Int. Cl.:

A61M 1/36 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

B01D 21/26 (2006.01)

B01L 3/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.08.2007 PCT/EP2007/058695**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2008 WO08023026**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2007 E 07802770 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2073862**

54 Título: **Método para la preparación de plasma rico en plaquetas para usos no procesados y su combinación con las células de piel y hueso**

30 Prioridad:

21.08.2006 WO PCT/EP2006/065493

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

10.02.2017

73 Titular/es:

TURZI, ANTOINE (100.0%)
Rue de l'Eglise 5
1146 Mollens, CH

72 Inventor/es:

TURZI, ANTOINE y
DU TOIT, DONALD FRANÇOIS

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 600 793 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la preparación de plasma rico en plaquetas para usos no procesados y su combinación con las células de piel y hueso

5

Área del invento

10 **[0001]** Este invento se refiere al campo de la regeneración de tejidos, especialmente de la regeneración de la piel, de cartílagos, de músculos, de tendones, de tejido adiposo, de córneas, de nervios periféricos, de la columna y de los huesos. Se refiere más específicamente a nuevas preparaciones celulares en forma de una matriz biológica, un método para su preparación, un método para su uso, un dispositivo para su preparación y preparaciones que contienen a dicha preparación celular para su uso extemporáneo.

Antecedentes del invento

15

20 **[0002]** Se ha documentado bien la importancia de los materiales biológicos autónomos en el proceso de sanación. Más importantemente, se demostró la implicación directa de 2 materiales biológicos autólogos con la formación de la estructura de coágulos de sangre, lo cual suministra una barrera hemostática cuyo rol es garantizar la hemostasis y sellar a la herida: (1) la fibrina, que se deriva de la separación del fibrinógeno clásico en 2 hebras a través de la acción de la trombina, y (2) las membranas activadas de plaquetas. El proceso de formación de la herida generalmente se presenta como la sucesión de una fase de coagulación, un proceso inflamatorio y un proceso regenerativo.

25

30 **[0003]** La fase de coagulación (coagulación de la sangre o formación de coágulos) es un proceso complejo, por el cual una pared dañada de vasos sanguíneos se cubre por un coágulo de fibrina para detener la hemorragia y reparar los vasos dañados, que se inicia por la liberación en grandes cantidades de citoquinas y de factores de crecimiento provenientes de gránulos alfa de plaquetas. La formación de coágulos sanguíneos (formados en condiciones fisiológicas por la fibrina, por las plaquetas y por los glóbulos rojos, entre otros componentes sanguíneos) es un fenómeno natural bien conocido que resulta de traumas de los tejidos y su rol en el proceso de sanación de heridas, así como en la unión de fracturas óseas.

35

40 **[0004]** El proceso de inflamación, que sigue a la formación de un coágulo sanguíneo, se estimula mediante numerosos mediadores vasoactivos y factores quimiotácticos (señales específicas en la forma de proteínas) liberados por los glóbulos blancos y plaquetas. Estas señales atraen a macrófagos que "limpian" el lugar de cualquier bacteria o partícula extraña tal como lo hacen los glóbulos rojos antes de la migración de las células nuevas.

40

45 **[0005]** La fase regenerativa del tejido involucra a la quimioatracción y a la mitosis de células no diferenciadas en la matriz (o matriz de crecimiento) formada por el coágulo sanguíneo. Las nuevas células, que se multiplican bajo la estimulación de los factores de crecimiento de plaquetas, reemplazarán a las células dañadas o destruidas las cuales son digeridas por los macrófagos.

45

50 **[0006]** Los factores de crecimiento y las numerosas proteínas del plasma, también llamadas moléculas señalizadoras, que promueven la migración celular y división dentro de los coágulos sanguíneos, juegan un rol crucial en el proceso de sanación de heridas.

50

55 **[0007]** En teoría, es posible amplificar los efectos de estas primeras fases en el proceso de sanación de heridas al descartar a los glóbulos rojos e incrementar la concentración de factores de crecimiento.

55

60 **[0008]** La amplificación de la coagulación sanguínea puede definirse como la formación de un "coágulo enriquecido (EC – enriched clot)". Los coágulos enriquecidos pueden obtenerse a través del uso de concentraciones de plaquetas y se han descrito en Platelets and Megacaryocytes (Plaquetas y Megacariocitos) 2004, vol 1 y 2, como "Structure and signals" ("Estructura y Señales"), Ed. Gibbins y Mahaut-Smith, Humana Press, Nueva Jersey.

60

65 **[0009]** El plasma rico en plaquetas (PRP) puede definirse como una concentración autóloga de plaquetas en un volumen pequeño de plasma; se desarrolló como un biomaterial autólogo y demostró ser útil en la sanación y en la regeneración de tejidos (Marx et al., 2004, J. Oral Maxillofac. Surg., 62, 489-496). El plasma rico en plaquetas no sólo consiste de una concentración de plaquetas pero también contiene a factores de crecimiento (tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas: PDGF (platelet-derived growth factor), el factor de crecimiento endotelial vascular: VEGF (vascular endothelial growth factor), el factor de crecimiento transformante: TGF (transforming growth factor) y el factor de crecimiento epidérmico: EGF (epidermal growth factor) que se secretan activamente por las plaquetas y han demostrado tener un rol fundamental en el proceso de iniciación de sanación de heridas.

65

[0010] Por ejemplo, el PDGF es conocido por iniciar la sanación de los tejidos colectivos, incluyendo la regeneración

y reparación ósea. El PDGF también incrementa la mitogénesis (células sanadoras), la angiogénesis (la mitosis endotelial a capilares sanguíneos de funcionamiento normal) y la activación de macrófagos. El VEGF liberado por los leucocitos también demostraron tener actividades potentes angiogénicas, mitogénicas y de mejoramiento de la permeabilidad vascular en las células endoteliales. El TGF- β promueve la mitosis y la diferenciación celular para el tejido conectivo y para los huesos, actúa en las células madres mesénquimas, en los preosteoblastos y en los fibroblastos e inhibe la formación de osteoclastos. El EGF se conoce por inducir el desarrollo epitelial y promover la angiogénesis.

[0011] Las concentraciones de plaquetas se utilizan generalmente en implantes dentales y en cirugías óseas, sobre todo en los Estados Unidos de América. Se han desarrollado varias técnicas de preparación de PRP mediante procesos de centrifugación. Sin embargo, debido a la sensibilidad de las células de plaquetas y a la variabilidad de la eficiencia de los métodos de separación de las plaquetas de los glóbulos rojos, existe una variabilidad enorme entre los métodos utilizados para la preparación de concentraciones de plaquetas (*Marx et al., 2004, mencionado anteriormente; Roukis et al., Adv. Ther., 2006, 23(2):218-37*): por ejemplo, el material de laboratorio para diagnósticos in vitro que se utiliza para la preparación de plaquetas, conlleva a una baja producción de plaquetas y de otros componentes de plasma (*Marx et al., 2004, mencionado anteriormente: Anitua 35%, Landsberg 30%, Clinaseal 39%, ACE surgical 33%, Curasan 29%*). Las configuraciones automatizadas de Biomet PCCS & GPS (*Marx et al., 2004, mencionado anteriormente*), que aparte de ser un proceso complicado tiene costos prohibitivos para el proceso de una muestra sanguínea, conllevando a una producción de únicamente el 61% y SmatPreP de Harvest Technology con un 62%. En aquellos sistemas, existe obviamente una pérdida importante de tejidos biológicos valiosos de los pacientes, por lo cual, existe la necesidad del desarrollo de un proceso confiable para recolectar a las células de plasma con producciones altas, que sea fácil de usar y que sea efectivo en relación a costos.

[0012] Se demostró, recientemente, que los efectos positivos del plasma rico en plaquetas en la regeneración ósea cubren a un rango limitado de concentración de plaquetas y se reveló que ocurre un efecto inhibitorio en la presencia de más de 10^6 plaquetas por microlitro, lo cual es de 3 a 4 veces el recuento de la línea base (*Weibrich et al., 2004, Bone (hueso), 34(4):665-71*).

[0013] Adicionalmente, la adquisición de concentraciones de plaquetas todavía necesita el uso de botiquines relativamente complejos y de maquinaria dedicada costosa y la interacción igualmente costosa de técnicos especializados. Esta debilidad hace que los métodos que se conocen actualmente de preparación de PRP no se adopten para usarse en los puntos de atención.

[0014] Además, la preparación de células en vista de la regeneración celular o de tejidos para su uso en trasplantes, entre generaciones post-operativas o para propósitos estéticos se enfrenta al problema de conservación a largo plazo de las células y de los tejidos. La conservación criogénica de tejidos o de células generalmente se usa para el mantenimiento a largo plazo de tejidos o de células, notablemente de plaquetas, pero esta técnica muestra debilidades y problemas serios tales como la formación de cristales, problemas osmóticos, aglutinaciones, inhibición de la capacidad de síntesis de las proteínas, la expresión proteínica de estrés en respuesta al estrés térmico, etcétera. Por lo tanto, se sabe que la conservación criogénica de tejidos o de células alteran la viabilidad y la estabilidad celular (*Agence française de sécurité sanitaire, 2003; Arnaud et al., 1999, Cryobiology (Biología Criogénica), 38, 192-199; Tablin et al., 2001, Cryobiology (Biología Criogénica), 43(2), 114-23*). Algunos de los efectos colaterales de la conservación criogénica podrían limitarse con el uso de agentes anticongelantes tales como el DMSO o el glicerol u otros conservadores criogénicos (*US 5,589,617, Oh et al., Cornea, 26, 840-846*) pero la concentración de estos agentes debe adaptarse para limitar su toxicidad y sus efectos colaterales.

[0015] US 566 7 963 presenta un método para la preparación de una composición con una concentración de plaquetas que comprende los pasos de centrifugar a toda la sangre y re-suspender el plasma enriquecido.

[0016] Por lo tanto, existe una necesidad de un método nuevo o alternativo para la preparación de células y tejidos adecuados para su uso extemporáneo mientras que se preserva su integridad, notablemente en términos de la capacidad y viabilidad de secreción de los factores de crecimiento.

Resumen del invento

[0017] El invento se refiere a un método para la elaboración de nuevas preparaciones celulares, mezcladas y agregadas opcionalmente con un extracto celular, tal como un extracto autólogo de queratinocitos, de células de la médula ósea, de fibroblastos, de células del periostio o de células de la córnea, de melanocitos y de células de Langheran; células grasas; células musculares tales como los miofiblastos y las células satelitales; los osteoblastos; los condrocitos; las células del cordón umbilical, las células de Schwann o las células del tendón de Aquiles.

[0018] El proceso de preparación de una composición de una concentración de plaquetas, de acuerdo al invento, constituye a un proceso confiable que recauda el $95 \pm 5\%$ de las células de plasma, que es fácil de usar y que es efectivo en relación a costos (*Borzini P. et al., in preparation (en preparación)*).

[0019] Este invento presenta un proceso para la preparación de una composición celular, que comprende los pasos de:

a) Centrifugar a toda la sangre en un tubo separador seleccionado de:

- Un tubo separador de vidrio que contiene a un gel tixotrópico que se basa en poliéster y una solución amortiguadora de citrato de sodio a 0.10 M; y
- Un separador de tereftalato de polietileno que contiene a un gel altamente tixotrópico formado por una mezcla polimérica y un citrato de sodio anhidrido a 3.5 miligramos/mililitro;

b) Separar al plasma enriquecido que es rico en plaquetas de todo el plasma al remover alrededor de la mitad del sobrenadante que contiene a plasma con niveles bajos de plaquetas;

c) Volver a suspender al plasma enriquecido;

donde el paso de centrifugación a) se realiza con una fuerza de alrededor de 1500 g hasta alrededor de 2000 g en un período suficiente de tiempo para formar una barrera entre el plasma que contiene a plaquetas, a linfocitos y a monocitos y un pellet que contiene a eritrocitos; el paso de separación b) se lleva a cabo una recaudación del sobrenadante de encima de dicha barrera y donde el plasma enriquecido tiene altos niveles de leucocitos, trombocitosis y proteínas de adhesión (por ejemplo, la fibronectina) en comparación a la sangre normal completa.

[0020] En un aspecto preferido, este invento presenta un proceso para la preparación de una composición sanadora de heridas que comprende:

a) Suministrar una concentración de plaquetas obtenida por medio del método del invento;

b) Mezclar y agregar la concentración de plaquetas con un activador de coagulación en un índice de volumen (concentración de plaquetas: activador de coagulación) de alrededor de 10:1 hasta alrededor de 10:3;

c) Mezclar opcionalmente un extracto celular autólogo, tal como un extracto de queratinocitos, de la médula ósea, de fibroblastos, de células del perostio y de la córnea, de melanocitos y de células de Langheran; células grasas; células musculares tales como mioblastos y células satelitales; osteoblastos; condrocitos; células del cordón umbilical; células de Schwann y células del tendón de Aquiles.

[0021] En un aspecto adicional, se presenta en este documento a un botiquín adaptado para la regeneración de tejidos que comprende a un tubo separador de acuerdo a la presentación, accesorios de flebotomía para la preparación del sanador de heridas de acuerdo a la presentación y un dispositivo aplicador (por ejemplo, una jeringa doble) para el suministro simultáneo en la herida de la concentración de plaquetas de acuerdo a la presentación y un activador de coagulación.

[0022] En un aspecto adicional, se presenta en este documento a un método para promover la sanación de heridas y/o la regeneración de tejidos y/o de huesos en una herida de un humano o de un animal inferior que comprende:

a) Suministrar un sanador de heridas de acuerdo a la presentación;

b) Aplicar un monto terapéuticamente efectivo de dicho sanador de heridas a una herida, a un tejido dañado o a un hueso dañado.

[0023] En un aspecto adicional, se presenta en este documento a un método para inducir la regeneración periodontal en una herida o un defecto periodontal de un mamífero con una enfermedad periodontal u otra condición que requiera la regeneración periodontal que comprende:

a) Suministrar un sanador de heridas de acuerdo a la presentación;

b) Aplicar un monto terapéuticamente efectivo de dicho sanador de heridas a dicha herida o dicho defecto o cavidad periodontal;

c) Insertar opcionalmente una barrera periodontal, donde la barrera se encuentra entre el tejido gingival y la herida tratada de acuerdo a los pasos a) y b) y dicha barrera se selecciona de una membrana, de un material polimérico biodegradable y/o de material poroso biocompatible;

d) Cerrar la herida.

[0024] En un aspecto adicional, se presenta en este documento a un método para promover la regeneración de la piel en una cicatriz o una arruga de un humano o un animal inferior que comprende:

a) Suministrar un sanador de heridas de acuerdo a la presentación;

b) Llenar la cicatriz de la piel o línea de arruga con dicho sanador de heridas.

[0025] En un aspecto adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición celular que comprende los pasos de:

(a) Centrifugar a la sangre completa en un tubo separador seleccionado de:

- Un tubo separador de vidrio que contiene a un gel tixotrópico que se basa en poliéster y a una solución amortiguadora de citrato de sodio 0.10 M; y

- Un tubo separador de tereftalato de polietileno que contiene a un gel altamente tixotrópico formado por una mezcla polimérica y un citrato de sodio anhídrido a 3.5 miligramos/mililitro;

(b) Separar al plasma enriquecido con altos niveles de plaquetas del plasma completo al remover la mitad del sobrenadante que contiene al plasma con niveles bajos de plaquetas;

(c) Suspender nuevamente al plasma enriquecido;

(d) Suministrar un extracto celular tal como un extracto de células dérmicas tales como los queratinocitos, los fibroblastos, los melanocitos y las células de Langheran; las células grasas; las células de la médula ósea; las células musculares tales como los mioblastos y las células satelitales; los osteoblastos; los condrocitos; las células de la membrana del periostio; las células de la córnea; las células del cordón umbilical; las células de Schwann, las células de tendones o las células de los islotes pancreáticos;

(e) Mezclar y agregar el concentrado de plaquetas obtenido bajo el paso (c) con el extracto celular obtenido en (d);

donde el paso de centrifugación a) se realiza con una fuerza de, o de alrededor de, 1500 g a alrededor de 2000 g durante un período suficiente de tiempo para formar una barrera entre el plasma que contiene a las plaquetas, a los linfocitos y a los monocitos y el pellet que contiene a los eritrocitos; el paso de separación b) se realiza mediante la recolección del sobrenadante de encima de dicha barrera y donde el plasma enriquecido tiene niveles altos de leucocitos, de trombocitosis y de proteínas de adhesión (por ejemplo, la fibronectina) en comparación a la sangre natural completa.

[0026] En un aspecto adicional, se presenta en este documento a una composición celular aislada que comprende a:

a) Plasma;

b) Plaquetas con una concentración de por lo menos 300×10^9 células/litro;

c) Glóbulos blancos con una concentración de por lo menos $7,0 \times 10^9$ células/litro;

d) Fibrinógeno con una concentración de por lo menos 3 mg/mililitro;

e) Un extracto celular, tal como un extracto de células dérmicas tales como los queratinocitos, los fibroblastos, los melanocitos y células de Langheran; células grasas; células de la médula ósea; células musculares tales como los mioblastos y células satelitales; los osteoblastos, los condrocitos; las células de la membrana del periostio; células de la córnea; células de cordones umbilicales; las células de Schwann, células de tendones o células de islotes pancreáticos donde las células están presentes con una concentración de alrededor de 10^5 a alrededor de 10^6 células/mililitro de plasma o de plasma enriquecido;

y donde la concentración de eritrocitos es menor que el $0,6 \times 10^{12}$ células/litro.

