

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 537**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/14** (2015.01)

**A61K 35/16** (2015.01)

**A61K 38/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2011 PCT/IB2011/000684**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2011 WO11110948**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2011 E 11719062 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2017 EP 2544697**

54 Título: **Proceso, tubo y dispositivo para la preparación de la composición sanitaria de las heridas**

30 Prioridad:

**11.03.2010 GB 201004072**

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

**23.10.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**TURZI, ANTOINE**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 638 537 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).

**Proceso, tubo y dispositivo para la preparación de la composición sanitaria de las heridas****Descripción****5 Campo de la invención**

**[0001]** La presente invención está relacionada con el campo de la regeneración de tejidos. Se refiere más particularmente a nuevos procedimientos, tubos y dispositivos para trombina, concentrados plaquetarios y preparaciones para curar heridas, composiciones y usos de los mismos.

10

**Antecedentes de la invención**

**[0002]** La importancia de materiales biológicos autólogos en el proceso de curación ha sido bien documentada. Más importante aún, se ha demostrado que dos materiales biológicos autólogos están directamente implicados en la formación de la estructura de los coágulos sanguíneos, que proporcionan una barrera hemostática cuyo papel consiste en asegurar la hemostasia y sellar la herida: (1) fibrina, que se deriva de la separación del fibrinógeno plasmático en dos hebras mediante la acción de la trombina y (2) de las membranas activadas de las plaquetas. El proceso de curación de heridas se presenta generalmente como la sucesión de una fase de coagulación, un proceso inflamatorio y un proceso de regeneración. La fase de coagulación (coagulación de la sangre o formación de coágulos) es un proceso complejo por el cual una pared dañada de los vasos sanguíneos está cubierta por un coágulo de fibrina para detener la hemorragia y la reparación del vaso dañado se inicia por la liberación en grandes cantidades de citoquinas y factores de crecimiento de los gránulos alfa de plaquetas. La formación de coágulos sanguíneos (formados en condiciones fisiológicas por fibrina, plaquetas y glóbulos rojos, entre otros componentes de la sangre) es un fenómeno natural que resulta del trauma de los tejidos y de su papel en el proceso de cicatrización de heridas, así como en la unión de fracturas óseas, es bien conocida.

15

20

25

**[0003]** La coagulación sanguínea es el resultado de la interacción compleja de un número de factores de coagulación de proteínas a través de una cascada. En general, el daño al endotelio vascular expone las estructuras subendoteliales, que atraen las plaquetas y las inducen a agregarse reversiblemente. La proteína trombina, formada durante la activación de la vía de coagulación genera fibrilas reticuladas insolubles de la fibrina proteica y hace que las plaquetas se agreguen irreversiblemente. El coágulo de plaquetas-fibrina resultante es una barrera eficaz contra la pérdida de sangre del sistema vascular y también sirve como un andamio para la reparación subsiguiente del revestimiento del vaso sanguíneo.

30

35

**[0004]** El proceso de la inflamación, que sigue a la formación de un coágulo de sangre, es estimulado por numerosos mediadores vasoactivos y factores quimiotácticos (señales específicas en la forma de proteínas) liberados por las células blancas de la sangre y plaquetas. Estas señales atraen a los macrófagos que "limpian" el sitio de bacterias y partículas extrañas, así como los glóbulos rojos antes de la migración de nuevas células. La fase de regeneración del tejido implica la quimioatracción y la mitosis de las células indiferenciadas en el armazón (o matriz de crecimiento) formado por el coágulo sanguíneo. Las nuevas células que se multiplican bajo la estimulación de factores de crecimiento plaquetario reemplazarán las células dañadas o destruidas por los macrófagos. Los factores de crecimiento y numerosas proteínas plasmáticas, también llamadas moléculas de señalización, que promueven la migración celular y la división dentro de los coágulos de sangre, desempeñan un papel crucial en el proceso de cicatrización de heridas.

40

45

**[0005]** Selladores bioadhesivos y pegamentos de fibrina representan un relativamente nuevo avance tecnológico que duplica el proceso biológico de la etapa final de la coagulación de sangre. Los informes clínicos documentan la utilidad del pegamento de fibrina en una variedad de campos quirúrgicos, como cirugía cardiovascular, torácica, trasplante, cabeza y cuello, oral, gastrointestinal, ortopédica, neuroquirúrgica y plástica. En el momento de la cirugía, los dos componentes primarios que comprenden el pegamento de fibrina, fibrinógeno y trombina, se mezclan entre sí para formar un coágulo. El coágulo se adhiere a los tejidos, hueso o nervio necesarios en segundos, pero luego se reabsorbe lentamente por el cuerpo en aproximadamente 10 días mediante fibrinólisis. Las características importantes del pegamento de fibrina son su capacidad para: (1) lograr la hemostasia en las anastomosis vasculares particularmente en áreas que son difíciles de aproximarse con las suturas o donde la colocación de la sutura presenta un riesgo excesivo; (2) controlar el sangrado de agujeros de aguja o lágrimas arteriales que no pueden controlarse por sutura sola; y (3) obtener hemostasia en pacientes heparinizados o con coagulopatía. Véase, Borst, HG, et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 84: 548 - 553 (1982); Walterbusch, G. J., et al., Thorac Cardiovasc. Surg., 30: 234 - 235 (1982); y Wolner, F.J. et al., Thorac. Cardiovasc. Surg., 30: 236 - 237 (1982).

50

55

60

**[0006]** En teoría, es posible amplificar los efectos de estas primeras fases de la cascada de curación de heridas descartando las células rojas de la sangre y el aumento de la concentración de factores de crecimiento.

65

**[0007]** Amplificación de la coagulación de la sangre se puede definir como la formación de un "coágulo enriquecido (CE)". Las CE se obtienen mediante el uso de concentrados de plaquetas y se han descrito en Platelets and Megacaryocytes 2004, vol. 1 y 2, como "Structure and signals", Ed. Gibbins y Mahaut-Smith, Humana Press, Nueva

Jersey. El plasma rico en plaquetas (PRP) puede definirse como un concentrado autólogo de plaquetas en un pequeño volumen de plasma; se ha desarrollado como un biomaterial autólogo y ha demostrado ser útil en la cicatrización y regeneración de tejidos (Marx et al., 2004, J. Oral Maxillofac, Surg., 62, 489-496). El PRP no sólo consiste en un concentrado de plaquetas, sino que también contiene factores de crecimiento (como el factor de crecimiento derivado de plaquetas: PDGF, factor de crecimiento endotelial vascular: VEGF, factor de crecimiento transformante: TGF y factor de crecimiento epidérmico: EGF, etc.) Que son secretadas activamente por plaquetas y se sabe que tienen un papel fundamental en el proceso de iniciación de la cicatrización de heridas.

**[0008]** Por ejemplo, PDGF es conocido para iniciar la curación del tejido conectivo, incluyendo la regeneración ósea y reparación. El PDGF también aumenta la mitogénesis (células de cicatrización), la angiogénesis (mitosis endotelial en los capilares funcionales) y la activación de los macrófagos. El VEGF liberado por los leucocitos también se sabe que tiene potentes actividades angiogénicas, mitogénicas y de mejora de la permeabilidad vascular en las células endoteliales. El TGF- $\beta$  promueve la mitosis celular y la diferenciación para el tejido conectivo y el hueso, actúa sobre células madre mesenquimales, preosteoblastos y fibroblastos e inhibe la formación de osteoclastos. Se sabe que el EGF induce el desarrollo epitelial y promueve la angiogénesis. Los concentrados de plaquetas se usan generalmente en implantología dental y cirugía ósea, especialmente en los Estados Unidos. Se han desarrollado varias técnicas de preparación de PRP por procesos de centrifugación. Sin embargo, debido a la sensibilidad de las células plaquetarias y a la variabilidad de la eficacia de los métodos de separación de las plaquetas de los glóbulos rojos, existe una gran variabilidad entre los métodos utilizados para la preparación de concentrados de plaquetas. Los ajustes automatizados de Biomet PCCS & GPS (Marx et al, 2004, arriba), presentan el inconveniente de ser un proceso complejo con costos prohibitivos para el proceso de una gran muestra de sangre. En estos sistemas, existe también una importante pérdida de tejido biológico valioso de los pacientes, por lo que existe la necesidad de desarrollar un proceso fiable de recogida de las células plasmáticas con altos rendimientos, fáciles de usar y rentable.

**[0009]** Además, la obtención de concentrados de plaquetas todavía necesita el uso de kits relativamente complejos y máquinas costosas dedicadas y la participación no menos costosa de técnicos especializados. Este inconveniente hace que los actuales métodos conocidos de preparación de PRP no estén adaptados a un uso en el punto de atención.

**[0010]** El documento WO 2008/023026 describe un proceso y dispositivo para la preparación de plasma rico en plaquetas.

**[0011]** El documento WO 2008/022651 describe un proceso y dispositivo para la preparación de plasma rico en plaquetas.

**[0012]** US 2004/0151709 describe una composición y un método de creación, regeneración y reparación de tejidos utilizando un implante biológico portador de células.

**[0013]** WO 99/66923 describe un curador de heridas de plaquetas enriquecidas.

**[0014]** EP1547606 describe un método de preparación de plasma rico en plaquetas.

**[0015]** Okabe et al. (2009) Cytotherapy 11 (3): 307-316 describe el aumento de tejido blando inyectable.

**[0016]** Además, la preparación de las células en vista de regeneración celular o de tejidos para su uso en el trasplante, la regeneración post-operatoria o para fines estéticos se enfrenta al problema de la conservación a largo plazo de las células y tejidos. La criopreservación de tejidos o células se utiliza generalmente para el mantenimiento a largo plazo de tejidos o células, en particular plaquetas, pero esta técnica ha mostrado serios inconvenientes y problemas tales como formación de cristales, problemas osmóticos, agregación, inhibición de la capacidad de síntesis de proteínas, expresión en respuesta a la tensión térmica. Por lo tanto, se sabe que la criopreservación de tejidos o células altera la viabilidad y la estabilidad de las células (Agence française de sécurité sanitaire, 2003, Arnaud et al., 1999, Cryobiology, 38, 192-199, Tablin et al., 2001, Cryobiology, 43 (2), 114-23). Algunos de los efectos secundarios de la criopreservación pueden estar limitados por el uso de agentes anticongelantes tales como DMSO o glicerol u otros criopreservadores (US 5, 5891, 617, Oh et al., Cornea, 26, 840-846) pero la concentración de estos agentes debe adaptarse para limitar su toxicidad y efectos secundarios.

**[0017]** Por lo tanto, existe una necesidad para el método nuevo o alternativo de preparación de células y tejidos adecuados para su uso de forma extemporánea, preservando su integridad, notablemente en términos de capacidad y viabilidad de secreción de factores de crecimiento.

### Resumen de la invención

**[0018]** La invención proporciona un método para la preparación de una composición de curadores de heridas o curadores de tejido, que comprende las etapas de:

- a) Recoger sangre entera en un tubo que comprende ácido hialurónico y un gel tixotrópico,
- b) Centrifugar dicho tubo, y
- c) Recoger el sobrenadante que comprende dicho ácido hialurónico y plasma rico en plaquetas.

5 **[0019]** La invención proporciona además un tubo que comprende ácido hialurónico y un gel tixotrópico.

**[0020]** La invención proporciona además un kit o dispositivo médico que comprende un tubo de la invención.

10 **[0021]** La invención se refiere al campo de regeneración de tejido. Se refiere más particularmente a nuevos procedimientos, tubos y dispositivos para trombina, concentrados de plaquetas y preparaciones para curar heridas, composiciones y usos de los mismos. La invención se refiere también a nuevas formulaciones de células, nuevas formulaciones de plasma rico en plaquetas (PRP), métodos de preparación de nuevas formulaciones de células o formulaciones de PRP, uso de tales preparaciones de células o PRP, opcionalmente mezcladas con un extracto celular como un extracto autólogo de queratinocitos, células de médula ósea, fibroblastos, células del periostio o de la córnea, melanocitos y células de Langheran; células grasas; tejido graso, células musculares tales como mioblastos y células satélites; osteoblastos; condrocitos; células de cordón umbilical; células madre mesenquimales (MSC), preadipocitos, células pre- endoteliales, células de Schwann o células del tendón de Aquiles.

20 **[0022]** En un aspecto, el presente documento describe un método para preparar una composición de curador de herida o curador de tejido completamente autólogo y extemporáneo. Todos los componentes sanguíneos para el curado de la herida autóloga o la composición de curado del tejido se derivan de un solo paciente al que se aplicará el curado de la herida autóloga o la composición de curado del tejido (mismo paciente).

25 **[0023]** En un aspecto, el presente documento describe un procedimiento o método para la preparación de suero de la trombina, comprising las etapas de:

- a) Recoger la sangre entera en un tubo que contiene un gel tixotrópico,
- b) Centrifugar el tubo hasta liberar el suero de trombina, y
- c) Recoger el suero de trombina.

30 **[0024]** En otro aspecto, el presente documento describe un proceso o método para la preparación de una composición de curado de heridas o de una composición de curado de tejidos, que comprende las etapas de:

- a) Recoger sangre entera preferentemente en un tubo que contiene ácido hialurónico, un gel tixotrópico y/o un anticoagulante preferiblemente citrato sódico,
- b) Centrifugar el tubo preferentemente hasta la migración de glóbulos rojos bajo el gel tixotrópico y preferentemente hasta la migración del ácido hialurónico por encima del plasma enriquecido,
- c) Opcionalmente, mezclar el ácido hialurónico y el plasma enriquecido, preferentemente invirtiendo el tubo,
- d) Recoger el sobrenadante que contiene ácido hialurónico y el plasma enriquecido.

40 **[0025]** En otro aspecto, se da a conocer en el presente documento un tubo para recoger y separar una muestra de fluido que comprende

- i) dos partes distintas que difieren en tamaño y diámetro,
- ii) un filtro que separa las dos partes, y
- iii) opcionalmente un gel tixotrópico y un anticoagulante.

50 **[0026]** En una realización preferida de la invención, el tubo consiste de las características como se ilustra en las Figuras 1 a 14.

**[0027]** En otro aspecto, el presente documento describe un sistema de bolsa de sangre o dispositivo de tubos de recogida de sangre que comprende múltiples bolsas o tubos útiles para la recogida, almacenamiento, utilización y suministro de componentes de la sangre.

55 **[0028]** En un aspecto preferido, el presente documento describe un sistema de bolsa de sangre o de dispositivos de tubos de recogida de sangre de acuerdo con a la Figura 15.

60 **[0029]** En otro aspecto, el presente documento describe un dispositivo de sistema de bolsa de sangre o tubos de recogida de sangre que comprende un único conducto de entrada conectado a un adaptador de conductos múltiples con conductos adaptadores conectados a al menos dos bolsas o tubos, en que cada conducto de adaptador del adaptador del conducto múltiple se conecta a una sola bolsa o tubo.

**[0030]** Los tubos de recogida de sangre son preferentemente evacuados, sellados y llenos de gel tixotrópico y anticoagulante.

65 **Descripción de las figuras**

**[0031]** Los dibujos adjuntos, que se incorporan en el presente documento y forman una parte de la especificación ilustran realizaciones preferidas de la presente invención, y junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

- 5 Las Figuras 1A y 1B son representaciones esquemáticas de un tubo.
- Las Figuras 2 y 3 son representaciones esquemáticas del interior de un tubo.
- 10 La Figura 4 es una representación esquemática del interior del filtro de un tubo. El filtro comprende una capa interna con embudos y una capa externa con estructuras de tipo trapezoide.
- La Figura 5a es una representación esquemática del interior de un tubo.
- 15 La Figura 5b es una representación esquemática de la unión de tapa y tubo.
- La Figura 6 es una representación esquemática de la tapa.
- Las Figuras 7A y 7B representan dos vistas distintas del filtro de un tubo.
- 20 La Figura 8 representa una vista inferior del filtro de un tubo. La Figura 8 también representa las cuatro series simétricas de 3 rangos de aberturas de la capa externa o capa inferior.
- La Figura 9 representa una vista superior del filtro de un tubo. La Figura 9 también representa las cuatro series simétricas de 2 intervalos de aberturas de la capa interna o capa superior.
- 25 Las Figuras 10 y 11 representan vistas detalladas del filtro de un tubo.
- La Figura 12 representa una vista detallada de la parte céntrica del filtro de un tubo.
- 30 La Figura 13 es una representación detallada del interior del filtro de un tubo. El filtro comprende una capa interna con embudos y una capa externa con estructuras de tipo trapezoide. Cada embudo y trapecio se introduce en el filtro de una manera alternativa (un primer trapecio es seguido por un primer embudo, seguido por un segundo trapecio, seguido por un segundo embudo y terminado por un tercer trapecio).
- 35 La Figura 14 es una vista detallada del filtro que comprende embudos y trapezoides de un tubo.
- La Figura 15 es una vista del sistema de bolsas de sangre o dispositivo de tubos de recogida de sangre.
- 40 La Figura 16 es una representación esquemática del método para preparar una composición cicatrizante de herida o tejido que comprende PRP y ácido hialurónico.

#### **Descripcion detallada de la invencion**

- 45 **[0032]** Los siguientes párrafos proporcionan definiciones de los términos según la invención y están destinados a aplicarse uniformemente en toda la memoria descriptiva y reivindicaciones a menos que otra definición expresamente proporcione una definición más amplia.
- 50 **[0033]** La expresión "tixotrópica" significa un gel que se vuelve más fluido como resultado de la agitación o la presión, es decir, un gel cuya viscosidad está disminuyendo como resultado de agitación o presión. El término viscosidad se refiere a aquellas características del material o materiales especificados que determinan el grado de gelificación, tal como por ejemplo la firmeza o dureza del material, el grado en que el material se resiste a fluir como un fluido.
- 55 **[0034]** Un gel tixotrópico según la invención que comprende un gel de poliéster o una mezcla de los mismos, que es insoluble en agua y químicamente inerte a componentes de la sangre que se pueden utilizar de acuerdo con la invención. Los geles tixotrópicos típicos se usan en la separación de las células sanguíneas para propósitos de diagnóstico y proteómica. Un gel tixotrópico también se denomina aquí como un "gel selector de células". Se pueden usar otros geles en la presente invención.
- 60 **[0035]** La expresión "punto de atención" significa todos los servicios proporcionados a los pacientes en la cabecera.
- [0036]** La expresión "accesorios de flebotomía" o "accesorios de venopunción" significa accesorios que permiten la punción de una vena con una aguja con el propósito de extraer sangre.
- 65 **[0037]** Expresiones alternativas para "curador de heridas" o "sellador de heridas" o "curador de tejido" o "sellante de

tejido" o "composición de cicatrización de heridas" o "composición para la cicatrización de tejido" son "sellador bioadhesivo" o "cola de fibrina".

5 **[0038]** La expresión "curador de heridas" o "sellador de heridas" o "curador de tejido" o "sellante de tejido" o "composición de cicatrización de heridas" o "composición para la cicatrización de tejido" o "sellador bioadhesivo" o "cola de fibrina" significa un agente o una composición que es capaz de promover y/o aumentar la velocidad y/o la calidad de la cicatrización de una herida. Los curadores o selladores de heridas son capaces de promover la regeneración de tejidos. La expresión "herida" significa cualquier tejido dañado, por ejemplo tras un traumatismo o cirugía. Las heridas en mamíferos incluyen, por ejemplo, úlceras, laceraciones y quemaduras, sitios de injerto (sitios donadores y aceptores de injerto), fístulas, lesiones del tejido periodontal, heridas no curativas diabéticas, consecuencias de traumas o cualquier acto de cirugía. En su sentido general, la expresión pretende abarcar también daños de la piel en los que la superficie de la piel presenta cierta depresión sin necesariamente un corte en su superficie, tales como lesiones tisulares relacionadas con la edad (por ejemplo arrugas) y cicatrices tales como por ejemplo acné (especialmente después del tratamiento de dermoabrasión) o cicatrices de rubéola. La expresión "PRP" significa un plasma rico en plaquetas, preferiblemente de origen mamífero o de origen humano, más preferiblemente autólogo, preparado por el procedimiento de la invención con el fin de pelletizar y eliminar los eritrocitos y concentrar el plasma en leucocitos, trombocitos y proteínas de adhesión en comparación con la sangre entera nativa. La expresión "autólogo" o "autogénico" o "autógeno" significa un método in vivo en el que se utiliza sangre, tejido y/o célula de un solo donante y en que la sangre, el tejido y/o la célula extraídos de este donante están destinados para su uso en el mismo donante. Por el contrario, los métodos "alogénicos" utilizan sangre, tejido y/o células de uno o más terceros 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 terceros, como por ejemplo el cribado para asegurar que el donante era biológicamente o inmunológicamente compatible con el paciente y la posible contaminación con hepatitis, VIH, prión, enfermedad de Creutzfeld-Jacob y similares. La expresión "activador de coagulación" significa un agente, por ejemplo una enzima, que es capaz de activar la coagulación de la agregación de plasma y plaquetas. Un activador de coagulación comprende un activador de trombina y/o un activador de fibrinógeno y/o trombina y/o una trombina autóloga y/o un sebo de trombina autóloga y/o cloruro de calcio y/o gluconato de calcio. La coagulación puede combinarse para cambiar la rigidez de las composiciones.