[0027] En un aspecto adicional, se presenta en este documento a una composición celular aislada que comprende a:

a) Plasma;

b) Plaquetas con una concentración de por lo menos 300×10^9 células/litro;

c) Glóbulos blancos a una concentración de por lo menos $7,0 \times 10^9$ células/litro;

d) Fibrinógeno una concentración de por lo menos 3 mg/l;

e) Un activador de coagulación con una taza de volumen (concentración de plaquetas: activador de coagulación) de alrededor de 10:1 a alrededor de 10:3;

5 f) Un extracto celular, tal como un extracto de células dérmicas tales como queratinocitos, fibroblastos, melanocitos y células de Langheran; células grasas; células de la médula ósea; células musculares tales como los mioblastos y células satelitales; osteoblastos; condrocitos; células de la membrana del periostio; células de la córnea; células del cordón umbilical; células de Schwann, células de tendones o células de islotes pancreáticos donde las células están en una concentración de alrededor de 10^5 a alrededor de 10^6 células/mililitro de plasma o de plasma enriquecido;

10 y donde la concentración de eritrocitos es menor que 0.6×10^{12} células/litro.

15 **[0028]** En un aspecto adicional, se presenta en este documento a un método para promover la sanación de heridas y/o el sellamiento y/o la regeneración de un tejido y/o de un cartilago y/o de un hueso y/o de un nervio en un humano o en un animal inferior que comprende a:

a) suministrar una composición sanadora de heridas o de tejidos o una composición celular de acuerdo a la presentación;

20 b) aplicar un monto terapéuticamente efectivo de dicha composición sanadora de heridas o de tejidos o una composición celular a una herida, a un tejido dañado o a un cartilago dañado o a un hueso dañado.

25 **[0029]** En un aspecto adicional, se presenta en este documento a un método para incrementar el volumen de tejidos adiposos en un mamífero con un injerto dérmico de grasa u otra condición que requiera la regeneración de tejidos adiposos que comprende:

a) suministrar una composición de células grasas de acuerdo a la presentación;

30 b) aplicar un monto terapéuticamente o cosméticamente efectivo de dicha composición de células grasas al injerto de grasas dérmicas o al tejido adiposo que requiere una regeneración de tejidos adiposos;

35 c) insertar opcionalmente una solapa o un implante quirúrgico, donde la solapa o el implante quirúrgico, se ubica en el lugar que requiere regeneración o una amplificación volumétrica y dicha solapa o implante quirúrgico comprende a una combinación de una preparación de células grasas de acuerdo a la presentación y plasma o material enriquecido con plasma.

40 **[0030]** En un aspecto adicional, se presenta en este documento a un método para inducir una regeneración del miocardio en un mamífero con una deficiencia del miocardio u otra condición que requiera una regeneración del tejido del miocardio que comprende:

a) suministrar una composición de células musculares o de células de la médula ósea de acuerdo a la presentación;

45 b) aplicar un monto terapéuticamente efectivo de dicha composición de células musculares al tejido del miocardio que requiere regeneración.

50 **[0031]** En un aspecto adicional, se presenta en este documento un método para inducir una regeneración córnea en un mamífero con una deficiencia de la córnea u otra condición que requiera una regeneración de la córnea que comprende:

a) suministrar a una composición de células de la córnea de acuerdo a la presentación;

55 b) aplicar un monto terapéuticamente efectivo de dicha composición de células de la córnea al tejido de la córnea que requiere regeneración.

[0032] En un aspecto adicional, se presenta en este documento a un método para inducir una regeneración de las articulaciones o del cartilago en un mamífero con una deficiencia de las articulaciones o del cartilago u otra condición que requiera una regeneración de tejidos de las articulaciones o de los cartílagos que comprende:

60 a) suministrar una composición de células de condrocitos o de células de la médula ósea de acuerdo a la presentación;

b) aplicar un monto terapéuticamente efectivo de dicha composición de células de condrocitos al tejido de articulaciones o de cartílagos que requiere una regeneración;

65 c) insertar opcionalmente una solapa un implante quirúrgico, donde la solapa o el implante quirúrgico, se

coloca en el defecto del cartílago o bajo un parche perióstico, y donde dicha solapa o implante quirúrgico comprende a una combinación de una composición de condrocitos o de células de la médula ósea de acuerdo a la presentación y plasma o material enriquecido con plasma.

5 **[0033]** En un aspecto adicional, se presenta en este documento a un método para promover la regeneración de la piel en una cicatriz, una arruga o una deficiencia de grasa de un humano o de un animal inferior que comprende:

- a) suministrar un sanador de heridas o de tejidos o una composición celular de acuerdo a la presentación;
- 10 b) llenar la cicatriz de la piel, a la línea de arruga o a la deficiencia de grasa con dicho sanador de heridas o de tejidos o con una composición celular de acuerdo a la presentación.

15 **[0034]** En un aspecto adicional, se presenta, en este documento, a un método para inducir la regeneración de los nervios periféricos en un mamífero con daños a los nervios periféricos, con suturas a los nervios o con lesiones a la médula espinal u otra condición que requiera una regeneración de los nervios periféricos que comprende:

- a) suministrar una composición de células de Schwann de acuerdo a la presentación;
- 20 b) aplicar un monto terapéuticamente efectivo de dicha composición de células de Schwann al nervio periférico que requiere regeneración.

25 **[0035]** En un aspecto adicional, en este documento se presenta a un método para inducir una regeneración ósea en un mamífero con daños en los huesos, una deficiencia ósea u otra condición que requiera una regeneración ósea que comprende:

- a) suministrar una composición de células de la médula ósea o de células de osteoblastos de acuerdo a la presentación;
- 30 b) aplicar un monto terapéuticamente efectivo de dicha composición de células de la médula ósea o de células de osteoblastos al hueso que requiere regeneración.

35 **[0036]** En un aspecto adicional, se presenta en este documento a un método para el tratamiento de tipos de diabetes, de diabetes que depende de la insulina o de hiperglicemia en un mamífero que comprende:

- a) suministrar una composición de células de islotes pancreáticos de acuerdo a la presentación;
- b) aplicar un monto terapéuticamente efectivo de dicha composición de células de islotes pancreáticos al paciente, por ejemplo, mediante inyecciones.

40 **[0037]** En un aspecto adicional, se presenta en este documento a un método para el tratamiento de inconsistencia urinaria en un mamífero u otra condición que requiera la regeneración de la vejiga que comprende:

- a) suministrar una composición de células de mioblastos de acuerdo a la presentación;
- 45 b) aplicar un monto terapéuticamente efectivo de dicha composición de células de mioblastos al cuello de la vejiga que requiere regeneración.

50 **[0038]** en un aspecto adicional, se presenta en este documento a un método para el tratamiento de inconsistencia anal en un mamífero u otra condición que requiera una regeneración del músculo del ano que comprende:

- a) suministrar una composición de células de mioblastos de acuerdo a la presentación;
- 55 b) aplicar un monto terapéuticamente efectivo de dicha composición de células de mioblastos para el área para-anal que requiere regeneración.

60 **[0039]** En un aspecto adicional, se presenta en este documento un método para el tratamiento de esofagitis por reflujo o enfermedades de reflujo gastroesofágico en un mamífero u otra condición que requiera la regeneración del esfínter esofágico que comprende:

- a) suministrar una composición de células de mioblastos de acuerdo a la presentación;
- b) aplicar un monto terapéuticamente efectivo de dicha composición de células de mioblastos para el esfínter esofágico que requiere regeneración.

65 **[0040]** En un aspecto adicional, se presenta en este documento un uso de la preparación celular obtenida a través

del método de acuerdo a este invento para la fabricación de un medicamento para la sanación de heridas o de tejidos o para promover el crecimiento óseo o periodontal y/o la regeneración de huesos y/o de tejidos tales como la regeneración de la piel, de los cartílagos, de los músculos, de los tendones, del tejido adiposo, de la córnea, de los nervios periféricos, de la columna.

[0041] En un aspecto, se presenta en este documento a un uso de la composición celular obtenida mediante el método de acuerdo a este invento para la fabricación de una preparación cosmética para su uso como un agente anti-envejecimiento o un agente de reparación de la piel tal como un agente de reparación de cicatrices, un agente de reparación de la lipoatrofia o un agente llenador y/o de reparación de arrugas.

[0042] En un aspecto adicional, se presenta en este documento a una composición farmacéutica que comprende a una composición celular obtenida mediante el método de acuerdo al invento y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0043] En un aspecto adicional, se presenta en este documento una composición cosmética que comprende a una composición celular obtenida por medio de un método de acuerdo al invento y a un portador cosméticamente aceptable.

[0044] En un aspecto adicional, se presenta en este documento a un dispositivo que puede implantarse para su uso en la terapia de regeneración de tejidos que comprende:

- a) un núcleo permeable que comprende a una composición celular de la presentación; y
- b) un revestimiento externo alrededor de dicho núcleo, donde dicho revestimiento comprende a un material, preferiblemente, biocompatible o bio-reabsorbible.

[0045] Las composiciones obtenidas mediante el método de acuerdo al invento son útiles para la regeneración y/o para el rejuvenecimiento de tejidos, huesos y/o cartílagos. Las composiciones obtenidas mediante el método de acuerdo al invento son particularmente útiles en el tratamiento de úlceras neuropáticas diabéticas o úlceras de decúbito; daños a los huesos y a los cartílagos tales como daños profundos a los cartílagos de articulaciones o condrales tales como una reparación quirúrgica de tendones desgarrados; artritis de las articulaciones causada por traumas o por la edad; enfermedades del manguito de los rotadores; heridas que no sanan tales como como heridas inducidas por la vasculitis, por ejemplo, en las extremidades inferiores equinas; enfermedades periodontales; cirugía de implantes; daños del músculo cardiaco tales como en fallas cardíacas crónicas, fallas del corazón, enfermedades isquémicas y no isquémicas, cardiomiopatía; enfermedad de reflujo gastroesofágico; incontinencias anales o urinarias; cirugía facial tal como alopecia inducida por cirugía facial (alopecia debido a la pérdida de folículos del cabello en las áreas de las patillas), cirugía de levantamiento facial (ritidectomía), rinoplastia, injertos de grasa dérmica (en el tratamiento de aumentación facial, hemiatrofia congénita de la cara tal como una atrofia congénita del cartílago de la nariz y una lipoatrofia tal como en los pacientes que padecen de VIH/SIDA, erosión y artroscopia); complicaciones de sanación de heridas tales como después de una blefaroplastia de los párpados de los ojos; enfermedades de la córnea tales como aquellas que impliquen la opacidad de la cómea tales como aquellas causadas por quemaduras químicas, la aflicción por el síndrome de Steven's Johnson y úlceras de la cómea; cicatrices de la córnea; el síndrome del ojo seco; enfermedades hematológicas tales como la talasemia; daños de los nervios periféricos, sutura de los nervios y lesiones de la médula espinal; defectos o enfermedades óseas tales como injertos óseos o fracturas óseas, daños o enfermedades de la piel tales como el acné (especialmente después del tratamiento de demoabrasión), quemaduras, cicatrices pequeñas de rubéola o de varicela, vitiligo, lipoatrofia, sarcoma de Kaposi, queloides de la piel o la dermatosis palmar de Dupuytren.

[0046] En otro aspecto, las composiciones obtenidas mediante el método de acuerdo al invento son útiles para la regeneración y/o rejuvenecimiento de los tejidos de la piel, particularmente en la promoción y/o iniciación de la regeneración de la piel tal como para reducir arrugas de la piel, acné (especialmente después del tratamiento de demoabrasión), quemaduras, rubéola o cicatrices pequeñas de la varicela, el vitiligo y lipoatrofias (por ejemplo, composiciones anti-envejecimiento y composiciones de regeneración de la piel), el mejoramiento de las líneas nasolabiales y tratamiento de daños o enfermedades a la piel tales como quemaduras de la piel, el sarcoma de Kaposi, queloides de la piel o la dermatosis palmar de Dupuytren y la reducción del dolor asociado con la regeneración de la piel y de los tejidos.

Descripción de las figuras

[0047]

La figura 1 es una representación esquemática de la variación de concentración de los factores de crecimiento (PDGF-AB, EGF y VEGF) de una composición con un concentrado de plaquetas obtenida mediante el método de acuerdo al invento versus el tiempo (T en horas) después del paso de centrifugación en el proceso de preparación del invento.

La figura 2 es una representación esquemática de los resultados del tratamiento de un lugar donante de injertos de la piel con una preparación que contiene una composición de una concentración de plaquetas obtenida mediante el método de acuerdo al invento en comparación con un grupo de control en relación al tiempo de sanación en días (HT), al dolor en el día 5 en una escala del 0 al 10 (P - pain) y de epitelización en el día 5 en una escala del 0 al 7 (E). El grupo de control: C, preparación individual rica en plaquetas: RegenPRP™, preparación rica en plaquetas y queratinocitos autólogos: RegenExtracell™. La línea de puntos indica cuando la primera venda es cambiada en el día 5.

La figura 3 representa la morfología de un fibroblasto humano expandido en una preparación celular obtenida por medio del método de acuerdo al invento bajo las condiciones descritas en el ejemplo 7, que muestra a una ramificación y filopodios x 5'000 (microscopio invertido Olympus®).

La figura 4a representa a una matriz de 3 dimensiones de fibroblastos humanos de una preparación celular obtenida por medio del método de acuerdo al invento bajo las condiciones descritas en el ejemplo 7.

La figura 4b representa monocapas de fibroblastos empaquetados densamente en un cultivo 3D a partir de una preparación celular obtenida mediante el método de acuerdo al invento bajo las condiciones descritas en el ejemplo 7.

Descripción detallada del invento:

[0048] Los siguientes párrafos suministran definiciones de los términos de acuerdo al invento y tienen la intención de aplicarse uniformemente a lo largo de la especificación y de las reivindicaciones a menos que la definición establecida expresamente suministre una definición más amplia.

[0049] El término “tixotrópico” se refiere a un gel que se vuelve más fluido como resultado de agitación o de presión, es decir, un gel cuya viscosidad se reduce como resultado de agitaciones o presiones. El término viscosidad se refiere a aquellas características de un material o materiales especificados que determinan el nivel de gelificación, tales como, por ejemplo, la firmeza o la dureza del material, o el nivel con el cual el material resiste fluir en una forma similar a un fluido. Un gel tixotrópico de acuerdo al invento comprende a un gel de poliéster, o una de sus mezclas, que es soluble en agua y que es químicamente inerte a constituyentes sanguíneos que pueden utilizarse de acuerdo al invento. Genes tixotrópicos comunes se utilizan en la separación de células sanguíneas para propósitos diagnósticos y proteómicos.

[0050] El término “punto de atención” se refiere a todos los servicios suministrados a pacientes al pie de la cama. El término “accesorios de flebotomía” o “accesorios de venopunción” se refiere a accesorios que permiten la punción de una vena con una aguja para propósitos de sacar sangre.

[0051] El término “sanador de heridas” o “sellador de heridas” o una “composición sanadora de tejidos” se refiere a una gente o a una composición que puede promover y/o incrementar la velocidad y/o la calidad de la cicatrización de una herida. Los sanadores o selladores de heridas son capaces de promover la regeneración de tejidos.

[0052] El término “heridas” se refiere a cualquier tejido dañado, por ejemplo, después de traumas o cirugías. Las heridas en los mamíferos, incluyendo, por ejemplo, a úlceras por presión, otros tipos de úlceras, laceraciones y quemaduras, lugares donde se realizaron injertos (el injerto donado y los lugares que recibieron los injertos), fisuras, daños del tejido periodontal, heridas diabéticas que no se sanan, consecuencias de traumas o de cualquier cirugía. En su sentido general, la expresión tiene la intención de abarcar a daños de la piel en los que la superficie de la piel presenta una depresión sin que exista necesariamente un corte en su superficie tal como daños a los tejidos relacionados con la edad (por ejemplo, arrugas) y cicatrices tales como, por ejemplo, cicatrices del acné (especialmente después del tratamiento de demoabrasión) o de la rubéola.

[0053] El término “PRP” se refiere a un plasma rico en plaquetas, preferiblemente de origen humano, más preferiblemente autólogo, preparada mediante el proceso del invento para pellets y para remover eritrocitos y concentrar el plasma en leucocitos, trombocitos y proteínas de adherencia en comparación con la sangre natural completa.

[0054] El término “autólogos” o “autogénico” o “autógeno” se refiere a un método del invento utilizando sangre de un solo donante y donde se propone usar la sangre extraída de este donante en el mismo donante. En contraste con los métodos “alógenicos” que utilizan la sangre de una o más terceras partes para su uso en un donante (“homólogo” o “heterólogo”). Un producto autólogo evita algunos de los problemas comunes asociados con el uso de materiales biológicos de terceras partes, tales como, por ejemplo, exámenes para asegurar que el donante sea biológicamente o inmunológicamente compatible con el paciente y contaminaciones potenciales con hepatitis, VIH, priones, la enfermedad de Creutzfeld-Jacob y similares.

[0055] El término “activador de coagulación” se refiere a un agente que puede activar o iniciar una coagulación. Un activador de coagulación comprende a un activador de trombina y/o un activador de fibrinógeno.

[0056] El término “activador de trombinas” se refiere a un agente que es capaz de activar a la trombina y de iniciar la coagulación. Activadores comunes de la trombina son ciertos factores tales como el sodio o el calcio. En la práctica de este invento, la activación de la trombina ocurre preferiblemente en la presencia de iones de calcio. Los iones de calcio se agregan, generalmente, a la concentración de plaquetas como una solución salina para suministrar una concentración final de, generalmente, alrededor de 0.1 miligramos/mililitro de concentración de plaquetas. Sales de calcio adecuadas incluyen, pero sin limitarse a, CaCO_3 , y CaSO_4 . Una sal preferida de calcio para su uso en el invento es cloruro de calcio (CaCl_2). El CaCl_2 está disponible como una inyección de cloruro de calcio, USP 10% (Regen Lab, Suiza).

[0057] El término “activador de fibrinógeno” se refiere a un agente que está disponible para activar a la conversión de fibrinógeno a fibrina y activa a la formación del coágulo. Activadores comunes del fibrinógeno son la trombina y la batroxobina. El término trombina podría incluir a trombina calcificada, en particular, a desde o alrededor de 100 a alrededor de 10 unidades de trombina por 1 ml de un 10% de una solución acuosa de cloruro de calcio; podría incluir a trombina bovina calcificada, a trombina alogénica o a trombina humana recombinante, preferiblemente una trombina autóloga. Un activador de fibrinógeno puede ser una composición enriquecida con trombina tal como composiciones de trombina tal como se describen en US 6'472.162 o un suero autólogo de trombina de acuerdo a la presentación.

[0058] El término “monto terapéuticamente efectivo” se refiere a un monto o montos de los elementos constituyentes o una de sus combinaciones necesarias para mejorar la sanación de heridas, tal como, por ejemplo, la reducción en el volumen o en el área superficial de la herida, el incremento del monto de tejido de granulación u otro material biológico que facilita el asentamiento del colágeno, el crecimiento interno vascular, la proliferación de fibroblastos o la sanación general; se asume que todas las versiones del invento aquí descritas tienen el monto o montos terapéuticamente efectivos de sustancias constituyentes, o sus combinaciones. El término “portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a ingredientes adicionales farmacéuticamente aceptables tales como estabilizadores, agentes antimicrobianos, amortiguadores, adyuvantes, anestésicos, corticoesteroides y similares.

[0059] El término “portador cosméticamente aceptable” se refiere a ingredientes adicionales aceptables tales como estabilizadores, amortiguadores, agentes colorantes, agentes saborizantes, adyuvantes y similares.

[0060] Las composiciones obtenidas mediante el método de acuerdo al invento son particularmente útiles en tratamientos de sanación o regeneración de heridas o tejidos, especialmente el tratamiento de heridas traumáticas o quirúrgicas tales como el encaje y/o la aplicación y/o el sellamiento de injertos naturales o prostéticos (especialmente injertos de la piel, óseos y/o prótesis o implantes dentales o similares, incluyendo además al lugar del injerto del donante); el tratamiento de vasculitis; úlceras tales como úlceras neuropáticas diabéticas o úlceras de decúbitos; radiodermatitis (por ejemplo, después de la irradiación en un carcinoma epidermoide de la piel) y el cierre de fistulas (tales como para ciclistas).

[0061] Además, las composiciones obtenidas mediante el método de acuerdo al invento son particularmente útiles en el tratamiento de enfermedades cardíacas, regeneraciones cardíacas tales como en el tratamiento de fallas cardíacas, fallas cardíacas crónicas, fallas cardíacas isquémicas y no isquémicas y cardiomiopatías.

[0062] Además, las composiciones obtenidas mediante el método de acuerdo al invento son particularmente útiles para el tratamiento de incontinencias urinarias y/o anales.

[0063] Además, las composiciones obtenidas mediante el método de acuerdo al invento son particularmente útiles en el tratamiento de la enfermedad esofagitis por reflujo y/o de reflujo gastroesofágicos.

[0064] Además, las composiciones obtenidas mediante el método de acuerdo al invento son particularmente útiles en el tratamiento de daños a la piel tales como pieles dañadas por radiaciones (piel dañada por la radiodermatitis o el sol), pieles viejas o pieles quemadas y/o el alivio de arrugas faciales, arrugas de expresión, el acné (especialmente después del tratamiento de demaabrasión), quemaduras, cicatrices pequeñas de la rubéola o de la varicela, vitiligo, lipoatrofias o lipodistrofias, el sarcoma de Kaposi, queloides de la piel o fibromatosis palmar de Dupuytren y/o tratamientos de rejuvenecimiento de la piel.

[0065] Además, las composiciones obtenidas por medio del método de acuerdo al invento son particularmente útiles en el tratamiento de lipoatrofias tales como en los pacientes del VIH/SIDA y en otras hemiatrofias congénitas de la cara tales como la atrofia congénita del cartílago de la nariz.

[0066] Además, las composiciones obtenidas mediante el método de acuerdo al invento son particularmente útiles en el tratamiento de enfermedades de los huesos, de los cartílagos y de las articulaciones tales como daños condrales, artritis, lesiones del cartílago y/o de los huesos tales como daños y/o erosiones y/o artroscopias profundas del cartílago, tendones rasgados y manguitos de los rotadores rasgados en el hombro.

[0067] Además, las composiciones obtenidas mediante el método de acuerdo al invento son particularmente útiles

en el tratamiento de enfermedades hematológicas tales como la talasemia.

[0068] Además, las composiciones obtenidas mediante el método de acuerdo al invento son particularmente útiles en el tratamiento de enfermedades de la córnea tales como el síndrome del ojo seco; la opacidad de la córnea tal como aquellas causadas por quemaduras químicas, la afección del síndrome de Steven's Johnson, cicatrices de la córnea y úlceras de la córnea.

[0069] Además, las composiciones obtenidas mediante el método de acuerdo al invento son particularmente útiles en el tratamiento de daños de los nervios periféricos, suturas de nervios y lesiones de la médula espinal.

[0070] Además, las composiciones obtenidas mediante el método de acuerdo al invento son particularmente útiles en el tratamiento de diabetes de tipo 1, diabetes que depende de la insulina y/o la hiperglicemia.

[0071] Además, las composiciones obtenidas mediante el método de acuerdo al invento son particularmente útiles en el tratamiento de defectos o enfermedades óseas tales como injertos de huesos o fracturas de huesos.

[0072] El uso de la composición resultante puede modificarse aún más antes de la aplicación y de acuerdo al objetivo terapéutico.

[0073] Las composiciones obtenidas mediante el método del invento pueden utilizarse en conjunto con materiales óseos de relleno, especialmente materiales reabsorbibles de relleno tales como la hidroxiapatita (cerámica de fosfato de calcio utilizada como un biomaterial) o huesos desmineralizados, o utilizados como una mezcla con extractos óseos en un proceso para el recrecimiento del hueso, por ejemplo, en procedimientos craneofaciales y ortopédicos.

[0074] Las composiciones obtenidas mediante el método del invento podrían utilizarse como selladores de heridas en cirugías plásticas incluyendo injertos por quemaduras y otras aplicaciones de injertos de piel suelta, por ejemplo, en la Oncología favoreciendo la regeneración de tejidos, incluyendo la aceleración de la (neo)vascularización.

[0075] Las composiciones obtenidas mediante el método de acuerdo al invento son particularmente útiles en tratamientos de sanación de heridas en los lugares donantes de injertos de piel. La remoción de un injerto de piel en una piel saludable crea una nueva herida en el lugar donante que normalmente se sana espontáneamente en un lapso de 12 a 14 días. Sin embargo, esta cicatrización es extremadamente exigente para el cuerpo, especialmente si el lugar donante es amplio o la persona es menos resistente (por ejemplo, víctimas de quemaduras, gente que padece de varios traumas, gente tratada con corticoides, niños o ancianos) y las pérdidas energéticas se incrementan aún más por la pérdida de minerales, de oligoelementos y proteínas inducidas por las pérdidas de fluidos que se originan por la nueva herida. Adicionalmente, a menudo se presenta un dolor importante durante los primeros 8 días en el lugar donante del injerto. A menudo se utilizan tratamientos de reducción del dolor tales como el uso de analgésicos (por ejemplo, la morfina) y/o vendajes hidrocelulares de heridas, sin embargo, el dolor sigue presente, especialmente durante el cambio de vendajes que ocurren necesariamente en las primeras 48 horas hasta la primera semana después de la remoción del injerto. Adicionalmente, los vendajes hidrocelulares de heridas tienen la debilidad de que son caros y que además mantienen la humedad de la herida lo cual evita que ésta se seque incrementando la profundidad de la herida, lo cual favorece brotes de infecciones bacterianas y conlleva a cicatrices que no son estéticas. Además, es muy deseable una simulación de la sanación del lugar donante del injerto de piel.

[0076] Las composiciones obtenidas mediante el método del invento son particularmente adaptables a heridas crónicas que podrían no tener la suficiente circulación de sangre para facilitar el proceso de sanación de heridas.

[0077] Las composiciones obtenidas mediante el método de acuerdo al invento también podrían utilizarse en el tratamiento de enfermedades periodontales en las cuales se observa una pérdida y/o un daño de tejidos periodontales, tales como, un tratamiento que comprende, por ejemplo, colocar en un lugar periodontal o una carie, en un humano, o en un animal inferior, que necesite la regeneración de tejidos periodontales a una composición que se obtiene mediante el método de acuerdo al invento.

[0078] Las composiciones obtenidas mediante el método de acuerdo a este invento son efectivas para eliminar o para reducir, en una forma importante, sangrados y excavaciones post operativas o la pérdida de líquido seroso u otro fluido en estas aplicaciones, para reducir el riesgo de infección causado por la mayoría de bacterias y/o mejorar la formación de tejidos colectivos en comparación con la sanación natural (es decir, no se agregan agentes exógenos) o a la sanación obtenida a través del uso de otras concentraciones de plaquetas preparadas con métodos conocidos.

[0079] Las composiciones obtenidas mediante el método de acuerdo al invento son particularmente útiles en la preparación de elementos farmacéuticos para la promoción y/o el inicio de sanación de heridas y/o la regeneración de tejidos o para la preparación de composiciones cosméticas para la regeneración de la piel, tal como, para reducir arrugas de la piel, el acné (especialmente después del tratamiento de demoabrasión), cicatrices pequeñas de la rubéola o de la varicela, vitiligo y lipoatrofia (por ejemplo, composiciones anti-envejecimiento y composiciones de regeneración de la piel).

[0080] Las composiciones obtenidas mediante el método de este invento podrían administrarse localmente o inyectarse en la herida, o en, o cerca de, el órgano injertado o pueden inyectarse subcutáneamente. La administración local podría ser mediante inyecciones en el lugar de la lesión o del defecto o mediante inserciones o adhesiones con un portador sólido en el lugar en cuestión, o mediante la mezcla y agregación a cremas o emulsiones, o mediante la inclusión en un tejido o papel o portador tipo hidrogel, o mediante la aplicación directa y tópica de la composición obtenida mediante el método del invento, tal como, en la forma de gotitas para los ojos. Preferiblemente, las composiciones pueden utilizarse en composiciones para jeringas. La modalidad de administración, la dosis administrada, la modalidad de dosis únicas o múltiples, a un individuo, variará dependiendo de una variedad de factores, incluyendo las propiedades farmacocinéticas, las condiciones y características del paciente (género, edad, masa corporal, salud, tamaño), la magnitud de los síntomas, la existencia de tratamientos concurrentes, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado.

[0081] Las composiciones obtenidas mediante el método de este invento podrían administrarse en combinación con un co-agente útil para el tratamiento de la regeneración de tejidos tal como un agente sanador, un llenador de arrugas, un agente anti-envejecimiento, tal como, el complejo vitamínico anti-envejecimiento, un agente antibacteriano, un agente antibiótico, un agente corticoesteroide, un agente antiálgico y analgésico, un agente anestésico como la adrenalina, etcétera. Las composiciones obtenidas mediante el método del invento podrían combinarse con un co-agente útil para el tratamiento de la regeneración de tejidos para su uso simultáneo, por separado o secuencial en la terapia de regeneración de tejidos tal como, la sanación de heridas, la reparación del crecimiento óseo y periodontal, etc.

[0082] Las composiciones obtenidas mediante el método del invento, los procedimientos para la preparación de concentraciones autólogas de plaquetas o composiciones celulares del invento son particularmente útiles para usos terapéuticos, particularmente como pegamento biológico autógeno en un sistema hemostático que tiene el propósito de acelerar el proceso fisiológico o la regeneración de tejidos, por ejemplo, en implantes dentales, en cirugía de la piel y de los huesos, en cirugía de cartílagos y tendones, en la regeneración de la córnea y de nervios periféricos y en cirugías cardíacas. Las composiciones obtenidas mediante el método del invento, los procedimientos para la preparación de concentraciones autólogas de plaquetas y las composiciones celulares del invento son particularmente útiles para su uso cosmético, particularmente, materiales autógenos de rejuvenecimiento que tienen la intención de utilizarse, por ejemplo, como rellenos de arrugas, de cicatrices o en deficiencias grasa, individualmente o en combinación con por lo menos un agente anti-envejecimiento.

[0083] La concentración de plaquetas obtenida mediante el método del invento podría combinarse con una preparación autóloga de extractos celulares, tal como, por ejemplo, queratinocitos, células de la médula ósea, osteoblastos, condrocitos, fibroblastos, células del periostio, melanocitos y células de Langheran; células grasas; células de la médula ósea; células musculares tal como los mioblastos y células satelitales; células de la membrana del periostio; células de la córnea; células de cordones umbilicales; células de tendones o células del islote pancreático. Los queratinocitos pueden cosecharse a través de un método descrito por Reinwald y Green, 1975, Cell (Célula), 6(3):331-43. Otras células mencionadas pueden cosecharse mediante los métodos descritos en "Culture de cellules animales; methodologies-applications (metodologías-aplicaciones)", 2003, Ed. Barlovatz-Meimom y Adolphe, INSERM editions, París. Alternamente, los extractos celulares se derivan de un banco celular o de un cultivo celular o se cosechan tal como se describe en ejemplos más adelante.

[0084] La concentración de plaquetas y las composiciones celulares obtenidas mediante el método del invento demostraron ser realmente beneficiosas para la aceleración y/o la promoción del proceso de sanación de heridas, inclusive heridas crónicas que no sanan, conllevando a conclusiones exitosas en casos en los cuales semanas de terapias convencionales fallaron y estos métodos lograron una reducción en el riesgo de infecciones, una mejora en la recuperación y comodidad del paciente, una reducción de costos de atención médica y un mejor resultado estético final.

[0085] Las composiciones obtenidas mediante el método del invento pueden, desde luego, también prepararse a partir de plasma derivado de algunos donantes identificados. El invento no se limita a materiales biológicos autólogos, tales como, la recaudación de plaquetas concentradas del material biológico propio de la persona herida. El invento abarca el uso de materiales biológicos obtenidos de una o más terceras partes, que no necesitan ser de la misma especie, puesto que el paciente que está recibiendo tratamiento con la composición sanadora de heridas aquí descrita, a menos que exista una bio-incompatibilidad, podría usar materiales biológicos de una tercera parte.

[0086] En una implementación, el invento presenta a un proceso para la preparación de una composición de un concentrado de plaquetas o una composición celular tal como se describe en la reivindicación 1.

[0087] En otra implementación, se presenta en este documento a un dispositivo para la preparación de una composición de una concentración de plaquetas a partir de sangre completa tal como se describe en este documento.

[0088] En una implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una

composición con una concentración de plaquetas donde el paso de centrifugación se realiza con una fuerza de entre alrededor de 1500 g y hasta alrededor de 1700 g durante un periodo seleccionado que va desde alrededor de 3 minutos hasta alrededor de 15 minutos, preferiblemente a 1500 g durante alrededor de 8 minutos.

5 **[0089]** En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición con un concentrado de plaquetas donde el tubo separador tiene una entrada para introducir a dicha sangre completa, se mantiene al vacío para aspirar a la muestra de sangre completa, es estéril, tiene un vacío usable de 8 a 10 ml y es adecuado para la centrifugación que se está llevando a cabo.

10 **[0090]** En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición con una concentración de plaquetas donde el tubo separador es de tereftalato de polietileno que contiene un gen altamente tixotrópico formado por una mezcla polimérica y un citrato de sodio anhídrido a 3.5 miligramos/mililitro.

15 **[0091]** En otra implementación, se presenta en este documento a una composición aislada con una concentración de plaquetas que se obtiene del proceso de acuerdo al invento.

[0092] En otra implementación, se presenta en este documento a una composición aislada con una concentración de plaquetas que comprende a:

- 20 a) plasma;
- b) plaquetas con una concentración de por lo menos 300×10^9 células/litro, preferiblemente de por lo menos 350×10^9 células/litro, más preferiblemente de por lo menos 400×10^9 células/litro;
- 25 c) glóbulos blancos con una concentración de por lo menos 7.0×10^9 células/litro, preferiblemente de por lo menos 8.0×10^9 células/litro;
- 30 d) fibrinógeno a una concentración de por lo menos 3 mg/litro; y donde la concentración de eritrocitos es menor que 0.6×10^{12} células/litro, preferiblemente menos que 0.5×10^{12} células/litro.

[0093] En otra implementación, se presenta en este documento a una composición sanadora de heridas o tejidos que comprende a:

- 35 a) plasma;
- b) plaquetas a una concentración de por lo menos 300×10^9 células/litro, preferiblemente de por lo menos 350×10^9 células/litro, más preferiblemente de por lo menos 400×10^9 células/litro;
- 40 c) glóbulos blancos con una concentración de por lo menos 7.0×10^9 células/litro, preferiblemente de por lo menos 8.0×10^9 células/litro;
- d) fibrinógeno con una concentración de por lo menos 3 mg/litro;
- 45 e) un activador de coagulación con una tasa de volumen (concentración de plaquetas: activador de coagulación) de alrededor de 10:1 a alrededor de 10:3;
- f) opcionalmente un extracto celular autólogo, tal como un extracto de queratinocitos, de células de la médula ósea, de fibroblastos, de células del periostio, de melanocitos y de células de Langheran; células grasas; células de la médula ósea; células musculares tales como mioblastos y células satelitales; osteoblastos;
- 50 condrocitos; células de la membrana del periostio; células de la córnea; células de cordones umbilicales; células de tendones o células de islotes pancreáticos; y donde la concentración de eritrocitos es menor que 0.6×10^{12} células/litro, preferiblemente menos que 0.5×10^{12} células/litro.

55 **[0094]** En otra implementación, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición sanadora de heridas o de tejidos tal como se describe en este documento.

[0095] En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición sanadora de heridas o de tejidos donde el activador de coagulación contenido es un 10% de cloruro de calcio.