30 **[0039]** La expresión "activador de trombina" significa un agente que es capaz de activar la trombina y para desencadenar coagulación. Los activadores de trombina típicos son ciertos cofactores, tales como sodio o calcio. En la práctica de esta invención, la activación de la trombina se produce preferiblemente en presencia de iones de calcio. Los iones de calcio se añaden generalmente al concentrado de plaquetas como una solución de sal para proporcionar una concentración final generalmente de aproximadamente 0,1 mg/ml de concentrado de plaquetas. Las sales de calcio adecuadas incluyen, sin limitación, CaCO<sub>3</sub>, CaSO<sub>4</sub> o CaCl<sub>2</sub>. Una sal de calcio preferida para uso en la invención es gluconato de calcio (CaGL). CaGL está disponible como inyección en gel de calcio, USP 10% (Regen Lab, Suiza). La expresión "activador de fibrinógeno" significa un agente que es capaz de activar la conversión de fibrinógeno en fibrina y desencadena la formación del coágulo. Los activadores típicos de fibrinógeno son trombina o batroxobina. El término trombina puede incluir trombina calcificada, en particular, de aproximadamente 100 a aproximadamente 10 unidades de trombina por 1 ml de solución acuosa de gluconato de calcio al 10%; puede incluir trombina bovina calcificada, trombina alogénica o trombina humana recombinante, preferiblemente trombina autóloga. Un activador de fibrinógeno puede ser una composición de trombina enriquecida tal como composiciones de trombina como se describe en el documento US 6.472.162 o un suero de trombina autóloga. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad o las cantidades de los elementos constituyentes o la combinación de los mismos necesarias para mejorar la cicatrización de heridas tal como, por ejemplo, la reducción en el volumen o superficie de una herida, el aumento en la cantidad de tejido de granulación u otro material biológico que facilita el establecimiento del colágeno, el crecimiento vascular, la proliferación de fibroblastos o la cicatrización global; Se supone que todas las versiones de la invención descritas en la presente invención tienen la o las cantidades terapéuticamente eficaces de sustancias constituyentes, o combinaciones de las mismas. Por la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se pretende un ingrediente adicional farmacéuticamente aceptable tal como estabilizantes, agentes antimicrobianos, tampones, coadyuvantes, anestésicos, corticosteroides y similares. Por expresión "vehículo cosméticamente aceptable" se pretende un ingrediente adicional cosméticamente aceptable tal como estabilizantes, tampones, agentes colorantes, agentes aromatizantes, adyuvantes y similares.

55 **[0040]** La expresión "copolímero de olefina cíclica" (COC) o "polímero de olefina cíclica" (COP) significa un polímero amorfo, copolímero de etileno; COC; COP; ciclo olefinocopolímero; polímero olefinico cíclico; copolímero de etileno-norborneno. Los COP utilizan un solo tipo de monómero mientras que los COC usan diferentes tipos de monómeros. La descripción abarca copolímeros de olefina cíclica basados en diferentes tipos de monómeros cíclicos y métodos de polimerización. Los copolímeros o polímeros de olefina cíclica pueden producirse por copolimerización en cadena de monómeros cíclicos tales como 8,9,10-trinorborn-2-eno (norborneno) o 1,2,3,4,4a,5,8,8a-octahidro-1,4:5,8-dimetano-naftaleno con eteno, TOPAS de Ticona, APEL de Mitsui Chemical, o por polimerización de metátesis de apertura de anillo de varios monómeros cíclicos seguido de hidrogenación (por ejemplo, ARTON de Japan Synthetic Rubber, Zeonx Zeon Chemical de Zeon y Zeonor).

65 **[0041]** La expresión "ácido hialurónico" (también llamado hialuronano o hialuronato) significa un tensioactivo

aniónico, glicosaminoglicano no sulfado distribuido ampliamente en tejidos conectivos, epiteliales, y neuronales. Es único entre los glicosaminoglicanos en que no es sulfatado, se forma en la membrana plasmática en lugar del Golgi, y puede ser muy grande, con su peso molecular alcanzando a menudo el millón. Uno de los principales componentes de la matriz extracelular, hialuronano contribuye significativamente a la proliferación celular y la migración.

**[0042]** La expresión "quitosano" significa un polisacárido lineal compuesto de D-glucosamina enlazada a  $\beta$ -(1-4) (unidad desacetilada) y N-acetilo-D-glucosamina (unidad acetilada) distribuidas al azar. El quitosano es producido comercialmente por desacetilación de quitina, que es el elemento estructural en el exoesqueleto de los crustáceos (cangrejos, camarones, etc.) y las paredes celulares de los hongos. El grado de desacetilación (% DD) se puede determinar por espectroscopia de RMN, y el %DD en quitosanos comerciales está en el intervalo de 60-100%. En promedio, el peso molecular del quitosán producido comercialmente está entre 3800 y 20.000 daltons. Un método común para la síntesis de quitosano es la desacetilación de la quitina usando hidróxido de sodio en exceso como reactivo y agua como disolvente. Esta ruta de reacción, cuando se permite que se complete (desacetilación completa), produce hasta un 98% de producto. El grupo amino en quitosán tiene un valor de pKa de ~ 6,5, lo que conduce a una protonación en ácido a solución neutral con una densidad de carga dependiente del pH y del valor %DA. Esto hace que el agua de quitosano soluble y un bioadhesivo que se une fácilmente a las superficies cargadas negativamente, como las membranas mucosas. El quitosano mejora el transporte de fármacos polares a través de las superficies epiteliales y es biocompatible y biodegradable.

**[0043]** En un aspecto, el presente documento describe un procedimiento o método para la preparación de suero de la trombina, comprendiendo las etapas de:

- a) Recoger sangre entera preferentemente en un tubo que contiene preferiblemente un gel tixotrópico,
- b) Centrifugar el tubo hasta liberar el suero de trombina, y
- c) Recoger el suero de trombina.

**[0044]** El acto de extracción de sangre inicia reacciones de coagulación, y a menos que se haga algo para detener el proceso, se formaría naturalmente un coágulo.

**[0045]** Preferiblemente, el gel tixotrópico se encuentra cerca de la parte inferior del tubo. Durante la centrifugación, los glóbulos rojos migrarán bajo el gel. Mientras tanto, la polimerización del fibrinógeno ocurre con la formación de un coágulo en el gel. Bajo suficiente fuerza de centrifuga y/o suficiente tiempo de centrifugación, este coágulo se precipitará adicionalmente formando una malla de fibrina que liberará un supernatante líquido llamado suero que comprende trombina activada enriquecida. La trombina es una enzima que estimula la coagulación.

**[0046]** Ventajosamente, un suero de trombina según la invención puede obtenerse en pocos pasos sólo mediante la centrifugación de un tubo que contiene la sangre entera y un gel tixotrópico durante suficiente tiempo de centrifugación. Ventajosamente, el método para la preparación de suero de trombina de acuerdo con la descripción proporciona un suero de trombina listo para usar.

**[0047]** El suero de trombina en el presente documento también se denomina preparación enriquecida por trombina, suero de trombina enriquecido, suero de trombina activado enriquecido, preparación de trombina activada enriquecida, suero activado por trombina rica, preparación activada rica en trombina.

**[0048]** En otro aspecto, el presente documento describe un procedimiento o método para la preparación de suero de la trombina, formado por las etapas de:

- a) Recoger sangre entera preferentemente en un tubo que contiene preferiblemente un gel tixotrópico,
- b) Centrifugar el tubo hasta que los glóbulos rojos migren bajo el gel tixotrópico y preferiblemente hasta la formación de una malla de fibrina sobre el gel tixotrópico, y
- c) Recoger el sobrenadante o el suero de trombina.

**[0049]** En una realización preferida de la invención, la etapa de centrifugación se realiza a una fuerza de aproximadamente 1500 g durante aproximadamente 30 minutos. En una realización adicional, la etapa de centrifugación se lleva a cabo con una fuerza entre aproximadamente 1000 g y hasta aproximadamente 2000 g durante un tiempo seleccionado entre aproximadamente 20 minutos y aproximadamente 40 minutos, preferiblemente a 1500 g durante un tiempo seleccionado entre aproximadamente 25 minutos y aproximadamente 35 min, preferiblemente a 1500 g durante aproximadamente 30 min.

**[0050]** Preferiblemente, la etapa de centrifugación se realiza en una longitud suficiente de tiempo hasta la liberación de suero de trombina.

**[0051]** Ventajosamente, los métodos de la presente descripción permiten la conservación del suero líquido, manteniéndose la trombina soluble.

**[0052]** Los métodos estándar consisten en triturar el coágulo hasta la liberación de suero de trombina. Ventajosamente, esta etapa no es necesaria en la preparación de un suero de trombina de acuerdo con la presente descripción. Este suero de trombina alternativo puede usarse también como una preparación enriquecida por suero de trombina en el contexto de la invención.

**[0053]** Ventajosamente, no se utiliza ningún agente de coagulación y, la coagulación se produce de forma espontánea. Esto tiene las ventajas de ahorrar costes y simplificar el proceso. Al no estar presente citrato en el tubo, ventajosamente no es necesario un agente de coagulación (también denominado agente restaurador) para iniciar la coagulación. Ventajosamente, no se requiere solución de etanol y/o cloruro de calcio.

**[0054]** Ventajosamente, el proceso o método para la preparación de suero de la trombina en el presente documento descrito es simple de realizar, lo que exige una cantidad reducida de tiempo de la presencia humana al no requerirse la trituración del coágulo, representando una ventaja económica sobre los viejos métodos de preparación.

**[0055]** Un suero de trombina autóloga alternativo a ser utilizado como una preparación enriquecida de trombina en el contexto de la divulgación se prepara mediante un viejo proceso que comprende la adición a toda muestra de sangre de un paciente (por ejemplo, 10 ml) se recogió en un tubo, un 95 % v. solución de etanol (por ejemplo, 1 mL) y cloruro de calcio 10% (por ejemplo, 1 mL). La mezcla se deja luego precipitar durante aproximadamente 30 min a temperatura ambiente.

**[0056]** Después de 30 min, casi el 80% de la anti-trombina (entre otras proteínas como el fibrinógeno) se precipita; entonces el tubo se centrifuga a aproximadamente 1500 g durante aproximadamente 8 a 10 min y el suero de trombina autóloga está listo para usarse en combinación con un concentrado rico en plaquetas.

**[0057]** Preferiblemente, en el presente documento se describe un procedimiento o método para la preparación de suero de trombina autóloga. Preferiblemente, todos los aspectos y/o realizaciones de la presente invención son para uso autólogo. De acuerdo con lo expuesto, se describe un método para preparar un suero de trombina completamente autólogo en el que el donante y receptor es la misma persona o animal.

**[0058]** En una realización de la divulgación, el tubo para la preparación de suero de la trombina es de vidrio, preferiblemente un tubo separador de vidrio que contiene un gel tixotrópico a base de poliéster.

**[0059]** En una realización más preferida, el método para la preparación del suero de trombina utiliza un tubo según la invención en el que no se añade citrato.

**[0060]** En otro aspecto, el presente documento describe un procedimiento o método para la preparación de una composición de curador de herida o tejido, que comprende las etapas de:

- a) Recoger sangre entera preferentemente en un tubo que contiene preferiblemente un gel tixotrópico,
- b) Centrifugar el tubo preferentemente hasta la liberación del suero de trombina,
- c) Recoger el sobrenadante o suero de trombina, y
- d) Adición del suero de trombina con una composición de PRP o una composición de concentrado de plaquetas aislada.

**[0061]** En otro aspecto, el presente documento describe un procedimiento o método para la preparación de una composición de curador de herida o tejido, una composición celular y/o una preparación celular que comprende las etapas de:

- a) Recoger sangre entera preferentemente en un tubo que contiene preferiblemente un gel tixotrópico,
- b) Centrifugar el tubo preferentemente hasta la liberación del suero de trombina,
- c) Recoger el suero de trombina,
- d) Mezclar el suero de trombina con una composición PRP o una composición de concentrado aislado de plaquetas, y
- e) Mezclar la composición resultante de la etapa d) con un extracto de células, composición de células, TCP, quitosano, ácido hialurónico, crema, máscara de crema, células de grasa, tejido de grasa, concentrado de médula ósea, lubricina, cd-gelatina, toxina botulínica y/o células madre.

**[0062]** En una realización, toda la sangre se recoge en al menos un tubo. El tubo puede en este documento denominarse un tubo separador. Preferiblemente, todos los métodos y/o procedimientos de la presente invención pueden utilizar uno o más tubos de acuerdo con la invención.

**[0063]** En una realización, todos los métodos y/o procedimientos de la presente invención pueden usar toda la sangre recogida en un dispositivo de sistema de bolsa de sangre o tubos de recogida de sangre de acuerdo con la invención o un dispositivo o kit que comprende tal sistema de bolsa de sangre o dispositivo de tubos de recogida de sangre.

**[0064]** Un tubo de "vacío" se refiere aquí a un tubo en el que no hay sustancias, no hay composiciones o también se han insertado y/o añadido en el tubo.

5 **[0065]** Cualquier proceso o método de la presente invención se pueden preparar usando al menos un tubo de acuerdo con la invención.

**[0066]** En otro aspecto, el presente documento describe un procedimiento o método para la preparación de una composición de curador de herida o composición de curador de tejido, que comprende las etapas de:

- 10 a) Recogida de sangre total en un tubo,  
b) Centrifugación del tubo,  
c) Recogida del coágulo.

15 **[0067]** Ventajosamente, ningún agente de coagulación se usa para la preparación de la composición de curador de herida o la composición de curador de tejido. Ventajosamente, la composición de curador de herida o composición de curador de tejido representa una composición lista para usar. Tal composición se puede aplicar directamente sobre las úlceras diabéticas.

20 **[0068]** Preferiblemente, el proceso o método para la preparación de una composición de curador de herida o composición de curador de tejido para uso en odontología y/o ortopedia.

25 **[0069]** En otro aspecto, el presente documento describe una composición de curador de heridas composición de curador de tejido que comprende un coágulo para uso en odontología, ortopedia, artritis, pseudo-artritis o más. En una realización, la composición de curador de herida o composición de curador de tejido formada por el coágulo se aplica en una cavidad dental, en una úlcera diabética, úlcera de perforación, úlcera de perforación diabética, u otros. Método de tratamiento y uso de la composición de curador de herida o composición de curador de tejido que comprende un coágulo también se describe.

30 **[0070]** En una realización, la composición de curador de herido o composición de curador de tejido pueden combinarse con el fosfato tricálcico (TCP) o con cualquier sustituto óseo preferiblemente antes de la formación del coágulo.

**[0071]** La composición de curador de heridas que comprende TCP se puede preparar preferentemente en un vial.

35 **[0072]** En una realización, la composición de curador de heridas o composición de curador de tejido pueden combinarse con ácido hialurónico (HA) preferiblemente antes de la formación del coágulo.

40 **[0073]** En otro aspecto, la presente invención proporciona un método o proceso para la preparación de una composición de concentrado de plaquetas o la composición de plasma rico en plaquetas, que comprende las etapas de:

- 45 a) Centrifugación de la sangre entera en un tubo según la invención comprende preferiblemente citrato sódico y un gel tixotrópico, y  
b) Recogida del plasma rico en plaquetas.

**[0074]** La etapa de centrifugación eliminará los glóbulos rojos (GR) del plasma. La fase superior es un plasma rico en plaquetas (PRP), y la fase inferior es sangre entera anticoagulada menos el plasma rico en plaquetas.

50 **[0075]** Preferiblemente, la etapa de centrifugación se realiza a una fuerza de o aproximadamente 1500 g hasta aproximadamente 2000 g. Preferentemente, la etapa de centrifugación se realiza en un período de tiempo suficiente para formar una barrera entre el plasma que contiene las plaquetas, los linfocitos y los monocitos y el gel que contiene los eritrocitos.

55 **[0076]** Preferiblemente, la etapa de separación b) se hace recogiendo el sobrenadante desde lo alto de dicha barrera. En una realización, el plasma rico en plaquetas enriquecido se separa del plasma completo mediante la eliminación de la mitad del sobrenadante que contiene el plasma pobre en plaquetas. Preferentemente, el plasma enriquecido está enriquecido en leucocitos, trombocitos y proteínas de adhesión (por ejemplo, fibronectina (proteína soluble) o vitronectina (proteína secretada por las plaquetas)) en comparación con la sangre entera nativa.

60 **[0077]** En una realización, el tubo utilizado para la preparación de plasma rico en plaquetas se selecciona de:

- i) un tubo separador de vidrio que contiene un gel tixotrópico a base de poliéster y una solución de citrato sódico tamponada a 0,10 M,  
ii) un tubo separador de tereftalato de polietileno que contiene un gel altamente tixotrópico formado por una mezcla de polímero y un citrato sódico anhidro en 3,5 mg/ml,  
iii) un tubo separador de olefina cíclica (COC) o polímero de olefina cíclica (COP) que contiene un gel tixotrópico
- 65

a base de poliéster y una solución de citrato de sodio tamponada a 0,10 M, o

iv) un tubo separador de filtro de copolímero de olefina cíclica (COC) o polímero de olefina cíclica (COP) que contiene una solución de citrato sódico tamponada a 0,10 M o un citrato sódico anhidratado a 3,5 mg/mL.

5 **[0078]** En una realización más preferida, el método para la preparación de un concentrado de plaquetas utiliza un tubo según la invención con la adición de citrato (por ejemplo, una solución de citrato sódico tamponado a 0,10 M o un citrato sódico anhidro a 3,5 mg/ml).

10 **[0079]** En otro aspecto, la presente invención proporciona un método o proceso para la preparación de una composición de curador de herida o curador de tejido, que comprende las etapas de:

a) Centrifugación de la sangre entera en un tubo según la invención comprende preferiblemente citrato sódico y un gel tixotrópico,

b) Recogida del plasma rico en plaquetas, y

15 c) Mezcla del plasma rico en plaquetas con un extracto celular, composición de células, TCP, quitosano, ácido hialurónico, crema, máscara de crema, células de grasa, tejido graso, concentrado de médula ósea, lubricina, cd-gelatina, toxina botulínica y/o células madre.

20 **[0080]** En otro aspecto, el presente documento describe una composición de curador de herida o curador de tejido:

a) un plasma rico en plaquetas o concentrado de plasma y

b) TCP, quitosano, ácido hialurónico, crema, máscara de crema, células de grasa, tejido graso, concentrado de médula ósea, lubricina, cd-gelatina, toxina botulínica y/o células madre.

25 **[0081]** En otro aspecto, el presente documento describe una composición de curador de herida o curador de tejido:

a) un suero de trombina,

b) un plasma rico en plaquetas o concentrado de plasma, y

30 c) TCP, quitosano, ácido hialurónico, crema, máscara de crema, células de grasa, tejido graso, concentrado de médula ósea, lubricina, cd-gelatina, toxina botulínica y/o células madre.

**[0082]** La formación de un coágulo es un proceso de múltiples pasos o cascada y varios de estos pasos requieren la presencia de iones de calcio. Mediante la eliminación de los iones de calcio presentes en la sangre entera, como es el efecto cuando se recoge la sangre en citrato, se puede evitar que la sangre se coagule. Un agente quelante de calcio es una sustancia química que reacciona con el calcio, presente en la sangre, de tal manera que el calcio ya no puede funcionar en coagulación de sangre. El agente quelante más común es una sal de ácido cítrico (citrato), ya que tiene menos efectos secundarios sobre los componentes del sistema de coagulación. Por la recogida de sangre en un medio que contiene un agente quelante de calcio, tal como citrato, recogida de muestras y otras preparaciones de la muestra citrada se puede realizar durante un período de tiempo de hasta varias horas. El agente quelante de calcio preferido es citrato sódico.

**[0083]** Mientras que un medio de recogida de citrato sódico de 3,5 mg/ml es el que se utiliza con frecuencia para recoger y conservar sangre, la persona experta en esta técnica reconocerá que la relación de citrato sódico a la sangre completa podría estar en un intervalo diferente.

45 **[0084]** En otro aspecto, el presente documento describe una composición de concentrado de plaquetas aislada que comprende:

a) plasma;

50 b) plaquetas a una concentración de al menos  $300 \times 10^9$  células/L;

c) células blancas de sangre a una concentración de al menos  $7 \times 10^9$  células/L;

d) fibrinógeno a una concentración de al menos 3 mg/L;

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

55 **[0085]** Una composición de plasma rico en plaquetas también se denomina composición de concentrado de plasma en la presente memoria.

60 **[0086]** En una realización, una composición de concentrado de plaquetas o composición de plasma rico en plaquetas puede combinarse con fosfato tricálcico (TCP) y/o cualquier sustituto para el uso como corrector de volumen (TCP en 10-30 micras), en odontología, ortopedia (TCP a 50 micras).

**[0087]** En otro aspecto, el presente documento describe un método o proceso para la preparación de una composición de curador de herida o composición de curador de tejido, que comprende las etapas de:

65 a) Centrifugación de la sangre entera en un tubo que comprende ácido hialurónico,

- b) Separación opcional del plasma rico en plaquetas enriquecido y ácido hialurónico a partir del plasma completo, y
- c) Mezcla opcional del plasma rico en plaquetas enriquecido y ácido hialurónico.

5 **[0088]** Preferiblemente, el tubo comprende ácido hialurónico, preferentemente en la parte inferior del tubo, seguido de un gel tixotrópico y luego un anticoagulante, preferentemente citrato sódico (Figura 16).

10 **[0089]** Preferiblemente, la etapa de separación b) se hace recogiendo el sobrenadante que contiene el plasma rico en plaquetas enriquecido y ácido hialurónico desde lo alto de dicha barrera. En una realización, el plasma rico en plaquetas enriquecido y ácido hialurónico se separa del plasma completo mediante la eliminación de la mitad del sobrenadante que contiene el plasma pobre en plaquetas. Preferiblemente, el plasma enriquecido está enriquecido en leucocitos, trombocitos y proteínas de adhesión (por ejemplo, fibronectina (proteína soluble) o vitronectina (proteína secretada por las plaquetas)) en comparación con la sangre entera nativa.

15 **[0090]** En otro aspecto, la invención proporciona un proceso o método para la preparación de una composición de curador de herida o composición de curador de tejido, que comprende las etapas de:

- a) Recogida de sangre completa preferiblemente en un tubo que contiene ácido hialurónico, un gel tixotrópico y/o un preferiblemente citrato sódico anticoagulante,
- 20 b) Centrifugación del tubo preferiblemente hasta que la migración de las células rojas de la sangre bajo el gel tixotrópico y preferiblemente hasta que la migración de ácido hialurónico por encima del plasma enriquecido,
- c) Mezcla opcional del ácido hialurónico y plasma enriquecido, preferiblemente invirtiendo el tubo,
- d) Recogida del sobrenadante que contiene el ácido hialurónico y plasma enriquecido, y
- 25 e) Mezcla opcional adicional de dicho ácido hialurónico y dicho plasma enriquecido.