60 **[0096]** En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición sanadora de heridas o de tejidos donde el activador de coagulación que se mezcló bajo el paso b) es una preparación enriquecida con trombina. Un método para preparar a la trombina para su uso en un pegamento biológico se describe en US 6,472,162 mediante la adición de un 8 a un 20% de ETOH a un volumen de plasma y esta preparación puede utilizarse como una preparación enriquecida con trombina. Alternamente, un suero autólogo de trombina (ATS – autologous thrombin serum) puede usarse como una preparación enriquecida con trombina. Un

65

- 5 suero autólogo de trombina, de acuerdo a la presentación, se obtiene mediante un proceso que comprende (i) la adición a una muestra de sangre completa del paciente (por ejemplo, 8 ml) recaudada en un tubo separador de la presentación, un 10% del volumen final de cloruro de calcio 10% (por ejemplo, 1 ml) y un 10% del volumen final de la preparación de un 95% (volumen) de una solución de etanol (por ejemplo, 1 ml) y (ii) una precipitación durante
 10 alrededor de 30 minutos a la temperatura del cuarto. Después de 30 minutos, una centrifugación de alrededor de 1500 g durante alrededor de 8 a 10 minutos. En una implementación adicional preferida, la preparación enriquecida con trombina y preferiblemente el suero autólogo de trombina se mezclan bajo el paso b) directamente en la herida.
- 15 **[0097]** En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición sanadora de heridas o de tejidos donde un paso adicional b') en el cual la composición activada con una preparación rica en plaquetas (obtenida mediante la mezcla y adición de la concentración de plaquetas con dicho activador de coagulación) obtenida en el paso b) podría estar parcialmente deshidratada por el contacto de un vendaje de heridas cubierto por una capa hidrofóbica suave para evitar la contaminación con hilos microscópicos del vendaje para obtener un gel semi-sólido que puede manipularse mediante instrumentos apropiados, por ejemplo,
 20 para llenar una cavidad o una deficiencia de tejidos, o como una matriz de crecimiento ("soporte") mientras se espera por la reconstitución de la matriz autógena extracelular. El sanador de heridas o de tejidos obtenido es particularmente útil en un método para inducir una regeneración periodontal en una herida, en un tejido con un defecto periodontal o en una caries.
- 25 **[0098]** En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición sanadora de heridas o de tejidos o una composición celular donde el extracto celular es uno de queratinocitos.
- 30 **[0099]** En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición sanadora de heridas o de tejidos o una composición celular donde el extracto celular es un extracto autólogo de queratinocitos.
- 35 **[0100]** En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición sanadora de heridas o de tejidos o una composición celular donde el extracto celular es un extracto de células del músculo esquelético, tal como, células progenitoras de músculo o células madre satelitales.
- 40 **[0101]** En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición sanadora de heridas o de tejidos o una composición celular donde el extracto celular es un extracto de fibroblastos.
- 45 **[0102]** En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición sanadora de heridas o de tejidos o una composición celular donde el extracto celular es un extracto de adipocitos.
- 50 **[0103]** En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición sanadora de heridas o de tejidos o una composición celular en la cual el extracto celular es un extracto de condrocitos.
- 55 **[0104]** En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición sanadora de heridas o de tejidos o una composición celular donde el extracto celular es un extracto de células madre tales como células madres del cordón umbilical.
- 60 **[0105]** En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición sanadora de heridas o de tejidos o una composición celular en la cual el extracto celular es un extracto de células del tendón.
- 65 **[0106]** En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición sanadora de heridas o de tejidos o una composición celular en la cual el extracto celular es un extracto de células de la membrana del periostio o de células gingivales.
- [0107]** En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición sanadora de heridas o de tejidos o una composición celular en la cual el extracto celular es un extracto de las células de la córnea.
- [0108]** En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición sanadora de heridas o de tejidos o una composición celular donde el extracto celular es un extracto de células de la médula ósea.
- [0109]** En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición sanadora de heridas o de tejidos o una composición celular en la cual el extracto celular es un extracto de células de obleoblastos.

[0110] En otra implementación adicional, se presenta en este documento un proceso para la preparación de una composición sanadora de heridas o de tejidos o una composición celular donde el extracto celular es un extracto de células de Schwann.

5 **[0111]** En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición sanadora de heridas o de tejidos o una composición celular donde el extracto celular es un extracto de células de islotes pancreáticos.

10 **[0112]** En otra implementación adicional, la composición aislada con un concentrado de plaquetas, la composición sanadora de heridas o de tejidos, el suero enriquecido con trombina y/o el extracto celular del invento son autólogos.

[0113] En un aspecto adicional, esta presentación suministra un botiquín adaptado para la regeneración de tejidos de acuerdo a la presentación donde el botiquín comprende además a matraces separados que contienen a ETOH y a CaCl₂, a sostenedores de jeringas, acumuladores y un aplicador de vertimiento con una salida dual.

15 **[0114]** En un aspecto adicional, se presenta en este documento a un botiquín adaptado para la regeneración de tejidos de acuerdo a la presentación que comprenden a 2 ampollas estériles:

20 (1) una ampolla que comprende a accesorios para la flebotomía, a tubos separadores de la presentación, a matraces de ETOH y de CaCl₂ para la preparación de un suero autólogo de trombina; y

(2) una 2ª ampolla que contiene accesorios para 2 sostenedores de jeringas y un acumulador, y un aplicador de vertimiento con una salida dual.

25 **[0115]** En otra implementación, se presenta en este documento un proceso para la preparación de una composición celular de acuerdo al invento donde el extracto celular suministrado bajo el paso d) o e) se obtiene mediante un proceso que comprende a los pasos de:

(A) suministrar a dichas células en una concentración de plaquetas de acuerdo al invento;

30 (B) cultivar opcionalmente a las células;

(C) re-suspender a las células cultivadas obtenidas bajo el paso (B) en un concentrado de plaquetas de acuerdo al invento.

35 **[0116]** En una implementación adicional, se presenta en este documento un proceso para la preparación de una composición celular de acuerdo al invento donde la expansión celular bajo el paso (A) se realiza en una concentración de plaquetas de acuerdo al invento de tal forma que la concentración final de las plaquetas contenidas comprende desde alrededor del 5% a alrededor del 40% del volumen del medio cultivado.

40 **[0117]** En otra implementación, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición de acuerdo al invento donde el paso de cultivo celular (B) comprende a por lo menos un paso de colocación en placas a las células, por ejemplo, en una superficie de cultivo celular tal como la placa de Petri o un matraz de cultivos.

45 **[0118]** En otra implementación adicional, se presenta en este documento un proceso para la preparación de una composición celular de acuerdo al invento que comprende a por lo menos un paso adicional de cosechar las células después del paso del cultivo celular (B).

[0119] En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición celular de acuerdo al invento donde el paso de cultivo celular (B) se realiza a 37 °C.

50 **[0120]** En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición celular de acuerdo al invento donde el paso de cultivo celular (B) se realiza bajo un flujo de gas que comprende a oxígeno o a aire y dióxido de carbono, comúnmente, el flujo de gas comprende un 95% de oxígeno o aire y un 5% de dióxido de carbono.

55 **[0121]** En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición celular de acuerdo al invento, donde el paso de cultivo celular (B) dura alrededor de 3 a 4 semanas.

60 **[0122]** En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición celular de acuerdo al invento en el cual durante el paso del cultivo celular (B), el medio de cultivo celular se cambia regularmente durante la incubación, comúnmente, alrededor de cada 3 días.

65 **[0123]** En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición celular de acuerdo al invento donde el paso de cultivo celular (B), comprende a por lo menos un paso de exposición de las células a luz visible, comúnmente, a alrededor de 633 nm, durante alrededor de 10 minutos. En otro aspecto, el paso de exposición a una luz visible se repite una vez a la semana durante la incubación celular.

- 5 [0124] En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición celular de acuerdo al invento donde la composición celular es una composición celular de queratinocitos o fibroblastos y el paso de cultivo celular (B), comprende a por lo menos un paso de exposición de las células a luz visible, comúnmente a alrededor de 633 nm, durante alrededor de 10 minutos. En otro aspecto, el paso de exposición a luz visible se repite una vez a la semana durante la incubación celular.
- 10 [0125] En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición celular de acuerdo al invento, donde el paso de cultivo celular (B), comprende a por lo menos un paso de adición de un concentrado de plaquetas diluidas de acuerdo al invento, tal como la concentración final en plaquetas que comprende de entre alrededor de 5% a alrededor del 40% del volumen del medio de cultivo.
- 15 [0126] En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un proceso para la preparación de una composición celular de acuerdo al invento, donde, la composición celular es una composición celular de queratinocitos o fibroblastos y el paso de cultivo celular (B), comprende a por lo menos un paso de adición de un concentrado de plaquetas diluidas de acuerdo al invento, de tal forma que, la concentración final en las plaquetas comprende entre alrededor del 5% a alrededor del 40% del volumen del medio de cultivo.
- 20 [0127] En otra implementación, esta presentación suministra a una composición celular aislada que puede obtenerse de un proceso de acuerdo a la presentación.
- [0128] En otra implementación, se presenta en este documento a una composición celular aislada, donde la composición celular aislada es una composición de células grasas tales como una composición celular de adipocitos.
- 25 [0129] En otra implementación, se presenta en este documento a una composición celular aislada, donde la composición celular aislada es una composición celular muscular tal como una composición de células de mioblastos o de células madre satelitales.
- 30 [0130] En otra implementación, se presenta en este documento a una composición celular aislada, donde la composición celular aislada es una composición de células de la córnea.
- [0131] En otra implementación, se presenta en este documento a una composición celular aislada, donde la composición celular aislada es una composición de células del cartílago, tales como una composición de células de condrocitos.
- 35 [0132] En otra implementación, se presenta en este documento a una composición celular aislada, que es una composición de células de la piel, tal como una composición de células de fibroblastos o de células de queratinocitos.
- 40 [0133] En otra implementación, se presenta en este documento a una composición celular aislada, que es una composición de células de la membrana del periostio o de células gingivales.
- [0134] En otra implementación, se presenta en este documento a una composición celular aislada que es una composición de células del tendón.
- 45 [0135] En otra implementación, se presenta en este documento a una composición celular aislada que es una composición de células madre, tal como una composición de células madre de cordones umbilicales.
- [0136] En otra implementación, se presenta en este documento a una composición celular aislada, donde la composición celular aislada es una composición de células de la médula ósea.
- 50 [0137] En otra implementación, se presenta en este documento a una composición celular aislada, que es una composición de células de Schwann.
- [0138] En otra implementación, se presenta en este documento a una composición celular aislada, que es una composición celular de islotes pancreáticos.
- 55 [0139] En otra implementación, se presenta en este documento a una composición celular aislada, que es una composición celular de osteoblastos.
- 60 [0140] En otra implementación, se presenta en este documento a una composición celular aislada, donde las células están a una concentración de alrededor de 3×10^5 a alrededor de 10^6 células/mililitro de plasma o de plasma enriquecido.
- 65 [0141] En otra implementación, se presenta en este documento a composiciones, métodos y formas de uso para promover la regeneración de sellamiento de heridas y/o de tejidos y/o de huesos en una herida de un humano o de un animal inferior tal como se describe en este documento.

[0142] en otra implementación adicional, se presenta en este documento a composiciones, métodos y modos de uso para promover la regeneración de sellamiento de heridas y/o tejidos y/o huesos en una herida de un mamífero, preferiblemente un humano.

5 [0143] En otra implementación, se presenta en este documento a composiciones, métodos y formas de uso para inducir la regeneración periodontal en una herida o en un defecto periodontal de un mamífero con una enfermedad periodontal u otra condición tal como se describen este documento.

10 [0144] En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un método para inducir la regeneración periodontal en una herida o en un defecto periodontal o en una carie de un mamífero con una enfermedad periodontal u otra condición, y donde, dicho mamífero es un humano.

15 [0145] En otra implementación adicional, se presenta en este documento a un método para inducir la regeneración periodontal en una herida con un defecto periodontal o en una cavidad de acuerdo a la presentación, donde, dicho monto terapéuticamente efectivo de dicha composición sanadora de heridas o de tejidos se aplica en una forma de un gel semisólido o una matriz de crecimiento a dicha herida o dicho defecto periodontal o cavidad tal como se describe, por ejemplo, en Garg et al., 2000, Dental Implantology Update (actualización de implantología dental), 11(6), 41-44.

20 [0146] En otra implementación, se presenta en este documento a un método para promover la regeneración de tejidos de la piel en una cicatriz o en una arruga tal como se describe en este documento.

25 [0147] En otra implementación, se presenta en este documento a un método para inducir la regeneración del miocardio de acuerdo a la presentación, donde dicho monto terapéuticamente efectivo de dicha composición de células musculares de acuerdo a la presentación se inyecta al miocardio, comúnmente, en el miocardio del ventrículo izquierdo. La inyección puede realizarse como inyección directa o como una inyección de varios catéteres. Las células de mioblastos o las células satelitales pueden diseñarse ex vivo tal como se describe en este documento en una estructura des-epitalizada de amnios biológicos humanos y biocompuesta, tal como una capa en esta descripción. Los amnios se suturan entonces al epicardio isquémico para repoblar el tejido subyacente con células madre, para mejorar el poder de contracción de la pared ventricular y de los miocitos.

30 [0148] En otra implementación, se presenta en este documento a un método para inducir una regeneración del miocardio de acuerdo a la presentación, donde, dicho monto terapéuticamente efectivo de dicha composición celular muscular de acuerdo a la presentación se inyecta al miocardio, junto con un monto terapéuticamente efectivo de una composición celular de fibroblastos de acuerdo a la presentación de tal forma que el índice fibroblastos/mioblastos es de alrededor del 30:70.

35 [0149] En otra implementación, se presenta en este documento a un método para inducir la regeneración del miocardio de acuerdo a la presentación, donde dicho monto terapéuticamente efectivo de dicha composición celular muscular, de acuerdo a la presentación, se aplica en la superficie ventricular en la forma de un parche amniótico que se incuba, preferiblemente, a una composición de células madre de mioblastos y de células satelitales de acuerdo a la presentación.

40 [0150] En otra implementación, se presenta en este documento a un método para inducir una regeneración de la córnea de acuerdo a la presentación, donde dicho monto terapéuticamente efectivo de dicha composición de células de la córnea, de acuerdo a la presentación, se aplica al tejido de la córnea en forma de un parche amniótico, preferiblemente distribuido en un lente de contacto que puede disolverse.

45 [0151] Dicho método para tratar una herida, un tejido o una enfermedad podría incluir el uso de cualquiera de las composiciones aquí descritas; también podría incluir el uso de cualquier composición hecha por cualquiera de los métodos aquí descritos.

50 [0152] El método de acuerdo al invento presenta las ventajas de suministrar una forma efectiva en cuanto tiempo y relativamente barata para obtener concentrados de plaquetas en una sola operación que es fácil de implementar y que se adapta a una aplicación en un punto de atención médica. El método del invento presenta la ventaja que aparte de conllevar a preparaciones enriquecidas donde las plaquetas están concentradas con una producción alta que no puede obtenerse mediante métodos conocidos, y también el contenido de eritrocitos es mucho más bajo que aquellos niveles obtenidos con métodos conocidos para la preparación de PRP. Las composiciones obtenidas mediante el método del invento tienen la ventaja de producir un contenido más alto de plaquetas, un contenido más bajo de eritrocitos que los PRPs obtenidos mediante métodos conocidos y con propiedades completamente mantenidas para su uso terapéutico subsiguiente in vivo. Más específicamente, la capacidad de las plaquetas para liberar a los principales factores de crecimiento involucrados en la regeneración de tejidos (PDGF, TGF- β , IGF, VEGF y EGF) a niveles que se mantienen estables durante algunos días (o la vida útil de 7-10 días de los trombocitos).

Adicionalmente, si las composiciones obtenidas mediante el método del invento se producen de sangre autóloga, el invento aquí descrito reduce los riesgos de transmisión de enfermedades y de inmuno-reacciones asociadas con el uso del tratamiento de materiales hechos de sustancias biológicas obtenidas de una o más terceras partes.

5 **[0153]** El método del invento, suministra, por lo tanto, un material biológico de regeneración de tejidos y de sanación de heridas, preferiblemente autólogo, que promueve la regeneración de tejidos, tales como, la piel, el cartílago y los huesos, especialmente promueve la cicatrización y/o el rejuvenecimiento. Los beneficios del invento comprenden a un método simple y rápido para la preparación de materiales mejorados, para la regeneración de tejidos y para la sanación de heridas, adaptados a servicios en puntos de atención y que han demostrado reducir el tiempo de sanación, el dolor asociado y los costos médicos. Además, los materiales mejorados de sanación de heridas y de regeneración de tejidos reducen los riesgos de rechazo de injertos y mejoran los índices de éxito de injertos. Además, los materiales mejorados de sanación de heridas y de regeneración de tejidos conllevan a que el aspecto final estético de las cicatrices sea mucho mejor y que el relleno de cicatrices y arrugas sea mucho más durable.

15 **[0154]** Comúnmente, los extractos celulares se obtienen de una biopsia de tejidos que se realiza preferiblemente el día antes de la mezcla con el concentrado de plaquetas bajo el paso a). El tamaño de las biopsias se adapta al propósito terapéutico en cuestión y a los tipos celulares utilizados en la preparación de la composición celular de acuerdo a la presentación. Ejemplos de biopsias se presentan en los ejemplos a continuación para diferentes tipos de tejidos.

20 **[0155]** Ejemplos que ilustran al invento se describirán a partir de este momento en este documento en una forma más detallada y mediante referencias a las secciones presentadas en las figuras.