30 **[0091]** En otro aspecto, la invención proporciona un proceso o método para la preparación de una composición de curador de herida o composición de curador de tejido, que comprende las etapas de:

- a) Recogida de sangre completa preferiblemente en un tubo que contiene ácido hialurónico, un gel tixotrópico y/o preferiblemente un citrato sódico anticoagulante,
- 35 b) Centrifugación del tubo preferiblemente hasta la formación de una capa de ácido hialurónico como primera capa de la parte superior del tubo seguido por una segunda capa que consiste en plasma o PRP enriquecido,
- c) Mezcla opcionalmente del ácido hialurónico y plasma enriquecido, invirtiendo preferiblemente el tubo,
- d) Recogida del sobrenadante que contiene el ácido hialurónico y el plasma enriquecido, y
- e) Mezcla opcionalmente además de dicho ácido hialurónico y dicho plasma enriquecido.

40 **[0092]** La etapa de centrifugación eliminará los glóbulos rojos (GR) desde el plasma. Después de la centrifugación, la fase superior es el ácido hialurónico con debajo de un plasma rico en plaquetas (PRP), seguido por el gel tixotrópico y la fase inferior es sangre entera anticoagulada que contiene las células rojas de la sangre menos el plasma rico en plaquetas (Figura 16). Durante la centrifugación, ácido hialurónico migra por encima de plasma (Figura 16).

45 **[0093]** Preferiblemente, el tubo contiene aproximadamente 1 ml a aproximadamente 2 ml de ácido hialurónico, aproximadamente 2 g de selector de células o gel tixotrópico y aproximadamente 1 ml de citrato sódico a 0,109 M.

50 **[0094]** Una representación esquemática del método para la preparación de una composición de curador de herida comprendiendo ácido hialurónico y PRP se proporciona en la Figura 16.

55 **[0095]** Preferiblemente, el plasma rico en plaquetas enriquecido y el ácido hialurónico se mezclan mediante simple inversión del tubo.

**[0096]** Ventajosamente, cuando se mezcla el plasma rico en plaquetas enriquecido y ácido hialurónico, el ácido hialurónico se expande inflado por plasma y las células.

60 **[0097]** Ventajosamente, la composición de curador de heridas o composición de curador de tejido obtenida es una composición lista para uso. Ventajosamente, la composición de curador de heridas o composición de curador de tejido obtenida es un gel viscoso o pegamento biológico adecuado para la inyección, y por ejemplo se puede usar como soporte mecánico o de relleno.

65 **[0098]** Ventajosamente, el método o proceso para la preparación de una composición de curador de heridas o composición de curador de tejido o gel viscoso es económico, simple y rápido.

**[0099]** Preferiblemente, la etapa de centrifugación se realiza en un período de tiempo suficiente hasta la migración de las células rojas de la sangre bajo el gel tixotrópico y preferiblemente hasta la migración de ácido hialurónico por encima del plasma enriquecido.

- 5 **[0100]** En una realización preferida de la invención, la etapa de centrifugación se realiza a una fuerza de aproximadamente 1500 g durante aproximadamente 5 minutos. En una realización adicional, la etapa de centrifugación se realiza a fuerza de entre aproximadamente 1000 g y hasta aproximadamente 2000 g durante un tiempo seleccionado de aproximadamente 3 min hasta aproximadamente 7 min, preferiblemente a 1500 g durante un tiempo seleccionado de aproximadamente 3 min hasta aproximadamente 7 min.
- 10 **[0101]** En otro aspecto, el presente documento describe un tubo que comprende ácido hialurónico y un anticoagulante. En otro aspecto de la invención, la invención proporciona un tubo que comprende ácido hialurónico, un anticoagulante y sangre entera. Preferiblemente, el anticoagulante es citrato sódico.
- 15 **[0102]** En otro aspecto, la invención proporciona un tubo que comprende ácido hialurónico y un gel selector de células. En otro aspecto, la invención proporciona un tubo que comprende ácido hialurónico, un gel selector de células y sangre entera. Preferiblemente, el gel selector de células es un gel tixotrópico.
- 20 **[0103]** En otro aspecto, la invención proporciona un tubo que comprende ácido hialurónico, un anticoagulante y un gel selector de células. En otro aspecto, la invención proporciona un tubo que comprende ácido hialurónico, un anticoagulante, un gel selector de células y sangre entera. Preferiblemente, el anticoagulante es citrato sódico. Preferiblemente, el gel selector de células es un gel tixotrópico. Preferiblemente, el ácido hialurónico se encuentra en la parte inferior del tubo, seguido de un gel tixotrópico y por encima de un anticoagulante, preferentemente citrato sódico (Figura 16).
- 25 **[0104]** En otro aspecto, el presente documento describe un tubo que comprende ácido hialurónico y PRP. En otro aspecto, la invención proporciona un tubo que comprende ácido hialurónico, PRP y un gel selector de células. En otro aspecto, el presente documento describe un tubo que comprende ácido hialurónico, PRP y un anticoagulante. En otro aspecto, la invención proporciona un tubo que comprende ácido hialurónico, PRP, un anticoagulante y un gel selector de células. Preferiblemente, el anticoagulante es citrato sódico. Preferiblemente, el gel selector de células es un gel tixotrópico.
- 30 **[0105]** Preferiblemente, un tubo de acuerdo con la invención se utiliza en un método o procedimiento de acuerdo con la invención.
- 35 **[0106]** En otro aspecto, el presente documento describe una composición que comprende ácido hialurónico y PRP. En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende ácido hialurónico y PRP, en la que la composición se obtiene mediante un procedimiento para la preparación de una composición curador de heridas o composición de curador de tejido de acuerdo con la invención.
- 40 **[0107]** En otro aspecto, la invención proporciona un kit o dispositivo médico que comprende un tubo de acuerdo con la invención.
- 45 **[0108]** En realizaciones adicionales, la invención proporciona un tubo, que puede ser utilizado para la preparación de una composición de curador de herida o composición de curador de tejido, seleccionada a partir de:
- i) un tubo separador de vidrio que contiene un gel tixotrópico a base de poliéster, una solución de citrato sódico tamponada en 0,10 M y ácido hialurónico,
  - ii) un tubo separador de tereftalato de polietileno que contiene un gel altamente tixotrópico formado por una mezcla de polímeros, un citrato sódico anhidro a 3,5 mg/m y ácido hialurónico,
  - iii) un tubo separador de copolímero de olefina cíclica (COC) o polímero de olefina cíclica (COP) que contiene un gel a base de poliéster tixotrópico, una solución de citrato sódico tamponada a 0,10 M y ácido hialurónico, o
  - iv) un tubo de separador de filtro de copolímero de olefina cíclica (COC) o polímero de olefina cíclica (COP) que
- 50 contiene ácido hialurónico y una solución de citrato sódico tamponada a 0,10 M o un citrato sódico anhidro a 3,5 mg/mL.
- 55 **[0109]** En otras realizaciones preferidas, la invención proporciona un tubo de acuerdo con la invención, que puede usarse para la preparación de una composición de curador de herida o la composición de curador de tejido, que comprende además citrato y ácido hialurónico (por ejemplo, ácido hialurónico y una solución tamponada de sodio citrato a 0,10 M o un citrato sódico anhidro a 3,5 mg/ml).
- 60 **[0110]** Preferiblemente, ningún ftalato se emplea para el uso humano.
- 65 **[0111]** Alternativamente, la hirudina, bencilsulfonilo-d-Arg-Pro-4-amidinobencilamida (PABA), heparina, citrato, dextrosa de citrato ácido (ACD), citrato-teofilina-adenosina-dipiridamol (CTAD) o potasio-etilenediaminetetra-ácido (EDTA) se puede usar como anticoagulantes.
- [0112]** En otro aspecto, el presente documento describe una composición de curador de herida o composición de curador de tejido comprendiendo:

- a) plasma;
- b) plaquetas a una concentración de al menos  $300 \times 10^9$  células/L;
- c) células blancas de sangre a una concentración de al menos  $7 \times 10^9$  células/L;
- d) fibrinógeno a una concentración de al menos 3 mg/L;
- e) aproximadamente 1 ml a aproximadamente 2 ml de ácido hialurónico;

y en donde la concentración de eritrocitos es menor que  $0.6 \times 10^{12}$  células/L.

**[0113]** En una realización, una composición de curador de heridas o composición de curador de tejido pueden combinarse con el fosfato tricálcico (TCP) y/o cualquier sustituto para el uso como corrector de volumen (TCP en 10-30 micras), en odontología, ortopedia (TCP a 50 micras).

**[0114]** En una realización, una composición de curador de herida, una composición de curador de tejido, un agente hemostático, una composición de concentrado de plaquetas, una composición de plasma rico en plaquetas se puede combinar en el tubo de recogida de sangre con ácido hialurónico.

**[0115]** En otro aspecto, el presente documento describe un proceso o un método para la preparación de un agente hemostático, una composición de curador herida o composición de curador de tejido, que comprende la etapa de mezclar un suero de trombina o suero de trombina con una composición de plasma rico en plaquetas, una composición de plasma rico en plaquetas, composición de curador de heridas o composición de curador de tejido.

**[0116]** En otro aspecto, el presente documento describe un procedimiento o método para la preparación de una composición de curador de heridas o composición de curador de tejido o agente hemostático que comprende:

- a) Proporcionar un concentrado de plaquetas o concentrado de plaquetas,
- b) Mezclar el concentrado de plaquetas con un activador de coagulación, suero de trombina o suero de trombina, y
- c) Mezclar opcionalmente un extracto celular, tal como extracto de queratinocitos, médula ósea, fibroblastos, periostio o células de la córnea, melanocitos y células de Langheran; células grasas; células del músculo, tales como mioblastos y células de satélite; osteoblastos; condrocitos; células progenitoras de sangre, células del cordón umbilical; células madre mesenquimales (MSCs), preadipocitos, células pre-endorheliales, células de Schwann o células de tendón de Aquiles.

**[0117]** Preferiblemente, un concentrado autólogo de plaquetas, una trombina autóloga y/o un extracto celular autólogo se utiliza(n). Más preferiblemente, se utilizan un concentrado autólogo de plaquetas y una trombina autóloga y un extracto celular autólogo. Preferiblemente, se utilizan tubos de acuerdo con la invención.

**[0118]** En otro aspecto, el presente documento describe un procedimiento o método para la preparación de una composición de curador de herida o composición de curador de tejido o agente hemostático que comprende:

- a) mezclar un concentrado de plaquetas con un suero de trombina autóloga, y
- b) mezclar opcionalmente al menos un extracto de células autólogas, tal como extracto de los queratinocitos, médula ósea, fibroblastos, periostio o células de la córnea, melanocitos y células de Langheran; células grasas; células del músculo, tales como mioblastos y células satélite; osteoblastos; condrocitos; células de cordón umbilical; células madre mesenquimales (MSC), preadipocitos, células pre-endorheliales, células de Schwann o células del tendón de Aquiles.

**[0119]** En otro aspecto, el presente documento describe un procedimiento o método para la preparación de una composición de curador de herida o composición de curador de tejido o agente hemostático que comprende:

- a) mezclar un concentrado de plaquetas autólogas con un suero de trombina, en el que el concentrado de plaquetas autólogas y/o el suero de trombina se preparan usando tubos, y
- b) mezclar opcionalmente al menos un extracto de células autólogas, tal como extracto de los queratinocitos, médula ósea, fibroblastos, células del periostio o corneales, melanocitos y células de Langheran; células grasas; células del músculo, tales como mioblastos y células satélite; osteoblastos; condrocitos; células de cordón umbilical; células madre mesenquimales (MSC), preadipocitos, células pre-endorheliales, células de Schwann o células del tendón de Aquiles.

**[0120]** En otro aspecto, el presente documento describe un procedimiento o método para la preparación de una composición de curador de herida o composición de curador de tejido o agente hemostático que comprende:

- a) Proporcionar un concentrado de plaquetas, preferiblemente un concentrado de plaquetas autólogo,
- b) Mezclar el concentrado de plaquetas con un suero de trombina, y
- c) Mezclar opcionalmente al menos un extracto de células, preferiblemente un extracto celular autólogo, tal como extracto de los queratinocitos, la médula ósea, los fibroblastos, periostio o células de la córnea, melanocitos y células de Langheran; células grasas; células del músculo, tales como mioblastos y células satélite; osteoblastos;

condrocitos; células de cordón umbilical; las células madre mesenquimales (MSCs), preadipocitos, células pre-  
endoteliales, células de Schwann o células de tendón de Aquiles.

5 **[0121]** Preferiblemente, la invención proporciona un método o proceso para la preparación de una composición de  
curador de herida autóloga o composición de curador de tejidos o agente hemostático. Una composición de curador  
de heridas autóloga o composición de curador de tejidos o agente hemostático en este documento significa una  
composición en la que o bien el concentrado de plaquetas o bien el suero de trombina es autólogo.

10 **[0122]** En un aspecto más preferido, la invención proporciona un método o proceso para la preparación de una  
composición de curador de heridas completamente autóloga o composición de curador de tejidos o agente  
hemostático. Una composición de curador de herida completamente autóloga o composición de curador de tejidos o  
agente hemostático en este documento significa una composición en la que tanto el concentrado de plaquetas como  
el suero de trombina son autólogos. En este aspecto preferido de la invención, todos los componentes de la sangre  
15 para la composición de curador de heridas o composición de curador de tejido o agente hemostático se derivan del  
mismo paciente o animal al que se aplicará la composición de curador de herida o composición de curador de tejidos  
o agente hemostático.

20 **[0123]** En otro aspecto, la invención proporciona un método o proceso para la preparación de una composición de  
curador de heridas o composición de curador de tejido completamente autólogo o agente hemostático en  
combinación con al menos un extracto de células autólogas. En este aspecto, el concentrado de plaqueta, el suero  
de trombina y el extracto de célula son todos autólogos y por lo tanto se derivan del mismo paciente o animal.

25 **[0124]** En otro aspecto, el presente documento describe un procedimiento o método para la preparación de una  
composición de curador de herida autólogo o composición de curador de tejido autólogo o agente hemostático  
autólogo que comprende:

- 30 a) Mezclar un concentrado de plaquetas autólogas con un suero de trombina autóloga, y  
b) Mezclar opcionalmente al menos un extracto de células, tal como extracto de queratinocitos, médula ósea,  
fibroblastos, periostio o células de la córnea, melanocitos y células de Langheran; células grasas; células  
musculares tales como mioblastos y células satélite; osteoblastos; condrocitos; células de cordón umbilical;  
células madre mesenquimales (MSCs), preadipocitos, células pre-endoteliales, células de Schwann o células  
del tendón de Aquiles,

35 en el que el concentrado de plaquetas autólogas y la trombina autóloga ambos se derivan del mismo paciente o del  
mismo animal.

40 **[0125]** En otro aspecto, el presente documento describe un procedimiento o método para la preparación de una  
composición de curador de herida autólogo o composición de curador de tejido autólogo o agente hemostático  
autólogo que comprende:

- 45 a) Mezclar un concentrado de plaquetas autólogas con un suero de trombina autóloga, y  
b) Mezclar opcionalmente al menos un extracto de células autólogas, tal como extracto de los queratinocitos,  
médula ósea, fibroblastos, periostio o células de la córnea, melanocitos y células de Langheran; células grasas;  
células del músculo, tales como mioblastos y células satélite; osteoblastos; condrocitos; células de cordón  
umbilical; células madre mesenquimales (MSC), preadipocitos, células pre-endoteliales, células de Schwann o  
células del tendón de Aquiles,

50 en el que el concentrado de plaquetas autólogas, la trombina autóloga y el extracto de células autólogas se derivan  
del mismo paciente o del mismo animal.

55 **[0126]** El plasma rico en plaquetas, plasma rico en plaquetas autólogo, suero de trombina, suero de trombina  
autóloga, composición de curador de herida o composición de curador de tejidos o agente hemostático puede  
combinarse con uno o más extractos de células. En una realización, el extracto celular se selecciona a partir de  
queratinocitos, médula ósea, fibroblastos, periostio o células de la córnea, melanocitos y células de Langheran;  
células grasas; células del músculo, tales como mioblastos y células satélite; osteoblastos; condrocitos; células de  
cordón umbilical; células madre mesenquimales (MSCs), preadipocitos, células pre-endoteliales, células de  
Schwann o células de tendón de Aquiles.

60 **[0127]** Una composición de curador de heridas o composición de curador de tejido o agente hemostático de la  
invención presente estimulará la regeneración celular, actuando como un pegamento biológico a fin de promover la  
adhesión de tejidos.

65 **[0128]** En una realización, en lugar de suero de trombina, un activador de la coagulación alternativa puede usarse tal  
como cloruro de calcio, preferiblemente gluconato de calcio.

**[0129]** En una realización, múltiples activadores de coagulación pueden usarse en combinación, preferiblemente

suero de trombina con gluconato de calcio.

5 **[0130]** Preferiblemente, el activador de coagulación o suero de trombina se mezcla con el concentrado de plaquetas en una relación de volumen (concentrado de plaquetas: activador de coagulación) de aproximadamente 10: 1 hasta aproximadamente 10: 3

10 **[0131]** En una realización preferida de la invención, el suero líquido se recoge en una proporción 1: 1, proporción 3: 1 o proporción 10: 1 al plasma rico en plaquetas. La proporción específica utilizada alterará la rigidez del agente hemostático. En una proporción de 3: 1, se obtiene un agente hemostático fuerte. Con una proporción 10: 1, se obtiene un agente más suave.

15 **[0132]** En una realización, el PRP o concentrado de plasma solo o en combinación con un extracto de células, así como preparaciones o composiciones pueden combinarse o integrarse con una matriz acelular para aplicarse directamente sobre una herida, o pueden cultivarse en el laboratorio antes de la aplicación. Una matriz de colágeno o matriz sintética se pueden usar, por ejemplo, la matriz de Integra.

20 **[0133]** Otra realización contempla la mezcla de tromboplastina humana recombinante directamente con un plasma rico en plaquetas para formar una composición de curador de herida o composición de curador de tejido o agente hemostático. Alternativamente, tromboplastina humana recombinante se utiliza para generar trombina en una pequeña alícuota de plasma y luego la trombina resultante se combina con el plasma rico en plaquetas para formar una composición de curador de heridas o composición de curador de tejido o agente hemostático.

25 **[0134]** En una realización, los tubos utilizados pueden tener superficies humectables (tales como, sílice, tierra de diatomeas, caolín, etc.) o superficies no humectables (tales como plástico, vidrio siliconado, etc.). Ya que superficies desempeñan un papel en la activación de la coagulación sanguínea, la superficie del tubo separador elegido depende de si se desea rápida o lentamente formación de coágulos. Activadores químicos, tales como caolín, también se pueden utilizar para acelerar el tiempo de coagulación; sin embargo, su posterior eliminación también sería necesaria.

30 **[0135]** Ventajosamente, la preparación de plasma rico en plaquetas, concentrado de plaquetas, suero de trombina, composición de curador de herida o composición de curador de tejidos o agente hemostático no requieren la presencia de etanol y/o calcio. Mediante el uso de trombina autóloga, la presente descripción no necesita restaurar el proceso de formación de coágulos. Como tal, no se requiere agente (o agente de restauración), tales como cloruro de calcio o gluconato de calcio para invertir los efectos del agente de anticoagulación (en la restauración de la actividad de coagulación de la sangre con citrato).

40 **[0136]** Aunque el cloruro de calcio es la sal de calcio bien conocida para su uso como agente de restauración, cualquier sal de calcio que funciona de una manera similar al cloruro de calcio puede considerarse como agente de restauración. Del mismo modo, aunque se cree que muchas reacciones de coagulación de la sangre actualmente requieren iones de calcio como cofactores, cualquier sustancia que es conocida o posteriormente encontrada que es funcionalmente equivalente al calcio en la facilitación de estas reacciones de coagulación puede considerarse como agente de restauración, ya sea individualmente o en combinación con calcio. Si el agente de anticoagulación utilizado fue heparina, a continuación, se utilizará heparinasa como agente de restauración para neutralizar el efecto del agente de anticoagulación.

45 **[0137]** Ventajosamente, el presente documento describe un plasma rico en plaquetas, concentrado de plaquetas, suero de trombina, composición de curador de herida o composición de curador de tejidos o agente hemostático en el que se eliminan los riesgos asociados con el uso de trombina bovina y humana recombinante.

50 **[0138]** Ventajosamente, una mayor concentración de PRP, factores de crecimiento, leucocitos, fibrinógeno y/o otras proteínas se obtienen con los métodos de la invención.

55 **[0139]** Ventajosamente, se obtiene una concentración 2 veces mayor de PRP, factores de crecimiento, leucocitos, fibrinógeno y/o otras proteínas en comparación con los niveles hematológicos normales.

**[0140]** Ventajosamente, los métodos de la presente invención confieren una productividad celular óptima para la expansión celular.

60 **[0141]** Ventajosamente, los métodos de la presente invención permiten la manipulación de la sangre en un circuito totalmente cerrado durante todo el proceso, desde la recogida de sangre, manipulación hasta la aplicación o inyección al paciente. Por tanto, todos los dispositivos y kits están adaptados para una manipulación de circuito totalmente cerrado con el fin de evitar el contacto directo de la sangre con el aire.

65 **[0142]** Ventajosamente, los métodos de la presente invención reducen el estrés oxidativo y reducen el tiempo de manipulación ex vivo.

**[0143]** Ventajosamente, los métodos de la presente invención permiten la formación de una membrana suturable autóloga sólida compuesta de plaquetas agregadas y el fibrinógeno polimerizado activado.

5 **[0144]** Preparaciones (por ejemplo de preparación de células de médula ósea) pueden usarse solo o mezclarse entonces a un concentrado de plaquetas o se centrifuga de nuevo con gluconato de calcio para formar una membrana suturable y se aplica o se inyecta con un aplicador para el sitio de la lesión de los pacientes.

10 **[0145]** Una preparación de células de la médula ósea es útil para el tratamiento de defecto óseo o defecto del cartílago. La preparación de células de hueso puede ser utilizada solo o en combinación con un concentrado de plasma. Una membrana de cartílago puede utilizarse también con gluconato de calcio.