EJEMPLOS

25

Las siguientes abreviaciones se refieren respectivamente a las definiciones a continuación:

30 **[0156]** **ATS** (autologous thrombin serum - suero autólogo de trombina); **BU** (Baxothrobin unit - unidad de Baxotrobina); **DMEM** (Dulbecco's minimum essential médium - medio esencial mínimo de Dulbecco); **DMSO** (Dimethyl Sulfoxide – sulfóxido de dimetilo); **EC** (Enriched clot - coaguló enriquecido); **FCS** (fetal calf serum - suero fetal de ternero); **HT** (healing time - tiempo de sanación); **IU** (International Unit - unidad internacional); **PBS** (Phosphate Buffered Saline - sustancia salina amortiguada de fosfato); **PET** (polyethylene terephthalate – tereftalato de polietileno); **PRP** (platelet- rich plasma - plasma rico en plaquetas); **PPP** (platelet-poor plasma - plasma con niveles bajos de plaquetas); **USP** (United States Pharmacopoeia - Farmacopea de Estados Unidos); **cm** (centímetro); **dL** (decilitro); **g** (gramo); **Gy** (gray - gris); **J** (Joule – Julio); **L** (litro); **min** (minuto); **mm** (milímetro); **M** (molar); **mL** (mililitro); **nm** (nanometro); **rpm** (revolución por minuto); **Vol.** (volumen).

PROCEDIMIENTOS Y CONDICIONES GENERALES

40 **[0157]** Para determinar la efectividad de las composiciones obtenidas mediante el método del invento para promover la sanación de heridas y/o huesos y/o la regeneración de tejidos, se realizaron los siguientes experimentos.

45 **[0158]** Se recaudaron muestras de sangre humana completa en un tubo separador. Un tubo separador para el uso en un método de acuerdo al invento es, por ejemplo, un tubo de vidrio de aproximadamente 15 ml (16 mm de diámetro y 130 mm de largo) que contenía a 3 ml de gel tixotrópico que se basa en poliéster, así como 1 ml de una solución de citrato de sodio a 0.1 M y que contiene un vacío usable de alrededor de 8.5 mililitros. Éste tubo separador constituye a un dispositivo listo para utilizarse para la preparación de una composición de concentrado de plaquetas por medio del método del invento (también llamado RegenTHT™ (Tubo Cosechador de Trombocitos) de Regen Lab, Suiza).

50 **[0159]** Otro ejemplo de un tubo separador para su uso en el método del invento es un tubo de aproximadamente 10 mm en PET (polyethylene terephthalate – tereftalato de polietileno) que contiene 1 ml de un gel tixotrópico que contiene a una mezcla polimérica y a citrato de sodio anhídrido depositado en la superficie interior del tubo el cual fue untado mediante aerosol (alrededor de 3.5 miligramos por mililitro de sangre) y que contiene un vacío usable de, o de alrededor de, 8 ml, el cual constituye un dispositivo listo para utilizarse para la preparación de un concentrado de plaquetas (también llamado RegenBCT™ (Blood Cell Therapy - Terapia de Células Sanguíneas) de Regen Lab, Suiza).

55 **[0160]** Éstos tubos se esterilizan mediante irradiaciones (tal como se prescribe por ISO 11137, UNI EN ISO 11737-2, UNI EN 552, UNI EN 556) y se sellan herméticamente mediante una tapa tradicional tal como un tapón de caucho convencional de bromobutilo moteado para el tubo de vidrio y un tapón de clorobutilo que tiene un cobertor de polietileno para la seguridad del operador.

60 **[0161]** Entonces, el tubo separador se centrifuga a alrededor de 1500 g a alrededor de 2000 g durante alrededor de 3 a 10 minutos, es decir, a alrededor de 2500 revoluciones por minuto hasta alrededor de 3800 revoluciones por minuto con una centrifugación con un rotor oscilante, que tiene un radio de 20 cm. En caso de que un equipo

65

centrifugador tenga un rotor con un ángulo fijo de alrededor de 45°, el tiempo de centrifugación debería durar, por lo menos, alrededor de 15 minutos.

5 **[0162]** Después de la centrifugación, el concentrado de plaquetas se recauda para su uso en aplicaciones terapéuticas o cosméticas de la presentación o para la preparación de composiciones adicionales que contienen el concentrado obtenido de plaquetas a través de la mezcla con agentes adicionales tales como extractos celulares, preferiblemente autólogos (por ejemplo, queratinocitos, fibroblastos, células de la médula ósea, osteoblastos, condrocitos, mioblastos, células de la córnea, células de Schwann, células grasas, células madre de cordones umbilicales, células de tendones, células de islotes pancreáticos, células de ligamentos y gingivales, células de la membrana del periostio) y/o sustitutos óseos y/o activadores de la coagulación.

[0163] Para las aplicaciones terapéuticas se utiliza un botiquín adaptado para la regeneración de tejidos (también llamado RegenKit™) que tiene a 2 ampollas estériles que comprenden a:

15 - Una ampolla (RegenPRP™) que comprende a accesorios para los tubos separadores de flebotomía de la presentación (RegenTHT™ o RegenBCT™), opcionalmente matraces de ETOH y de CaCl₂ para la preparación de un suero autólogo de trombina (RegenATS™).

20 - Una ampolla (RegenApplicator™) que tiene 2 jeringas (por ejemplo, de 1 ml y de 1 o 3 ml), sostenedores y sujetadores en un aplicador con una punta con una salida dual.

[0164] Para la preparación de la composición celular, se preparan a las células de acuerdo al protocolo general a continuación:

25 a) Biopsia

[0165] Una biopsia del tejido correspondiente se obtiene bajo condiciones estériles utilizando métodos estándar adaptados a la célula específica que se recolectará. Las células se utilizan extemporáneamente u opcionalmente después de la proliferación de cultivos ex-vivo y de la proliferación celular tal como se describe más adelante.

30 b) Cultivos ex vivo y la proliferación celular

[0166] Las células utilizadas para la preparación de composiciones celulares, tales como los queratinocitos, las células de la médula ósea, los fibroblastos; las células del periostio o de la córnea, tales como células madre corneales del limbo; melanocitos y las células de Langheran; células grasas, células musculares tales como los mioblastos y las células satelitales; osteoblastos, condrocitos; células del cordón umbilical; las células de Schwann; células de tendones o pancreáticas, se expanden en un medio portador de células (por ejemplo, DMEM o Ham) en placas (por ejemplo, placas de Petri o matraces de cultivo) cubiertas con un concentrado de plaquetas de acuerdo a la presentación, preferiblemente autólogo, enriquecido con fibronectina. El medio de cultivo podría enriquecerse preferiblemente con DMEM por ejemplo en el caso de queratinocitos. Para las células tales como los osteoblastos óseos los condrocitos y los mioblastos, es necesaria la digestión enzimática del tejido correspondiente en la presencia de 4 ejemplos de colagenasa o de tripsina antes de colocarlos en placas. La incubación de las placas se realiza a 37 °C bajo un flujo de gas de 95% de oxígeno o aire y el 5% de dióxido de carbono. Comúnmente, el tiempo de incubación varía entre los 10 y 20 minutos. La expansión celular podría incrementarse (tal como, por ejemplo, en el caso de mioblastos, fibroblastos y células de condrocitos).

[0167] Mediante fototerapia (por ejemplo, exposición a la luz a 633 nm durante alrededor de 10 minutos a 2J/centímetro cuadrado, una vez a la semana durante la fase de incubación).

50 **[0168]** Los explantes podrían cultivarse en placas de Petri o en matraces de cultivo utilizando técnicas de levantamiento de aire (Molnar et al., 1996, Tissue & Cell (Tejido y Célula), 28:547-556) y un método de interfaz de aire ((Meller et al., 2002, Br. J. Opht., 86, 463-471) con la mitad del explante expuesto al aire. El medio de cultivo se cambia regularmente durante la incubación, tal como cada 3 días. La expansión de las células en una modalidad de 2 dimensiones como monocapas planas, se obtiene, por ejemplo, para células de mioblastos, fibroblastos, y de condrocitos. Un patrón creciente de células en 3 dimensiones puede obtenerse, por ejemplo, para células de la córnea, de mioblastos, de fibroblastos, de condrocitos, de adipocitos y de queratinocitos, agregando una composición diluida con un concentrado de plaquetas de acuerdo a la presentación de alrededor del 5 a alrededor del 40% del volumen del plasma o del plasma enriquecido al medio de cultivo. Comúnmente, la adición de un concentrado autólogo diluido de plaquetas de acuerdo a la presentación se realiza 2 o 3 veces durante el tiempo de incubación. Un portador biológico de 3 dimensiones que se obtiene de esa forma permite mejorar a la matriz extracelular lo que resulta útil para la transferencia de células madres autólogas. Después de la incubación, las células son liberadas nuevamente de las placas con una digestión de tripsina suave que levanta las células permitiendo que se coloquen en peletes.

65 c) Calidad celular y revisión de seguridad

[0169] La viabilidad celular en la preparación celular que se obtiene de esa forma se revisa mediante un recuento de células en una forma microscópica, un recuento de flujo-citométrico junto con inmunquímica en marcadores de tejido mediante técnicas estándar. La viabilidad celular también se examina mediante tripano azul justo después de la liberación celular mediante tripsina. La seguridad de la preparación también se revisa a través de una revisión de contaminación mediante un ensayo microbiológico para excluir la contaminación con virus o bacterias y para evitar la transferencia de infecciones zoonóticas. La utilización de FCS se evita, evitando, de esa forma, la transmisión de la enfermedad de la vaca loca.

d) Administración de la preparación celular

[0170] La preparación celular obtenida como se mencionó anteriormente se coloca en una composición autóloga con un concentrado de plaquetas de acuerdo a la presentación como un vehículo portador de células antes de la entrega para el paciente. Entonces, la preparación celular obtenida, tal como se acaba de mencionar, se inyecta o se trasplanta al paciente. La modalidad de inyección o de trasplante debe adaptarse al tipo de células contenidas en la preparación celular de acuerdo a la presentación y al efecto terapéutico o estético deseado. Se dan más detalles en los ejemplos que se muestran.

[0171] más adelante acerca del método para la preparación y el uso de las composiciones celulares, más específicamente, dependiendo del tipo de células y del efecto terapéutico o estético deseado.

[0172] Las preparaciones de células de queratinocitos o de fibroblastos de acuerdo a la presentación podrían utilizarse fácilmente después de la recaudación o después del cultivo celular tal como se describió anteriormente. Sin embargo, las preparaciones celulares de acuerdo a la presentación se elaboran preferiblemente después del cultivo celular tal como se describió anteriormente.

[0173] Las preparaciones celulares presentan una mejor viabilidad y estabilidad (incluyendo la integridad de propiedades preservadas de células tales como la capacidad de sintetizar proteínas y de entrega de factores de crecimiento) que las células preparadas en un medio sin la composición autóloga con un concentrado de plaquetas de acuerdo a la presentación. Además, la proliferación celular obtenida de esa forma mejora: las células crecen más rápido (alrededor de 3 a 5 días más rápido) y son más densas en comparación a los medios de control y a los medios sin sueros. La ventaja del proceso para la preparación de una composición celular de acuerdo a la presentación es que el mismo medio autólogo se utiliza como un vector para cultivos celulares, para la preservación celular, para la inyección de células, para vectores para bio-estimulaciones celulares y para la regeneración de tejidos.

Ejemplo 1: preparación de un concentrado autólogo de plaquetas

[0174] Tubos separadores para su uso en el método del invento se prueban por anticipado para detectar si tienen una buena tolerancia, para detectar cualquier toxicidad y para detectar si no tienen mutagenicidad del gen tixotrópico de acuerdo a las normas ISO 10993-11, ISO 10993-10, ISO 10993-12 e ISO 10993-3.

[0175] Alrededor de 8,5 a alrededor de 10 ml de una muestra de sangre humana se recaudan dentro del tubo separador para su uso en el método del invento, donde la sangre se aspira. La mezcla se centrifuga aproximadamente a 3800 revoluciones por minuto durante 3,5 minutos. El plasma rico en plaquetas se recauda entonces.

[0176] El análisis del concentrado de plaquetas obtenido mediante el método del invento demostró que contiene de 2 a 4 veces los niveles normales de plaquetas y de factores de crecimiento, en comparación a un coágulo natural de sangre, mientras que mantienen niveles normales de fibrina y de fibrinógeno y virtualmente no contiene células de sangre (menos del 1% de hematocrito en comparación con el 35-50% en un coágulo normal de sangre y un 15-20% en plasma rico en plaquetas obtenido mediante métodos conocidos de preparación). El estudio muestra además la presencia de fibronectina proteínica de leucocitos lo cual demuestra que se conservan las propiedades de coagulación.

[0177] La composición del concentrado de plaquetas (también llamado RegenPRP™ de Regen Lab, Suiza) en comparación con sangre completa, plasma completo y plasma con niveles bajos de plaquetas se presenta en la tabla uno a continuación:

Tabla 1

Muestra	Glóbulos blancos (x 10 ⁹ /litro)	Glóbulos rojos (x 10 ¹² /litro)	Hemoglobina (gramos/decilitro)	Plaquetas (x 10 ⁹ /litro)
Sangre completa	6,6	4,43	13,5	269
Plasma completo	2,8	0,04	0,4	305
Plasma rico en plaquetas	14,2	0,57	2,1	570
Plasma con niveles bajos de plaquetas	0	0	0,1	116

[0178] El experimento se repitió en algunos pacientes y se observó que los concentrados obtenidos de plaquetas presentaron concentraciones reproducibles de plaquetas (por lo menos 300 x 10⁹ células/litro), glóbulos blancos (por lo menos 7,0 x 10⁹ células/litro), fibrinógeno (por lo menos 3 miligramos/litro) y eritrocitos (menos que 0,6 x 10¹² células/litro).

[0179] La producción de plaquetas obtenidas por el método del invento se midió (90-99%) y demostró que se incrementó drásticamente en comparación con las producciones de plaquetas (30-62%) obtenidas por medio de métodos conocidos de la preparación descrita en Marx et al., 2004, mencionada anteriormente.

Adicionalmente, se demostró a través de botiquines ELISA (R&D Systems, Inc.) y por medio de la respuesta a la activación de coagulación del concentrado de plaquetas obtenido mediante el método del invento, que la actividad de los factores de coagulación se conservaron: la concentración de dímeros D (productos que descomponen la fibrina), los marcadores conocidos de la activación de la coagulación, y el proceso de lisis son estables, y, por lo tanto, las propiedades de coagulación del concentrado de plaquetas no se debilitan por el proceso del invento.

Los niveles de los factores de crecimiento (PDGF, EGF, TGF-β y VEGF) del concentrado de plaquetas obtenido mediante el método del invento son estables, en una forma demostrable, durante por lo menos 72 horas (4 días) cuando se almacenan a la temperatura del cuarto en un tubo separador estéril para su uso en los métodos del invento. La evolución de los factores de crecimiento PDGF BB, EGF y VEGF durante 72 horas se presenta en la figura 1.

[0180] Las propiedades del concentrado de plaquetas obtenido mediante un método de acuerdo al invento hace posible concebir la preparación de un concentrado de plaquetas obtenido utilizando el procedimiento del invento, uno a varios días antes de una cirugía reparativa, para reducir la carga de trabajo en la sala de operaciones y acelerar el procedimiento quirúrgico.

[0181] Para usos terapéuticos subsiguientes, el concentrado autólogo de plaquetas se mezcla, generalmente, con un activador convencional de coagulación tal como un activador de trombina (por ejemplo, cloruro de calcio, por ejemplo, el 10%), mezclado opcionalmente con un activador de fibrinógeno tal como la trombina, preferiblemente homóloga (por ejemplo, de 10 UI a 100 IU por mililitro de plasma), batroxobina (por ejemplo, 20 BU por mililitro de plasma) o una preparación enriquecida con trombina.

Ejemplo 2: uso terapéutico del concentrado autólogo de plaquetas obtenido mediante el método del invento

a) Pacientes:

[0182]

Se seleccionaron a 3 pacientes que presentaban heridas crónicas que no se sanaban:

- Un paciente de 88 años (paciente 1) que padecía de angiosarcoma de Kaposi en varias ubicaciones en las extremidades inferiores y una necrosis inducida por radioterapia en la pierna izquierda. La necrosis inducida por radioterapia resultó de tratamientos de radioterapia. 12 meses después del final del tratamiento de rayos equis de bajo voltaje, la necrosis consistía de una úlcera profunda súper infectada rodeada por una costra (35 x 25 mm). La herida fue tratada previamente sin ningún éxito con varios tratamientos tales como con esteroides y como cremas sanadoras.

- Un paciente de 81 años (paciente 2) que padecía de un carcinoma espinocelular del vértice que presentaba una ulceración cutánea (de alrededor de 10 mm de diámetro) con disqueratosis periférica sin ninguna señal de infección que resultó de una resección de una biopsia y una radioterapia postquirúrgica (dosis total de 52 Gy).

- Un paciente de 60 años (paciente 3) que recibió una irradiación prequirúrgica (7 Gy) para una síntesis de la tibia y de la fibula en la pierna derecha presentaba una necrosis inducida por radioterapia que consistía de una úlcera profunda (50 x 30 mm de diámetro) sin inflamaciones.

b) Tratamiento:

[0183] 8.5 mililitros de una muestra de sangre se toma de cada paciente y se centrifuga en un tubo separador tal como se describió en el ejemplo 1, de acuerdo a los protocolos descritos en el ejemplo 2. Los concentrados resultantes de plaquetas se mezclan entonces con cloruro de calcio a un 10% del volumen. Cada composición autóloga de concentrados de plaquetas se aplica entonces al lugar de la herida de epidemiditis radiológica del paciente respectivo. La herida se cubre y se protege entonces con compresas húmedas (día 1).

[0184] Entre los días 3 y 5, se revisa el estado de la herida y se cambia el vendaje de la herida. En el día 7 ± 1 se obtiene una nueva aplicación de una nueva preparación autóloga del concentrado mediante el método del invento. En efecto, la misma secuencia de tratamiento se sigue con los mismos intervalos de tiempo hasta la cicatrización completa de la herida.

b) Efectos sanadores:**[0185]**

Paciente 1: Sanado lento y regular de la úlcera. Cicatrización completa después de 189 días.

Paciente 2: Sanado muy rápido obtenido en 21 días.