15 **[0146]** En una realización preferida de la invención, la etapa de centrifugación (por ejemplo, para la membrana suturable) se realiza a una fuerza de aproximadamente 3000 g durante 15 a 25 minutos. En una realización, la etapa de centrifugación se realiza a una fuerza de entre aproximadamente 2500 g y hasta aproximadamente 3500 g durante un tiempo seleccionado de aproximadamente 10 min hasta aproximadamente 30 min.

**[0147]** En una realización, toda la sangre se recoge de un ser humano o animal. Una realización preferida consiste en recoger toda la sangre de un ser humano.

20 **[0148]** En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición de curador de heridas o tejido o agente hemoestático preparado de acuerdo con la invención comprendiendo:

- 25 a) plasma;  
 b) plaquetas a una concentración de al menos  $300 \times 10^9$  células/L;  
 c) células blancas de la sangre a una concentración de al menos  $7 \times 10^9$  células/L;  
 d) fibrinógeno a una concentración de al menos 3 mg/L;  
 e) activador de coagulación o suero de trombina autóloga,  
 30 f) opcionalmente, un extracto de células autólogas, tal como un extracto de los queratinocitos, las células de médula ósea, osteoblastos; condrocitos, fibroblastos, periostio o células corneales, melanocitos y células de Langheran; células grasas; células del músculo, tales como mioblastos y células satélite; células de cordón umbilical; células madre mesenquimales (MSCs), preadipocitos, células pre-endoteliales, células de Schwann, células de tendón o células de islotes del páncreas; y en donde la concentración de eritrocitos es menor que  $0.6 \times 10^{12}$  células/L.

35 **[0149]** En otro aspecto, el presente documento describe una composición de curador de heridas o curador de tejido o agente hemostático:

- 40 a) plasma;  
 b) plaquetas a una concentración de al menos  $300 \times 10^9$  células/L;  
 c) células blancas de la sangre a una concentración de al menos  $7 \times 10^9$  células/L;  
 d) fibrinógeno a una concentración de al menos 3 mg/L;  
 e) suero de trombina autóloga;  
 45 f) opcionalmente, un extracto de células autólogas, tal como un extracto de los queratinocitos, las células de médula ósea, osteoblastos; condrocitos, fibroblastos, o células del periostio corneal, melanocitos y células de Langheran; células grasas; células del músculo, tales como mioblastos y células satélite; células de cordón umbilical; células madre mesenquimales (MSCs), preadipocitos, células pre-endoteliales, células de Schwann, células de tendón o células de los islotes del páncreas; y en donde la concentración de eritrocitos es menor que  $0.6 \times 10^{12}$  células/L.

50 **[0150]** Preferiblemente, el activador de coagulación o suero de trombina autóloga es en una relación de volumen (concentrado de plaquetas: activador de coagulación) de aproximadamente 10: 1 a aproximadamente 10: 3.

55 **[0151]** Ventajosamente, el plasma de la presente invención representa un medio de cultivo celular sobre los conocidos. Ventajosamente, el plasma de la presente invención representa un medio ideal para el transporte de células. En consecuencia, el plasma de la presente invención contiene todas las células y factores de crecimiento para un crecimiento celular óptimo y la supervivencia. En consecuencia, el plasma de la presente invención representa un medio muy adecuado para la implantación de las células a un paciente, por ejemplo como una aplicación atópica como heridas quirúrgicas, para inyecciones anti-edad, inyecciones intra-articulares, inyecciones intra-musculares, o para el páncreas de regeneración (islotes pancreáticos).

60 **[0152]** En otro aspecto, el presente documento describe un dispositivo para la preparación de una composición de concentrado de plaquetas o la composición de plasma rico en plaquetas o agente hemostático o una composición de curador de herida de tejido o suero de trombina autóloga de acuerdo con la invención.

65 **[0153]** En otro aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo que comprende al menos un tubo de acuerdo con la invención.

**[0154]** Preferiblemente, el dispositivo tiene una entrada para introducir dicha sangre entera, se sostiene en un vacío destinado para aspirar la muestra de sangre entera, es estéril, tiene un vacío utilizable de o aproximadamente 8 a aproximadamente 10 ml y es adecuado para someterse a centrifugación.

5 **[0155]** En otro aspecto, el presente documento describe un uso de una composición de concentrado de plaquetas o la composición de plasma rico en plaquetas o agente hemostático o una composición de curador de herida de tejido o suero de trombina de acuerdo para la fabricación de un medicamento para la curación de heridas o para la promoción de hueso o crecimiento periodonto y/o hueso y/o regeneración de tejidos.

10 **[0156]** En otro aspecto, el presente documento describe un uso de la composición de concentrado de plaquetas o la composición de plasma rico en plaquetas o agente hemostático o composición de curador de heridas o tejido o suero de trombina para la fabricación de una preparación cosmética para el uso como agente anti-envejecimiento o agente de reparación de piel tal como un agente cicatriz de reparación, un relleno de arrugas y/o agente de reparación.

15 **[0157]** En otro aspecto, el presente documento describe una composición de concentrado de plaquetas o la composición o el agente hemostático o composición de curador de heridas o composición de curador de tejido o suero de trombina para su uso como preparación cosmética, la preparación estética, la gestión del envejecimiento, el volumen de plasma rico en plaquetas corrector, sensación de arrugas, reducción de un punto de color marrón y/o estimulador de cabello. En una realización, la composición de concentrado de plaquetas o composición de plasma rico en plaquetas o el agente hemostático o de composición de curador de heridas o composición de curador de tejido se aplica sobre y/o alrededor de los ojos, labios, párpados, cara, cuello, pecho, cuero cabelludo, cabello, manos y todo el resto del cuerpo y/o genitales masculinos y femeninos.

25 **[0158]** En otro aspecto, el presente documento describe una composición de concentrado de plaquetas o composición de plasma rico en plaquetas o el agente hemostático o composición de curador de heridas o composición de curador de tejido o suero de trombina para su uso en el ligamento y/o reconstitución del cartílago. De manera ventajosa, ligamento y/o tiempo de reconstitución de cartílago usando una composición de la presente invención se divide por un factor de 2 o 3 en comparación con métodos conocidos.

30 **[0159]** En una realización, la preparación cosmética y/o preparación estética se combina con un agente cosmético, crema cosmética o máscara cosmética.

35 **[0160]** En otro aspecto, el presente documento describe una composición farmacéutica que comprende una composición de concentrado de plaquetas o composición de plasma rico en plaquetas o agente hemostático o composición de curador de herida o de tejido o suero de trombina y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 **[0161]** En otro aspecto, el presente documento describe una composición cosmética comprende una composición de concentrado de plaquetas o la composición de plasma rico en plaquetas o agente hemostático o composición de curador de herida o tejido o suero de trombina y un vehículo cosméticamente aceptable.

**[0162]** En otro aspecto, el presente documento describe un dispositivo implantable para su uso en el tejido que comprende la terapia de regeneración:

- 45 a) un núcleo permeable que comprende una composición de concentrado de plaquetas o composición de plasma rico en plaquetas o el agente hemostático o la composición de curador de heridas opcionalmente en combinación con ácido hialurónico, y  
 b) opcionalmente una camisa externa que rodea dicho núcleo, comprendiendo dicha chaqueta un material biocompatible, preferiblemente biorreabsorbible, preferiblemente ácido hialurónico.

50 **[0163]** En otro aspecto, la invención proporciona un kit que comprende al menos un tubo de acuerdo con la invención.

55 **[0164]** En otro aspecto, el presente documento describe un kit que comprende un tubo para la preparación de un concentrado de plaquetas según la invención y/o un tubo para la preparación de suero de la trombina de acuerdo con la divulgación.

60 **[0165]** En otro aspecto, el presente documento describe un kit comprendiendo al menos un tubo para la preparación de una composición de concentrado de plaquetas o la composición de plasma rico en plaquetas o agente hemostático o composición de curador de heridas o de tejido o suero de trombina de acuerdo con la divulgación.

**[0166]** En una realización, el kit comprende además uno o más tubos para la preparación de una composición de concentrado de plaqueta o composición de plasma rico en plaquetas o agente hemostático o una composición de curador de herida de tejido o suero de trombina de acuerdo con la divulgación.

65 **[0167]** En una realización, el kit comprende además accesorios de flebotomía para la preparación del curador de

herida o tejido y un dispositivo de aplicación (por ejemplo, una jeringa doble) para la dispensación simultánea sobre la herida de la composición de concentrado de plaquetas o la composición de plasma rico en plaquetas o agente hemostático o una composición de curador de herida de tejido o suero de trombina de acuerdo con la divulgación.

5 **[0168]** En una realización, el kit está adaptado para la regeneración de tejidos.

**[0169]** En otro aspecto, el presente documento describe un método para promover la cicatrización de la herida o tejido de curación y/o el sellado y/o tejido y/o la regeneración ósea en una herida o tejido de un humano o animal que comprende:

- 10
- a) Proporcionar una composición de curador de herida o curador de tejido o agente hemostático de acuerdo con la divulgación, y
  - b) aplicación de una cantidad terapéuticamente eficaz del curador de herida o tejido o agente hemostático a una herida, un tejido dañado o un hueso dañado.

15 **[0170]** En otro aspecto, el presente documento describe un método de tratamiento que comprende:

- a) Proporcionar una composición de curador de herida o curador de tejido o agente hemostático de acuerdo con la divulgación, y
- 20 b) Aplicación de una cantidad terapéuticamente eficaz del curador de herida o tejido o agente hemostático a una herida, un tejido dañado o un hueso dañado.

25 **[0171]** En otro aspecto, el presente documento describe un método para inducir la regeneración periodontal en una herida o un defecto periodontal de un mamífero con la enfermedad periodontal u otra condición que requiere la regeneración periodontal que comprende:

- a) Proporcionar un curador de herida o tejido o agente hemostático según la invención,
- b) Aplicar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de heridas o curador de tejido o agente hemostático a la herida o el tejido o el defecto periodontal o cavidad,
- 30 c) Insertar, opcionalmente, una barrera periodontal, y
- d) Cerrar la herida o tejido.

35 **[0172]** Preferiblemente, la barrera se sitúa entre el tejido gingival y la herida o tejido tratado según las etapas a) y b). En una realización, la barrera está seleccionada a partir de una membrana, un polímero biodegradable y/o un material poroso biocompatible.

40 **[0173]** La membrana puede ser obtenida mediante la combinación de PRP y gluconato de calcio 10% en una proporción de 30 a 70 o 50 en el 50, respectivamente. La centrifugación se realiza durante aproximadamente 30 minutos.

**[0174]** En otro aspecto, el presente documento describe un método para promover la regeneración de la piel en una cicatriz o una arruga de humano o animal que comprende:

- a) Proporcionar una composición de heridas o curador de tejido o agente hemostático según la invención, y
- 45 b) Llenar la cicatriz de la piel o de la línea de arrugas con dicha composición de heridas o curador de tejido o agente hemostático.