Paciente 3: Sanado progresivo y regular. Cicatrización completa después de 41 días. Éstos resultados muestran el efecto beneficioso de la composición con un concentrado de plaquetas obtenido mediante el método del invento en úlceras crónicas inducidas por ondas de radio, incluso en los casos de aquellas que fueron resistentes a tratamientos tópicos previos en la ausencia de cualquier acción alérgica.

Ejemplo 3: Uso terapéutico del concentrado autólogo de plaquetas obtenido mediante el método del invento en combinación con un suero autólogo enriquecido con trombina

[0186] Para activar la coagulación, una alternativa a la mezcla del concentrado de plaquetas obtenido mediante el método del invento con un activador de trombina antes de su uso en un paciente, tal como se describió en el ejemplo 1, es la combinación del concentrado de plaquetas obtenido mediante el método del invento con un activador de fibrinógeno tal como una composición enriquecida con trombina y, preferiblemente, con un suero de trombina (por ejemplo, autólogo) de acuerdo al método del invento.

a) Preparación de un suero autólogo de trombina (ATS - autologous thrombin serum)

[0187] Un suero autólogo de trombina para utilizarse como una preparación enriquecida con trombina se elabora mediante un proceso que comprende la adición a la muestra de sangre completa de un paciente (por ejemplo, 8 ml) recaudada en un tubo separador para usarse en el método del invento tal como se describió en el ejemplo 1, una solución con un 95% del volumen de etanol (por ejemplo, 1 ml) y cloruro de calcio 10% (por ejemplo, 1 ml) a la mezcla (también llamada RegenATS™ de Regen Lab, Suiza) se le permite precipitarse durante alrededor de 30 minutos a la temperatura del cuarto. Después de 30 minutos, casi el 80% de la antitrombina (entre otras proteínas similares al fibrinógeno) se precipita; entonces el tubo se centrifuga a, alrededor de, 1500 g durante alrededor de 8 a 10 minutos y el suero autólogo de trombina está listo para usarse en combinación con el concentrado rico en plaquetas obtenido mediante el método del invento.

b) Preparaciones combinadas

[0188] Una originalidad de este proceso es que después del paso inicial de incubación del proceso de preparación del suero autólogo de trombina (por ejemplo, de por lo menos alrededor de 30 minutos), los tubos separadores para su uso en el método del invento que contiene respectivamente a la preparación autóloga de suero de trombina y a la preparación del concentrado de plaquetas pueden centrifugarse simultáneamente para obtener a 2 preparaciones de extractos sanguíneos listas para utilizarse al mismo tiempo.

c) Uso combinado

[0189] Para permitir la polimerización de fibrinógeno a una malla de fibrina (lo cual ocurre durante el proceso de coagulación) para que ocurra únicamente en el momento de la aplicación de la preparación rica en plaquetas a la herida, la composición del concentrado de plaquetas y el suero autólogo de trombina (activador de coagulación) se aplican simultáneamente con un índice de volumen de alrededor de 10:1 a alrededor de 10:3 (el índice de concentrado en relación al activador de coagulación) a la herida.

[0190] La entrega simultánea de ambas preparaciones se logra, por ejemplo, mediante un dispositivo que comprende a 2 jeringas (por ejemplo, una jeringa de 10 ml para la composición de concentrado de plaquetas y una

jeringa de 1 o 3 ml para el suero de trombina), que liberan a las preparaciones simultáneamente para que se mezclen y se polimericen cuando entren en contacto con la herida.

Ejemplo 4: uso terapéutico del concentrado autólogo de plaquetas obtenido mediante el método del invento en combinación con un extracto de células de la piel

[0191] Un total de 35 pacientes que recibieron anteriormente injertos de piel (que representaba menos del 15% de la superficie de la piel) se incluyeron en el estudio. Se excluyeron a pacientes tratados con inmunosupresores o corticoides o con insuficiencia renal o a artropatía periférica. Todas las siguientes manipulaciones se realizaron bajo reglas estrictas de asepsia y esterilidad.

Grupo A: 13 pacientes

a) Preparación del concentrado de plaquetas

[0192] Una muestra de 8,5 mililitros de sangre completa de cada paciente (de una extremidad superior donde no existían perfusiones) se recaudaron en un tubo separador para su uso en el método de acuerdo al invento. El tubo separador con la sangre completa se centrifuga inmediatamente durante alrededor de 8 minutos a 2800 revoluciones por minuto. Antes de que se recaude al plasma enriquecido (PRP), el operador descarta la mitad o 2 ml del sobrenadante y vuelve a suspender las plaquetas en el plasma remanente. El concentrado rico en plaquetas se transfiere entonces a un tubo estéril y se mantiene a una temperatura de 37 °C.

b) Recubrimiento de las heridas

[0193] El concentrado autólogo de plaquetas obtenido mediante el método del invento (también denominado RegenPRP™) se mezcla con una solución de doruro de calcio 10% a una tasa de 10:1 y el lugar donante del injerto (donde se removió la piel) de cada paciente respectivo se recubre con la mezcla autóloga correspondiente para obtener la coagulación del concentrado de plaquetas en la herida.

Grupo B: 8 pacientes

a) Muestras de células de la piel en el paciente

[0194] Se extraen queratinocitos de cada uno de los pacientes de este grupo. Una muestra delgada de piel saludable (de alrededor de 2 cm²) se remueve de cada paciente y se lava 3 veces en una solución de PBS. La biopsia lavada se deposita entonces en una placa de Petri que contiene tripsina y se corta en fragmentos muy pequeños (0,5 centímetros x 0,5 centímetros) con un bisturí. Los fragmentos de piel se incuban entonces durante 45 minutos a 37 °C en un dispositivo agitador en un 20% del volumen de una composición autóloga de concentrado de plaquetas obtenidas mediante el método de acuerdo al invento, también denominada RegenPRP™ que se consiguió anteriormente. El sobrenadante se recauda, se centrifuga y las células se re-suspenden en una solución de PBS. El recuento de queratinocitos se determina bajo microscopio. Finalmente, los queratinocitos obtenidos se re-suspendieron en el concentrado autólogo de plaquetas obtenido mediante el método de acuerdo al invento (5-40% volumen) del paciente correspondiente.

b) Preparación del concentrado de plaquetas

[0195] El procedimiento es el mismo que para el grupo A.

c) Recubrimiento de heridas

[0196] La suspensión de queratinocitos (también llamada RegenExtracell™) se aplica tan pronto como sea posible (la preparación completa no debe exceder un día) en la herida en la misma forma que se describió en el caso del grupo A.

Grupo de control: 14 pacientes

[0197] El lugar donante del injerto de cada paciente de este grupo se recubre con una compresa no terapéutica (Jelonet®).

Mezcla aleatoria y tratamiento

[0198] En el bloque quirúrgico, después de la remoción de la piel insertada, el lugar donante se recubre con una compresa temporal empapada con una solución de adrenalina (una ampolla de 1 mg/mililitro de adrenalina diluida en 500 ml de NaCl a un 0.9 por ciento) y dependiendo de la tabla de mezcla aleatoria, el lugar del donante se trata de acuerdo a los 3 siguientes métodos: grupo 1 y 2: recubrimiento de la herida con la composición sanadora de heridas respectiva y el recubrimiento de la herida con una compresa no terapéutica (Jelonet®).

[0199] Grupo 3: Recubrimiento directo de la herida con una compresa no terapéutica (Jelonet®).

[0200] Las compresas son recubiertas entonces con bandas Kerlix® y bandas elásticas tales como "Velpeau".

Criterios de eficacia del tratamiento

[0201] La eficacia del tratamiento se evalúa de acuerdo a 3 criterios:

- El tiempo necesario para completar la cicatrización del lugar tratado (tiempo de sanación o HT – healing time - en días)

- La epitelización (evolución del progreso de cicatrización) medido en el día 5 después del tratamiento de acuerdo a 7 niveles:

0: ausente

1: ligero

2: moderado

3: importante

4-7: muy importante, niveles crecientes de importancia;

- El dolor evaluado en el día 5 después del tratamiento, por el paciente mismo, generalmente en el momento de cambio de compresas en una escala del 0 al 10 (0: sin dolor y 10: dolor extremo). La compresa se abre en el día 5 después de la cirugía para permitir la evaluación de la calidad del tratamiento y se cubre con nuevas compresas Jelonet® recubiertas con compresas secas. Las compresas se cambian entonces cada 2 días hasta que se completa la cicatrización. Cualquier efecto colateral o complicación médica se vigila durante toda la duración del proceso de cicatrización.

Resultados

[0202] Los resultados de los tratamientos para cada grupo de pacientes (grupo de control: C, grupo A: RegenPRP™, grupo B: RegenExtracell™) se presentan en la figura 2 en términos de tiempo de sanación en días (HT – healing time), dolor en el día 5 (P - pain) y epitelización en el día 5 (E). La línea de puntos indica el momento en que se cambia a la primera venda en el día 5.

[0203] El proceso de cicatrización se estimula claramente por el uso del concentrado de plaquetas obtenido mediante el método del invento en comparación con el grupo de control. La calidad de la cicatrización también es mejor en el caso del uso del concentrado de plaquetas obtenida mediante el método del invento. Adicionalmente, el dolor en el lugar donante se reduce dramáticamente en los casos en los que se utiliza el concentrado de plaquetas obtenido mediante el método del invento en comparación al grupo de control. Todos los efectos beneficiosos del concentrado de plaquetas obtenido mediante el método del invento se incrementan cuando se utiliza una mezcla de queratinocitos suspendidos en el concentrado de plaquetas obtenido mediante el método del invento.

El tiempo medio de sanación es de 7 días para el grupo tratado con un concentrado de plaquetas obtenido mediante el método del invento y 5 días cuando se suspenden queratinocitos en el concentrado de plaquetas en comparación a un promedio de 12 días en el grupo de control. La tolerancia fue excelente y no se detectaron efectos colaterales o alergias.

Esto demuestra que el concentrado de plaquetas obtenido mediante el método del invento, solo o combinado con queratinocitos, es muy eficaz para acelerar el proceso de sanación de heridas y además de reducir el dolor, reduce la reacción inflamatoria y mejora el aspecto final de la cicatriz.

[0204] Alternamente, usando el mismo proceso de disociación, se pueden colocar a células de la piel en una placa de Petri recubierta con la composición autóloga de concentrado de plaquetas obtenida mediante el método de acuerdo al invento, también llamada RegenPRP™, obtenida tal como se mencionó anteriormente y cultivada durante 2 a 5 días. Entonces, antes del injerto, la preparación obtenida de células de la piel podría esparcirse con aerosol en la herida, para preparar al sitio para una mejor integración biológica de las células implantadas, y una mejor expansión in vivo.

Ejemplo 5: Uso cosmético del concentrado autólogo de plaquetas obtenido mediante el método del invento

[0205] Una composición autóloga de concentrado de plaquetas se prepara tal como se describe en el ejemplo 1. 5

ml de esta composición de un concentrado de plaquetas (también llamada RegenACR™: (rejuvenecimiento de células autólogas) de RegenLab, Suiza) se inyecta subcutáneamente en una ranura de arruga como material de relleno de arrugas, en la misma forma que se hace comúnmente con otros rellenos de arrugas tales como el ácido hialurónico. La profundidad de la arruga se reduce progresivamente en las primeras semanas después del tratamiento y en el lugar de la inyección, se obtiene una regeneración muy clara del área con un resultado óptimo en 2 a 3 meses. En contraste con lo que se observó con otros materiales de relleno de arrugas, no se observó ninguna inflamación ni hinchazón en el lugar de la inyección y el beneficio es duradero en contraste con el ácido hialurónico que se reabsorbe biológicamente después de 4 a 6 meses.

[0206] Pueden utilizarse métodos conocidos para estudiar el efecto de composiciones autólogas de concentrado de plaquetas obtenidas mediante el método del invento en la profundidad de arrugas tal como una reconstitución tridimensional de alivio de la piel mediante perfilometría óptica (método de lápiz) (Grove et al., 1989, J. Am. Acad. Dermatol, 21: 631-7) o mediante microscopía láser en réplicas de silicona de la piel. Otro método consiste en una cuantificación in vivo de la superficie de la piel «evaluación superficial de la piel viva» o «SELS (Surface evaluation of living skin)» a través del análisis de imágenes en luz ultravioleta (Tronnier et al., 1997, Akt. Dermatol, 23 :290-295). Otro método para la evaluación superficial de la piel viva se basa en un sistema óptico con una cámara CCD que mide los 4 parámetros de la piel: aspereza, escamas, suavidad y arrugas (Fluhr et al., 1995, Akt. Dermatol, 21:151-156). La aumentación dérmica profunda puede evaluarse mediante ultrasonido, Demascar®, Dinamarca).

[0207] Otros ejemplos del uso del concentrado autólogo de plaquetas obtenido mediante el método del invento incluyen:

Mezclar y agregar al concentrado de plaquetas obtenida mediante el método de acuerdo al invento con una crema, preferiblemente una emulsión, antes de la aplicación a una herida, después de la cirugía o en piel sana. Durante el proceso de absorción, la preparación de plaquetas se unta en la piel mediante la crema o mediante una emulsión para amplificar el beneficio de hidratación y estimular biológicamente la regeneración o el rejuvenecimiento de la piel.

[0208] Usando un hidrogel similar a una preparación de Albugel (EP 1 543 846) de un 100% de albúmina o cualquier otro hidrogel resultante de la reticulación de albúmina y otro compuesto químico similar al glicol de polietileno o cualquier otro ingrediente, usando un portador altamente hidrofílico que se basa en papel para dejarlo en contacto con la piel hasta que el plasma rico en plaquetas se absorba.

Ejemplo 6: Preparación autóloga de una asociación de células de los músculos

[0209] Un ejemplo de asociación autóloga de células puede prepararse utilizando el proceso de acuerdo al invento donde las células del músculo esquelético (células progenitoras de músculo o células madre satelitales) se suministran bajo el paso (d) o (e).

a) Células madre progenitoras de mioblastos

[0210] La biopsia del músculo esquelético se obtiene del vasto lateral y mide 7 × 3 cm. El músculo se ceba el día antes de la biopsia, con una inyección intramuscular en el lugar propuesto de la biopsia (10 × 15 cm de área de la piel en el aspecto lateral del muslo subyacente al músculo vasto lateral justo arriba de la unión de la rodilla, en cualquier lado) con Decadon y Bupivacaína (lidocaína de duración larga). El músculo se corta en pedacitos y se digiere enzimáticamente con una combinación de colagenasa, pronasa y tripsina (Worthington). La acción enzimática se neutraliza utilizando el suero de los pacientes en un medio de cultivo DMEM. El explanto muscular se pone en placas de Petri cubiertas con la composición autóloga de concentrado de plaquetas obtenida mediante el método de acuerdo al invento, también denominado RegenPRP™ (preparado tal como se describió en el ejemplo 4) y se incuba en un 95% de oxígeno y un 5% de dióxido de carbono a 37 °C durante 3 a 4 semanas. Se utiliza una expresión de desmina o de CD-56 como un marcador de mioblastos para identificar a los mioblastos de los fibroblastos. La proliferación de células progenitoras de mioblastos se muestra tridimensionalmente en la figura 3.

[0211] La proliferación celular puede mejorarse mediante la exposición foto-luminosa a 633 nm de 2 J/centímetro cuadrado durante 10 minutos durante el cultivo. El día del trasplante (por ejemplo, 3 a 4 semanas después de la incubación), las células de músculo esquelético se liberan mediante tripsina y se colocan en la composición autóloga de concentrado de plaquetas obtenida mediante el método de acuerdo al invento, también denominada RegenPRP™ (preparada tal como se describe en el ejemplo 4). Las inyecciones al miocardio pueden hacerse como inyecciones directas o como inyecciones de catéteres múltiples en el miocardio del ventrículo izquierdo. La preparación celular de mioblastos obtenida mediante el método de acuerdo al invento es útil para enfermedades cardíacas tales como la regeneración del corazón, el tratamiento de fallas del corazón, fallas cardíacas crónicas, fallas cardíacas isquémicas y no isquémicas y cardiomiopatías no isquémicas. La fracción de eyección puede mejorarse por un 9% para receptores cardíacos de mioblastos esqueléticos.

[0212] La preparación celular que se acaba de mencionar también puede ser útil en el tratamiento de incontinencia urinaria (extractos celulares de mioblastos preparados tal como se describió anteriormente y que se inyectan al

cuello de la vejiga), esofagitis por reflujo o la enfermedad de reflujo gastroesofágicos (extractos celulares de mioblastos preparados tal como se describió anteriormente e inyectados en el esfínter inferior esofágico) e incontinencia anal (extractos celulares de mioblastos preparados tal como se describió anteriormente e inyectados en el área para-anal). Alternativamente, una preparación combinada de fibroblastos y de mioblastos podría ejecutarse (los fibroblastos están presentes en la biopsia muscular y brotan del perimio junto con las células madres de miotubos y células madres satelitales). En el caso del tratamiento de enfermedades cardíacas, una mezcla de una preparación de células de fibroblastos y de una preparación de células de mioblastos (obtenidas de acuerdo a como se indicó anteriormente) se insertan en el miocardio con una tasa de fibroblastos/mioblastos de alrededor de 30:70.

10 **[0213]** Para el tratamiento de incontinencia del cuello de la vejiga, un cultivo separado de fibroblastos se realiza al mismo tiempo que los mioblastos tal como se describió anteriormente y la preparación celular de fibroblastos se inyecta adyacentemente a la uretra y una preparación celular de mioblastos se inyecta en el rabdoesfínter, bajo control de ultrasonido.

15 **b) Células madre satelitales**

[0214] Las células madre de mioblastos y satelitales son cultivadas *ex vivo* en la presencia de la composición autóloga de concentrado de plaquetas obtenida mediante el método de acuerdo al invento, también denominada RegenPRP™. Se observó un cebado de proliferación celular después de 7 días del cultivo primario.

20 **[0215]** Las células se cultivan entonces durante 3-4 semanas después de la incubación y se colocan en el medio de cultivo de tejidos (DMEM junto con un 5-10% volumen de la composición autóloga de concentrado de plaquetas obtenida mediante el método de acuerdo al invento) que contienen un parche de amnios des-epitelizados humanos de 4 × 4 cm y la composición autóloga del concentrado de plaquetas obtenida mediante el método de acuerdo al invento, también denominada RegenPRP™ (preparada tal como se describió en el ejemplo 4). Se expone a la preparación a una irradiación ultravioleta durante 10 minutos. Durante la incubación (comúnmente alrededor de 2 a 3 semanas), las células se esparcen sobre la estructura de amnios y forman una monocapa. Se evalúa la viabilidad y el progreso de la monocapa mediante biopsias del filo del parche 2 veces a la semana y una evaluación histológica del grosor de la monocapa.

30 **[0216]** El día de trasplante (por ejemplo, 3 a 4 semanas después de la incubación), la superficie ventricular se esparce con la composición autóloga del concentrado de plaquetas obtenida mediante el método de acuerdo al invento, también denominada RegenPRP™ (preparada tal como se describió en el ejemplo 4) y entonces el parche obtenido tal como se mencionó anteriormente se coloca con las células hacia abajo en una superficie cruda del ventrículo isquémico para permitir a las células madres en el parche poblar el segmento isquémico después de la inyección ventricular. La retención celular se mantiene mediante los amnios que son inertes y no inducen ninguna reacción inmunológica.

40 **[0217]** La preparación de células madre satelitales obtenida mediante el método de acuerdo al invento es útil para la regeneración del corazón y para tratamientos de fallas cardíacas como una preparación de diseño de tejidos para la mioplastia cardíaca.

Ejemplo 7: preparación autóloga de asociación de células de fibroblastos

45 **[0218]** Se puede preparar un ejemplo de una asociación autóloga de células de fibroblastos usando el proceso de acuerdo al invento donde las células de fibroblastos dérmicos se facilitan bajo el paso (d) o (e).

50 **[0219]** Los fibroblastos dérmicos se aíslan y se expanden de acuerdo al siguiente procedimiento: un mes antes de la biopsia, el área principal de donación de la piel (detrás de una oreja del pliegue axilar anterior, por ejemplo, un área que no haya envejecido por el sol) se trata con crema de vitamina A para activar a los fibroblastos dérmicos. Se realiza una biopsia de la piel de 10 × 6 mm de grosor completo y se disecciona bajo microscopio para remover a todo el epitelio. La biopsia des-epitelizada (demis) se corta en bloques de 3 × 3 mm en forma de explantos. La demis papilar se coloca hacia arriba y se cultiva utilizando la técnica de levantamiento de aire (*Molnar et al., 1996*, mencionada anteriormente) y el *interfaz de aire* (*Metier et al., 2002*, mencionada anteriormente) con la mitad del explanto expuesto al aire. Los explantos se ponen en placas (por ejemplo, 6 explantos por pozo) en DMEM y se cultivan a 37 °C con un 95% de oxígeno y un 5% de CO₂ durante alrededor de 3-5 e incluso hasta 9 días en placas de Petri o en matraces de cultivo. El medio se cambia cada 3 días. La expansión de fibroblastos se modela en 2 dimensiones en forma de monocapas planas, puesto que se observa un crecimiento estático durante la incubación. En los días 7 a 9 después del inicio de la incubación, se obtiene un cambio de proliferación y de patrones de fenotipos tridimensionales agregando un 5-10% diluido de la composición autóloga de concentrado de plaquetas obtenida mediante el método de acuerdo al invento, también denominada RegenPRP™ (preparada tal como se describió en el ejemplo 4) al medio de cultivo: las células se ceban con RegenPRP™ (0,2 ml por pozo) sólo para cubrir la base. Las células crecen entonces como una matriz tridimensional de gel de fibrina (figura 3). Las células se diferencian entonces para formar un portador o una red biológica en el gel de fibrina tal como se muestra en las figuras 4a y 4b. El número de células se mide mediante un recuento diario bajo una red y para evaluar la apoptosis: se utiliza un microscopio invertido (Olympus®).

[0220] Después de 3 a 6 semanas de la incubación, se cosechan a las células del gel de fibrina. La viabilidad celular se sujeta a ensayos con el método clásico de Tripano Azul y con una evaluación bacteriológica, incluyendo una evaluación de contaminación de virus. El extracto celular expandido de fibroblastos obtenido tal como se acaba de mencionar se coloca en una jeringa en la presencia de la composición autóloga de concentrado de plaquetas obtenida mediante el método de acuerdo al invento, también denominada RegenPRP™ y la preparación se inyecta en las arrugas de la cara, más específicamente bajo las arrugas. Las inyecciones deben realizarse a lo largo de toda la cara para cubrir la frente, la quijada, la región molar, los cachetes, la papada y el cuello.

[0221] La expansión celular puede incrementarse mediante la exposición a foto (luminiscencia) a 633 nm. La preparación de células de fibroblastos obtenida mediante el método de acuerdo al invento es útil para un rejuvenecimiento facial, para reducir las arrugas faciales y líneas de expresión, para tratamiento de pieles dañadas por radiaciones (radiodermatitis o piel dañada por el sol), pieles envejecidas o pieles quemadas y/o el mejoramiento de arrugas faciales, de líneas de expresión, del acné (especialmente después del tratamiento de demoa-brasión), de quemaduras, de la rubéola o de la varicela, el vitíligo, la lipoatrofia o la lipodistrofia, tal como la lipodistrofia relacionada con el SIDA; el sarcoma de Kaposi, queloides de la piel o fibrosis de la fascia palmar de Dupuytren y/o en tratamientos de rejuvenecimiento de la piel.

Ejemplo 8: Preparación autóloga de una asociación de células grasas

[0222] Un ejemplo de asociación celular autóloga puede prepararse usando el proceso de acuerdo al invento donde las células madres adiposas se facilitan bajo el paso (d) o (e). Las células madre adiposas adultas se aíslan mediante un método estándar de cultivo en un 5-10% volumen de una composición autóloga de concentrado de plaquetas obtenida mediante el método de acuerdo al invento, también denominada RegenPRP™. La preparación se inyecta entonces con un aplicador en pacientes que padecen de deficiencias de tejidos, tal como deficiencias postraumáticas o deficiencias relacionadas con la edad para pacientes que superan los 40 años de edad.

[0223] La preparación de células grasas obtenida mediante el método de acuerdo al invento es útil para tratamiento de lipoatrofias tales como en los pacientes de VIH/SIDA y otras hemiatrofias congénitas de la cara.

Ejemplo 9: preparación autóloga de asociación de células de condrocitos

[0224] Un ejemplo de una asociación autóloga de células puede prepararse usando el proceso de acuerdo al invento donde las células de condrocitos se facilitan bajo el paso (d) o (e).

El cartílago se aísla de la rodilla del donante (tamaño de la biopsia de 10 × 5 mm) y se corta en cuadraditos. Las células de condrocitos del cartílago se cultivan durante 4-6 semanas en un medio enriquecido con una composición autóloga de concentrado de plaquetas obtenida mediante el método de acuerdo al invento, también denominada RegenPRP™. Las células del cartílago se liberan entonces mediante digestión enzimática (colagenasa y pronasa). La preparación celular se incorpora entonces quirúrgicamente al paciente con defectos y daños condrales profundos. La preparación de células de condrocitos obtenida mediante el método de acuerdo al invento es útil para tratamiento de daños, erosiones o artroscopias profundas del cartílago.

[0225] Otro ejemplo del uso de una preparación de células de condrocitos obtenida mediante el método de acuerdo al invento es el uso en rinoplastia sin cirugías mediante un procedimiento de una sola inyección: un paciente que padece de atrofia congénita del cartílago de la nariz.

El día antes de la inyección, se realiza una biopsia del cartílago de la oreja de 0,4 por 0,4 centímetros y se coloca en un recipiente estéril lleno de DMEM y antibiótico. La biopsia se trata con digestión enzimática incluyendo a tripsina y colagenasa. Los condrocitos liberados son suspendidos nuevamente en la composición autóloga de concentrado de plaquetas obtenida mediante el método de acuerdo al invento donde se agrega previamente un 10% de CaCl₂.

[0226] El paciente recibe primero una anestesia local, y una desinfección de la nariz. Entonces, la preparación de condrocitos que se mencionó anteriormente se inyecta en la superficie del cartílago y/o en la membrana del periostio del lugar que requiere aumento de volumen o un levantamiento. En una 2ª fase, la composición autóloga de concentrado de plaquetas obtenida mediante el método de acuerdo al invento que tiene un 10% de CaCl₂ se inyecta a la parte superficial de la piel de la nariz, para estimular biológicamente la regeneración y el rejuvenecimiento de la piel. Después de una hora, se hace la inyección y el paciente podría regresar a la casa. Se observa una recuperación excepcional de las células viables: el monto de células de condrocitos y de células de plasma recuperadas e inyectadas fue de alrededor de 10⁹ células.

[0227] La preparación de células de condrocitos obtenida mediante el método de acuerdo al invento es, por lo tanto, útil para tratamiento de defectos del cartílago nasal, si procedimiento quirúrgico, pero solamente mediante la inyección.

Ejemplo 10: Preparación para la asociación celular de células madre autólogas del cordón umbilical

[0228] Un ejemplo de asociación celular autóloga obtenida por medio del método de acuerdo a este invento, puede prepararse al utilizar el proceso obtenido por medio del método de conocimiento donde las células madres de cordón umbilical se obtienen bajo los pasos (d) o (e). Las células madres de cordón umbilical se aíslan y son criogénicamente preservadas y utilizadas para el tratamiento de enfermedades de la sangre.

[0229] La preparación de células madre de cordón umbilical obtenidas por medio del método de acuerdo a este invento, es útil para el tratamiento de enfermedades hematológicas (por ejemplo, Talasemia)

Ejemplo 11: Preparación para la asociación celular de células autólogas del tendón

[0230] Un ejemplo de asociación celular autóloga que puede ser preparada al utilizar el proceso de acuerdo a este invento donde las células del tendón se obtienen bajo los pasos (d) o (e).

[0231] Las células fibroblastos se aíslan de acuerdo al procedimiento estandarizado en 5 – 10% vol. de una composición concentrada de plaquetas autóloga, obtenidas por medio del método de acuerdo a este invento. Las células fibroblastos del tendón se cultivan por alrededor de una a tres semanas en un medio de cultivo enriquecido con una composición concentrada de plaquetas autóloga obtenida por medio del método de acuerdo a este invento, también llamado RegenPRT™. La preparación celular es entonces inyectada al paciente en el lugar de la herida (por ejemplo, tendón desgarrado, artrosis). La inyección puede ser guiada por medio de una ecografía, para la localización del sitio afectado y un mejor injerto de la solución implantada.

[0232] La inyección de la preparación de células fibroblastos de tendón también puede realizarse junto al manguito rotador si: primero se repara de forma artroscópica el desgarro del manguito rotatorio, luego se inyecta la preparación de células fibroblastos de tendón por medio de un catéter largo al área de sutura. Esto mejora el proceso de curación de fibroblastos de tendón en el borde del manguito rotador, previene hematomas en el espacio confinado bajo el acromion, previene la rigidez del hombro al acelerar el proceso de curación, mejora la rehabilitación y el movimiento de articulaciones.

[0233] La preparación de células del tendón, obtenida por medio del método de acuerdo a este invento, es útil para el tratamiento de desgarro de tendones, artritis en articulaciones causadas por traumas o por edad y manguito rotatorio en el hombro.

Ejemplo 12: Preparación para la asociación celular de células autólogas de ligamentos y gingival

[0234] Un ejemplo de asociación celular autóloga que puede ser preparada al utilizar el proceso de acuerdo a este invento, donde las células de la membrana del periostio y células gingivales se obtienen bajo los pasos (d) o (e).

[0235] Bajo anestesia general y local, el periostio (aproximadamente 10x10 mm), es recolectado asépticamente desde el lado bucal del cuerpo mandibular en cuatro perros Beagle hembras. El periostio recolectado se corta en pedazos de 3x3 mm. Los tejidos son ubicados directamente en un plato de cultivo de seis pozos y se cultiva (por aproximadamente 3 a 6 semanas) en una atmósfera humedecida de 5% de CO₂ y 95% de aire a 37°C en un medio de cultivo enriquecido con una composición concentrada de plaquetas autólogas, obtenida por medio del método de acuerdo a este invento, también llamado RegenPRT™. La membrana del periostio y las células gingivales se aíslan por digestión enzimática y se cultivan por medio de una técnica estática.

[0236] Típicamente, 6 semanas de cultivo son suficientes para obtener un grosor apropiado de membrana de periostio para injertos.

[0237] Los pacientes se separan en dos grupos: (1) un grupo de control que recibe una composición concentrada de plaquetas autólogas obtenidas por medio del método de este invento, sin contener células de membrana de periostio, y (2) un grupo de tratamiento que recibe la preparación de células de membrana de periostio, obtenida previamente. La composición concentrada de plaquetas autólogas (en el grupo de control) y la preparación celular (para el grupo de tratamiento) se inyectan respectivamente al paciente en el lugar de la lesión.

[0238] 12 semanas después de la operación, la preparación celular de membrana de periostio, desaparece por completo tanto en el grupo de control como en el grupo de tratamiento. La regeneración del hueso en el grupo de tratamiento con membrana de periostio cultivada, fue significativamente mayor que en el grupo de control: el filamento de implantes dentales se cubrió casi por completo con el hueso regenerado, mientras que gran parte del filamento en el grupo de control seguía expuesto. El grupo de tratamiento demostró una formación laminar ósea relativamente gruesa y densa desde la parte inferior a la parte superior. Capas gruesas de tejido óseo se anexaron a la superficie del implante.

[0239] y se observaron células similares a osteoblastos cerca de la superficie. Aun cuando se observó neovascularización en abundancia en la matriz ósea, raramente se observaron células inflamatorias. El borde entre el hueso regenerado y original no era claro. En el grupo de control, los especímenes exhibieron una formación delgada

de hueso cortical en el defecto de dehiscencia. Se observó escasos huesos reticulares entre la superficie del implante y el hueso cortical, y se observaron muy pocos osteocitos y osteodastos dentro de la matriz ósea y en la superficie, respectivamente. La densidad ósea fue significativamente mayor en el grupo en tratamiento en comparación con el grupo de control. La media de los valores de LF fue $77.586 \pm 1.14\%$ y $37.03 \pm 64.63\%$ en los grupos en tratamiento y control, respectivamente ($P < 0.05$).

[0240] La preparación de membrana de periostio y de células gingivales obtenida por medio del método de este invento, es útil para el tratamiento de enfermedades periodontales y osteítis alveolar, especialmente en la búsqueda de regeneración ósea en lugares de implantes por dehiscencia.

Ejemplo 13: Preparación para la asociación celular de células autólogas de córnea

[0241] Un ejemplo de asociación celular autóloga que puede ser preparada al utilizar el proceso de acuerdo al invento, donde las células corneales se obtienen bajo los pasos (d) o (e).

[0242] Se tomó una biopsia del epicanto, al borde de la córnea; y se expandieron las células madre limbales de la córnea para trasplante autólogo en la misma persona 4 semanas después del cultivo en una caja Petri o en un frasco recubierto con una composición concentrada de plaquetas obtenida mediante el método de este invento, también conocido como RegenPRP™. Las células madre cultivadas de la córnea (de origen limbal) pueden ser modificadas ex vivo sobre la superficie de amnios humano sin epitelio en una monocapa, después de la siembra del constructo con una suspensión de queratinocitos corneales cultivados y viables, obtenidos a través del método del invento. Se utilizan cerca de 500 000 células para el cultivo y se permite que las células cubran la superficie del constructo después de 3 semanas de incubación. La ingeniería de las células ocurre después de aproximadamente tres semanas de cultivo primario de células, podría necesitarse una nueva siembra. El constructo biológico celular resultante consiste de colágeno, fibras de amnios y queratinocitos corneales, compuestos por una membrana y una monocapa de células.

[0243] La preparación de células corneales, obtenida utilizando el método de este invento, puede ser esparcida sobre un lente de contacto soluble y aplicado sobre la córnea dañada. El lente de contacto desaparece y las células cierran el defecto corneal.

[0244] La preparación de células corneales, obtenida utilizando el método de este invento, puede ser administrada de forma tópica como gotas oculares en pacientes que sufren de síntomas de ojo seco. De forma alternativa, el amnios previamente mencionado puede ser utilizado independientemente sobre una cornea con cicatriz; o, el constructo y la preparación celular obtenida utilizando el método de este invento, puede ser adherido al interior de un lente de contacto biológico o artificial para luego aplicarlo a la córnea y cubierto con un parche de ojo.

[0245] La preparación celular de la córnea, obtenida utilizando el método de este invento, puede ser utilizada para aliviar el dolor del síndrome de ojo seco, para el tratamiento del Síndrome de Steven Johnson y para tratar ceguera corneal debida a quemaduras industriales con sustancias ácidas o básicas, para úlceras corneales tales como alteración corneal neurotrópica recalcitrante, herpética e inmunológicamente inducida.

Ejemplo 14: Preparación para la asociación celular autóloga de médula ósea

[0246] Un ejemplo de asociación celular autóloga que puede ser preparada al utilizar el proceso de acuerdo al invento, donde las células de médula ósea se obtienen bajo los pasos (d) o (e).

[0247] La médula ósea de la cadera se recogió y se centrifugó en un dispositivo, listo para el uso, para la preparación de un concentrado de plaquetas obtenidas a través del método de este invento (también llamado Regen BCT™ (Terapia de Células Sanguíneas (Blood Cell Therapy)) con el fin de separar las células rojas de la sangre.

[0248] La preparación de células de médula ósea se mezcla entonces con el concentrado de plaquetas obtenido a través del método según el invento; y, se lo aplica o inyecta utilizando un aplicador con adición de CaCl_2 al sitio de la lesión en los pacientes.

[0249] La preparación de células de médula ósea obtenida a través del procedimiento según el invento, es útil para el tratamiento de la enfermedad cardíaca isquémica y no isquémica, defecto de hueso y defecto de cartílago.

Ejemplo 15: Preparación para la asociación celular autóloga Schwann

[0250] Un ejemplo de asociación celular autóloga que puede ser preparada al utilizar el proceso de acuerdo al invento, donde las células de Schwann se obtienen bajo los pasos (d) o (e).

[0251] Bajo anestesia local, se realiza una biopsia ya sea en N. Safena o N. SURALIS en la extremidad inferior. La biopsia del nervio se corta en bloques pequeños y se realizan cultivos primarios en placas Petri enriquecidas con una composición concentrada de plaquetas autólogas, obtenida mediante el método de este invento (también

llamado RegenBCT™). Las mono capas se expanden en 3D y las células eventualmente son cosechadas por digestión de tripsina y se las concentra en una jeringa para la infiltración local de la médula espinal dañada que está expuesta quirúrgicamente. Se ha demostrado que las células cultivadas contienen mielina.

- 5 **[0252]** La preparación de células de Schwann, obtenida utilizando el método de este invento, es útil para el tratamiento de daños del nervio periférico, sutura de nervios y daños en la médula espinal.

Ejemplo 16: Preparación de islotes celulares humanos autólogos

- 10 **[0253]** Un ejemplo de asociación celular autóloga que puede ser preparada al utilizar el proceso de acuerdo al invento, donde islotes celulares del páncreas se obtienen bajo los pasos (d) o (e).

15 **[0254]** Los islotes celulares del páncreas son cosechados durante una biopsia abierta y se separan por digestión enzimática convencional y separación Ficol y Hypage (Page et al., 2007, Diba. Vas. Dis. Res., 7-12) en un medio enriquecido con una composición concentrada de plaquetas autólogas, obtenida utilizando el método de este invento, también conocido como RegenBCT™.

20 **[0255]** La preparación de islotes celulares del páncreas se inyecta entonces como un bolo por medio de la vena porta hepática al hígado.

[0256] La preparación de islotes celulares del páncreas, obtenida utilizando el método de este invento, es útil en el tratamiento de diabetes tipo 1 o diabetes insulina-dependiente y para la reversión de la hiperglucemia de la diabetes mellitus.

Ejemplo 17: Preparación de osteoblastos celulares humanos autólogos

25 **[0257]** Un ejemplo de asociación celular autóloga que puede ser preparada al utilizar el proceso de acuerdo al invento, donde osteoblastos celulares se obtienen bajo los pasos (d) o (e). Utilizando anestesia local, se realiza una punción para la biopsia del hueso cortical derivado de la cresta iliaca o un sitio equivalente. Se coloca la biopsia del hueso en un medio DMEM aséptico a 4°C o en un medio de transporte equivalente conocido por expertos en la materia de cultivo ex vivo de huesos y osteoblastos. La biopsia de hueso es entonces cortada en cubos, digerida en colagenasa tipo-1 al 10% (Sigma o Boehringer) a 37°C durante 15 minutos bajo una campana de flujo laminar. De forma alternativa, la digestión por tripsina (Worthington) puede ser utilizada. La digestión enzimática termina con tres lavados utilizando la composición concentrada de plaquetas autólogas obtenida utilizando el método de este invento, también llamado RegenBCT™, en DMEM a 4°C. La preparación se centrifuga, separada en píldoras y resuspendida. Los fragmentos de hueso se colocan en placas Petri o frascos como explantes utilizando tecnología de aire ascendente en una composición concentrada de plaquetas autólogas obtenida utilizando el método de este invento, también llamado RegenBCT™. La preparación se cultiva a 37°C con antibióticos, gentamicina y amfotericina-B, bajo un flujo de gas de 95% aire y 5% CO₂. El medio de cultivo se cambia tres veces a la semana, cada vez aumentando el medio DMEM con 10% vol. de composición concentrada de plaquetas autólogas obtenida utilizando el método de este invento. La viabilidad y morfología de las células se valora tres veces por semana para evaluar la locomoción, apoptosis y progresión 3D mono capa de las células. La formación de micro filamentos y la diferenciación se evalúa por medio de microscopía inversa (Olympus®). Se confirma la ausencia de contaminación bacteriana y viral. Los osteoblastos pueden ser manipulados en amnios humanos para crear una distribución de biocomposición celular y mono capa celular de transporte/construcción después de sembrar la membrana con 100 000 células previamente obtenidas; y, permite la expansión de la membrana mono capa por 3-4 semanas, logrando una construcción única de osteoblastos-amnios-membrana para usar y transferir, cubriendo un defecto óseo o área injertada, a lo largo de la sección no unida de la fractura en cualquier sitio.

50 **[0258]** La preparación de células de osteoblastos, obtenida a través del método de este invento, es útil para el tratamiento de defectos óseos, injertos óseos y trastornos óseos

REVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de una composición celular, que comprende los pasos de:

- 5 (a) centrifugar a sangre completa en un tubo separador seleccionado de:
- Un tubo separador de vidrio que contiene un gen tixotrópico que se basa en poliéster y una solución amortiguada de citrato de sodio a 0.10 M; y
 - 10 - Un tubo separador de tereftalato de polietileno que contiene un gel altamente tixotrópico formado por una mezcla polimérica y un citrato anhídrido de sodio a 3.5 miligramos/mililitro;
- (b) Separar al plasma enriquecido con plaquetas del plasma completo al remover alrededor de la mitad del sobrenadante que contenía plasma con niveles bajos de plaquetas;
- 15 (c) Suspender nuevamente el plasma enriquecido;

donde el paso de centrifugación a) se realiza con una fuerza de, o alrededor de, 1500 g a 2000 g durante un período suficiente de tiempo para formar una barrera entre el plasma que contiene plaquetas, linfocitos y monocitos y un pellet que contiene a eritrocitos; el paso de separación b) se realiza mediante la recolección del sobrenadante de la parte de encima de dicha barrera y donde el plasma enriquecido esta enriquecido con leucocitos, trombocitos y proteínas de adhesión en comparación a la sangre natural completa.

2. Un proceso de acuerdo a la reivindicación 1, donde el paso de centrifugación se realiza con una fuerza de entre alrededor de los 1500 g y hasta los 1700 g durante un período de tiempo seleccionado de alrededor de 3 minutos hasta de alrededor de 15 minutos, o a 1500 g durante alrededor de 8 minutos.

3. Un proceso de acuerdo a la reivindicación 1 o a la reivindicación 2, que comprende además los pasos de:

- 30 (d) Facilitar un extracto celular en el cual las células se seleccionan de células dérmicas, de queratinocitos, de fibroblastos, de melanocitos, de células de Langherans, de células grasas, de células de la médula ósea, de células musculares, de osteoblastos, de condrocitos, de células de la membrana del periostio, de células de la córnea, de células de cordones umbilicales, de células de Schwann, de células de tendones, de células de islotes pancreáticos, de adipocitos, de células madre de adiposas, de células madre del limbo de la córnea, de queratinocitos de la córnea, de células madre satelitales, de células madre progenitoras de mioblastos, de células madre, de células del cartílago, de células de ligamentos y de células gingivales; (e) mezclar y agregar el concentrado de plaquetas obtenido bajo el paso (c) con el extracto celular obtenido en (d).

4. Un proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3 que comprende el paso de agregar y mezclar el concentrado de plaquetas obtenido bajo el paso (c) con un activador de coagulación a una tasa de volumen (concentrado de plaquetas: activador de coagulación) de alrededor de 10:1 hasta alrededor de 10:3,

donde dicho activador de coagulación es, opcionalmente, un activador de trombina, un activador de fibrinógeno, calcio, una sal de calcio, CaCl₂, CaCO₃, CaSO₄, sodio, batroxobina, trombina, preparaciones enriquecidas con trombina, trombina autóloga y/o suero autólogo de trombina.

5. Un proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, donde dicho estrato celular se obtiene de un proceso que comprende los pasos de:

- 50 (A) Suministrar a dichas células en una composición concentrada de plaquetas que comprende a i) plasma; ii) plaquetas a una concentración de por lo menos 300×10^9 células/litro; iii) glóbulos blancos a una concentración de por lo menos $7,0 \text{ por } 10^9$ células/litro; iv) fibrinógeno a una concentración de por lo menos 3 mg/litro; y donde la concentración de eritrocitos es menor que $0,6 \text{ por } 10^{12}$ células/litro;
- 55 (B) Cultivar opcionalmente a las células;
- (C) Cosechar opcionalmente a las células;
- 60 (D) Suspender nuevamente a las células cultivadas obtenidas bajo el paso (A), (B) o (C) en un concentrado de plaquetas,

donde el paso (A) se realiza opcionalmente en una composición aislada de concentrado de plaquetas tal como la concentración final en plaquetas que comprende entre alrededor del 5% y alrededor del 40% del volumen del medio de cultivo,

donde el paso de cultivo celular (B) comprende opcionalmente a por lo menos un paso de colocación en placas de las células en una superficie de cultivo celular,

5 donde el paso de cultivo celular (B) se realiza opcionalmente a 37 °C,

donde el paso de cultivo celular (B) se realiza opcionalmente bajo un flujo de gas o a aire y a dióxido de carbono,

10 donde el paso de cultivo celular (B) dura opcionalmente durante alrededor de 3 a 4 semanas, donde el medio de cultivo celular se cambia regularmente y opcionalmente durante la incubación,

donde el paso de cultivo celular (B) comprende opcionalmente por lo menos un paso de exposición de las células a luz visible durante alrededor de 10 minutos,

15 donde el paso de cultivo celular (B) comprende opcionalmente por lo menos un paso de adición de un concentrado diluido de plaquetas que comprende a i) plasma; ii) plaquetas con una concentración de por lo menos 300×10^9 células/litro; iii) glóbulos blancos con una concentración de por lo menos $7,0 \times 10^9$ células/litro; iv) fibrinógeno con una concentración de por lo menos 3 mg/litro; y donde la concentración de eritrocitos es inferior a $0,6 \times 10^{12}$ células/litro; tal como la concentración final de plaquetas entre alrededor del 5% y alrededor del 40% del volumen del medio de cultivo.

20

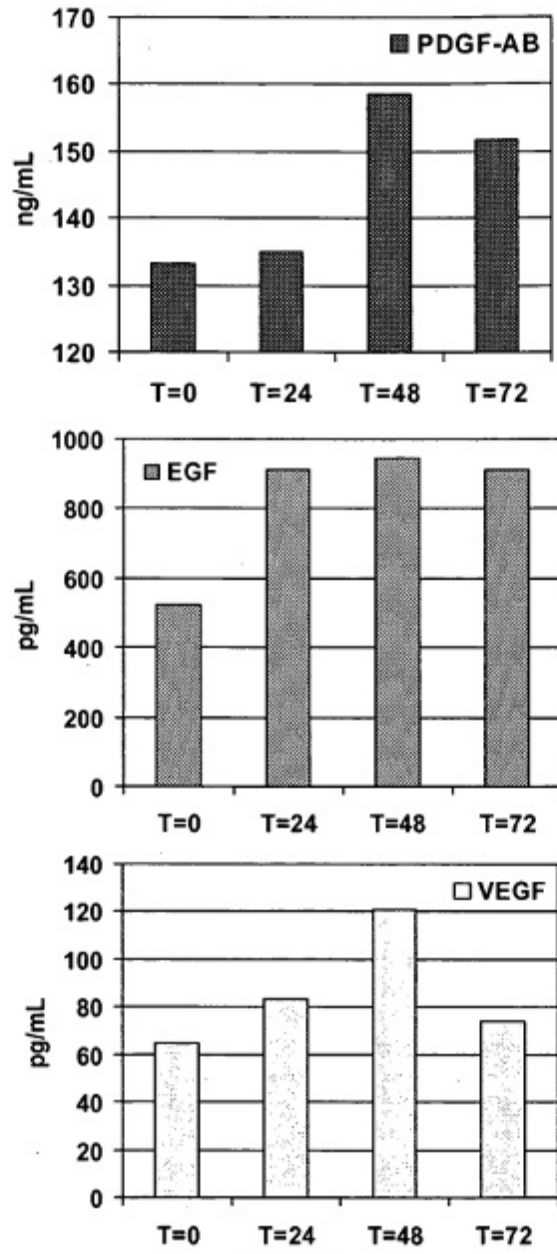


FIGURA 1

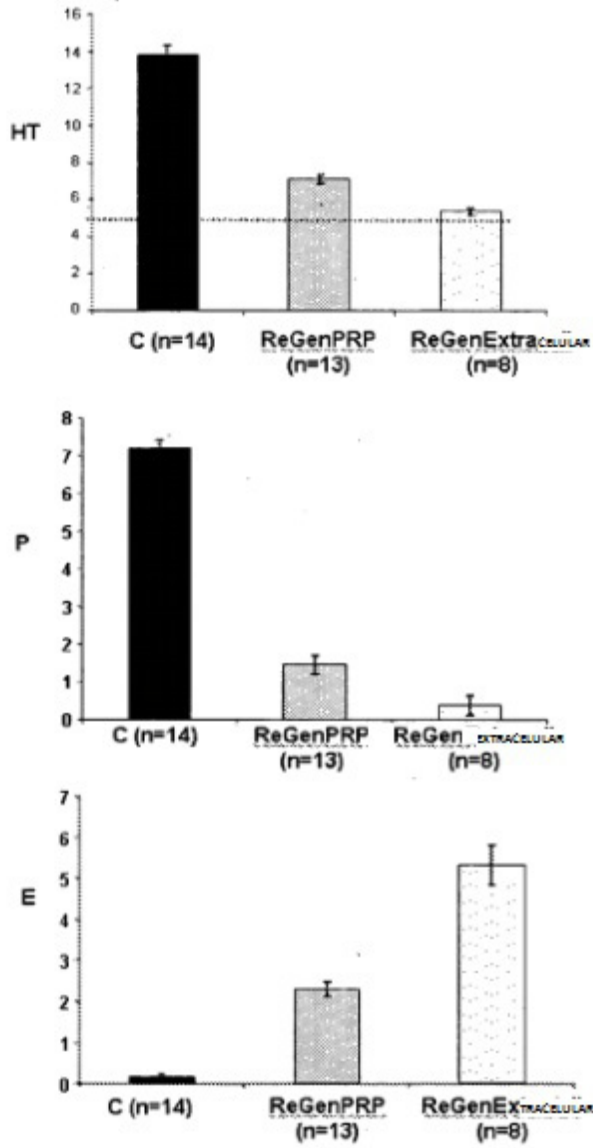


Figura 2

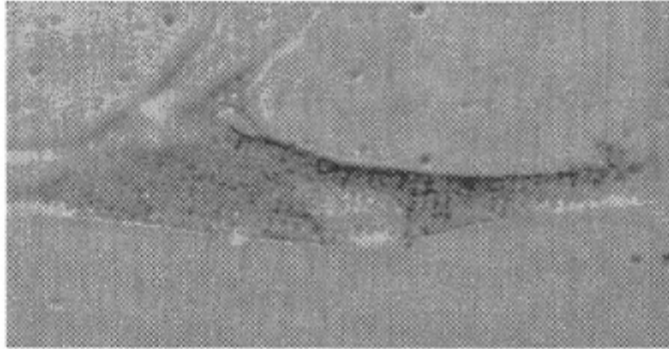


FIGURA 3

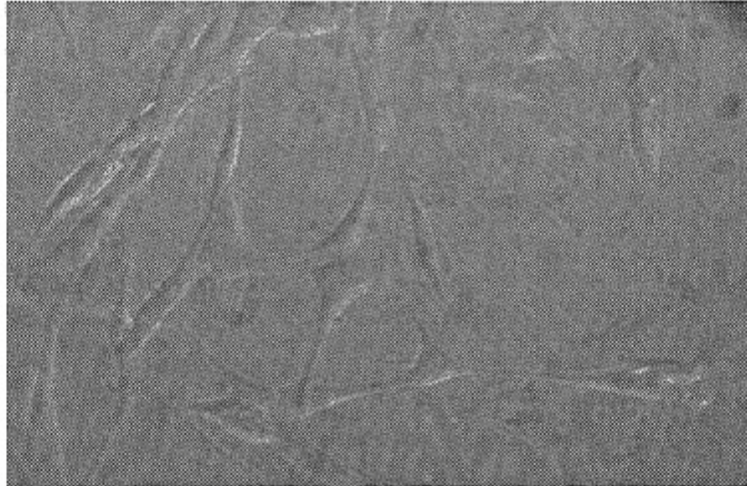


Figura 4a

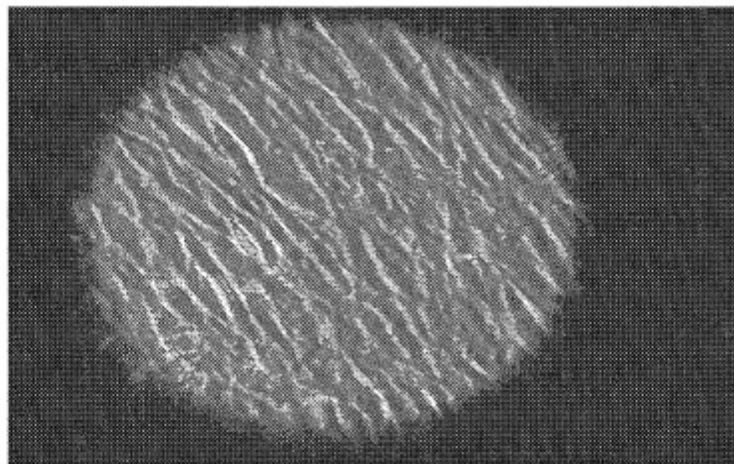


Figura 4 b