50 **[0175]** En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de una composición de células, que comprende las etapas de:

- a) Centrifugación de la sangre entera en un tubo de acuerdo con la invención,
- b) Separar opcionalmente el plasma rico en plaquetas enriquecido desde el plasma completo, y
- c) Re-suspender el plasma enriquecido,
- 55 d) Proporcionar un extracto celular tal como un extracto de células dérmicas tales como queratinocitos, fibroblastos, melanocitos y la célula de Langheran; células grasas; células de médula ósea; células del músculo, tales como mioblastos y células satélite; osteoblastos; condrocitos; células de filtro del periostio; células de la córnea; células de cordón umbilical; células madre mesenquimales (MSC), preadipocitos, células pre-endotheliales, células de Schwann, células de tendón o células de islotes de páncreas, y
- 60 e) Mezclar el concentrado de plaquetas obtenido en el paso (c) con el extracto celular obtenido en d).

**[0176]** Preferiblemente, la etapa de centrifugación se realiza a una fuerza de o aproximadamente 1500 g hasta aproximadamente 2000 g. Preferentemente, la etapa de centrifugación se realiza en un período de tiempo suficiente para formar una barrera entre el plasma que contiene las plaquetas, los linfocitos y los monocitos y el sedimento que contiene los eritrocitos.

65 **[0177]** Preferiblemente, la etapa de separación b) se hace recogiendo el sobrenadante desde lo alto de dicha

barrera. En una realización, el plasma rico en plaquetas enriquecido se separa del plasma completo mediante la eliminación de la mitad del sobrenadante que contiene el plasma pobre en plaquetas. Preferentemente, el plasma enriquecido está enriquecido en leucocitos, trombocitos y proteínas de adhesión (por ejemplo, fibronectina) en comparación con la sangre entera nativa.

5 **[0178]** En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de una composición de curador de herida o tejido, que comprende las etapas de:

- 10 a) Centrifugación de la sangre entera en un tubo o en un tubo separador de acuerdo con la invención,
- b) Separar opcionalmente el plasma rico en plaquetas enriquecido desde el plasma completo,
- c) Re-suspender el plasma enriquecido,
- d) Mezclar el concentrado de plaquetas obtenido en el paso c) con un activador de coagulación, suero de trombina o suero de trombina autóloga,
- 15 e) Proporcionar un extracto celular tal como un extracto de células dérmicas tales como queratinocitos, fibroblastos, células de melanocitos y célula de Langheran; células grasas; células de médula ósea; células del músculo, tales como mioblastos y células satélite; osteoblastos; condrocitos; células de filtro del periostio; células de la córnea; células de cordón umbilical; células madre mesenquimales (MSC), preadipocitos, células pre-endoteliales, células de Schwann, células de tendón o células de islotes del páncreas;
- 20 f) mezclar la mezcla de concentrado de plaquetas obtenido en el paso d) con el extracto celular obtenido en e).

**[0179]** Preferiblemente, la etapa de centrifugación se realiza a una fuerza de o aproximadamente 1500 g hasta aproximadamente 2000 g. Preferentemente, la etapa de centrifugación se realiza en un período de tiempo suficiente para formar una barrera entre el plasma que contiene las plaquetas, los linfocitos y los monocitos y el sedimento que contiene los eritrocitos.

25 **[0180]** Preferiblemente, la etapa de separación b) se hace recogiendo el sobrenadante desde lo alto de dicha barrera. En una realización, el plasma rico en plaquetas enriquecido se separa del plasma completo mediante la eliminación de la mitad del sobrenadante que contiene el plasma pobre en plaquetas. Preferentemente, el plasma enriquecido está enriquecido en leucocitos, trombocitos y proteínas de adhesión (por ejemplo, fibronectina) en comparación con la sangre entera nativa.

**[0181]** Preferiblemente, el activador de coagulación o suero de trombina autóloga está en una relación de volumen (concentrado de plaquetas: activador de coagulación) de aproximadamente 10: 1 a aproximadamente 10: 3.

35 **[0182]** En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición de células aislada preparada de acuerdo con la invención que comprende:

- 40 a) plasma,
- b) plaquetas a una concentración de al menos  $300 \times 10^9$  células/L,
- c) células blancas de la sangre a una concentración de al menos  $7 \times 10^9$  células/L,
- d) fibrinógeno a una concentración de al menos 3 mg/L,
- e) un extracto celular, tal como un extracto de células dérmicas tales como queratinocitos, fibroblastos, melanocitos y células de Langheran; células grasas; células de médula ósea; células musculosas tales como mioblastos y células satélite; osteoblasts; condrocitos; células de filtro del periostio; células de la córnea; células de cordón umbilical; células madre mesenquimales (MSCs), preadipocitos, células pre-endoteliales, células de Schwann, células de tendón o células de los islotes del páncreas.
- 45

**[0183]** Preferiblemente, las células están en una concentración de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^6$  células/ml de plasma o plasma enriquecido y la concentración de eritrocitos es menor que  $0,6 \times 10^{12}$  células/L.

50 **[0184]** En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición de célula aislada preparada de acuerdo con la invención que comprende:

- 55 a) plasma,
- b) plaquetas a una concentración de al menos  $300 \times 10^9$  células/L,
- c) células blancas de la sangre a una concentración de al menos  $7 \times 10^9$  células/L,
- d) fibrinógeno a una concentración de al menos 3 mg/L,
- e) un activador de coagulación, suero de trombina o suero de trombina autóloga,
- 60 f) un extracto celular, tal como un extracto de células dérmicas tales como queratinocitos, fibroblastos, melanocitos y células de Langheran; células grasas; células de médula ósea; células musculosas tales como mioblastos y células satélite; osteoblasts; condrocitos; células de filtro del periostio; células de la córnea; células de cordón umbilical; células madre mesenquimales (MSCs), preadipocitos, células pre-endoteliales, células de Schwann, células de tendón o células de los islotes del páncreas.

65 **[0185]** Preferiblemente, el activador de coagulación o suero de trombina autóloga está en una relación de volumen (concentrado de plaquetas: activador de coagulación) de aproximadamente 10: 1 a aproximadamente 10: 3.

[0186] Preferiblemente, las células están en una concentración de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^6$  células/ml de plasma o plasma enriquecido y la concentración de eritrocitos es menor que  $0,6 \times 10^{12}$  células/L.

5 [0187] En otro aspecto, el presente documento describe una composición de curación de heridas o el tejido o el agente hemostático que comprende una composición celular aislada de acuerdo con la divulgación.

[0188] En otro aspecto, el presente documento describe un método para la promoción de la herida o tejido de curación y/o de sellado y/o regeneración de un tejido y/o un cartílago y/o hueso y/o un nervio en un ser humano o un animal comprendiendo:

- 10 a) Proporcionar una composición de herida o tejido de curación, un agente hemostático o una composición celular de acuerdo con la divulgación, y  
b) Aplicar una cantidad terapéuticamente eficaz de la herida o composición para la cicatrización de tejidos, agente hemostático o composición de células a una herida, un tejido dañado o un cartílago dañado o un hueso dañado.

15 [0189] En otro aspecto, el presente documento describe un método para aumentar el volumen de tejido adiposo en un mamífero con un injerto de grasa dérmica u otra condición que requiere regeneración de tejidos adiposos que comprenden:

- 20 a) Proporcionar una composición de células de grasa de acuerdo con la divulgación,  
b) Aplicar una cantidad efectiva terapéuticamente o cosméticamente de la composición de células de grasa en combinación con PRP o concentrado de plasma de acuerdo con la divulgación al injerto de grasa dérmica o el tejido adiposo que requiere la regeneración de tejidos adiposos, y  
25 c) Insertar opcionalmente, un colgajo quirúrgico o un implante, en el que la aleta quirúrgica o implante, se coloca en el sitio que requiere la regeneración o amplificación volumétrica y dicha solapa quirúrgica o implante comprende una combinación de una preparación de células de grasa de acuerdo con la divulgación y PRP, concentrado de plasma o material de plasma enriquecido.

30 [0190] En otro aspecto, el presente documento describe un método para inducir la regeneración miocárdica en un mamífero con deficiencia de miocardio u otra condición que requiere de regeneración que comprende la regeneración del tejido de miocardio:

- 35 a) Proporcionar una célula muscular o una composición de las células de médula ósea de acuerdo con la divulgación, y  
b) Aplicar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de las células musculares en combinación con PRP o plasma concentrado de acuerdo con la divulgación al tejido miocárdico que requieran regeneración.

40 [0191] En otro aspecto, el presente documento describe un método para inducir la regeneración de la córnea en un mamífero con deficiencia de la córnea o otra condición que requiera la regeneración la córnea que comprende:

- 45 a) Proporcionar una composición celular córnea de acuerdo con la divulgación, y  
b) Aplicar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de células de la córnea en combinación con PRP o plasma concentrado de acuerdo con la divulgación al tejido de la córnea que requieran regeneración.

[0192] En otro aspecto, el presente documento describe un método para inducir regeneración articular o del cartílago en un mamífero con deficiencia articular o cartílago u otra condición que requiera regeneración articular o de tejido de cartílago, que comprende:

- 50 a) Proporcionar una composición de células de células de condrocitos o de médula ósea según la invención,  
b) Aplicar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de células de condrocitos en combinación con PRP o concentrado de plasma de acuerdo con la divulgación al tejido articular o de cartílago que requiere regeneración y  
55 c) Insertar opcionalmente una solapa o implante quirúrgico, en el que la aleta quirúrgica o implante, se coloca en el defecto del cartílago o bajo un parche de periostio, y la solapa quirúrgica o implante comprende una combinación de un condrocito o composición de células de médula ósea de acuerdo con la divulgación y PRP, concentrado de plasma o material de plasma enriquecido.

60 [0193] En otro aspecto, el presente documento describe un método para promover la regeneración de la piel en una cicatriz, una arruga o una deficiencia de grasa de humano o animal inferior que comprende:

- 65 a) Proporcionar una composición de herida o tejido de curación, un agente hemostático o una composición celular en combinación con PRP o concentrado de plasma de acuerdo con la divulgación, y  
b) Llenar la cicatriz de la piel, la línea de arrugas o deficiencia de grasa con la composición de curado de heridas o de los tejidos, un agente hemostático o una composición celular en combinación con PRP o concentrado de plasma de acuerdo con la divulgación.

5 **[0194]** En otro aspecto, el presente documento describe un método para inducir la regeneración nerviosa periférica en un mamífero con daño periférico del nervio, la sutura del nervio o lesión de la médula espinal o de otra condición que requiere que comprende la regeneración del nervio periférico:

- a) proporcionar una composición de células de Schwann en combinación con PRP o concentrado de plasma de acuerdo con la divulgación, y
- b) aplicación de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de células de Schwann en combinación con PRP o concentrado de plasma en el nervio periférico que requiere regeneración.

10 **[0195]** En otro aspecto, el presente documento describe un método para inducir la regeneración ósea en un mamífero con daño óseo, la deficiencia de hueso u otra condición que comprende la regeneración ósea que requiere:

- a) proporcionar una composición de células de médula ósea o de osteoblastos en combinación con PRP o plasma se concentren acuerdo con la invención, y
- b) aplicación de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de células de médula ósea o de osteoblastos en combinación con PRP o concentrado de plasma de acuerdo con la divulgación en el hueso que requiere la regeneración.

15 **[0196]** En otro aspecto, el presente documento describe un método para el tratamiento de la diabetes tipo I, diabetes dependiente de la insulina o hiperglucemia en un mamífero que comprende:

- a) Proporcionar una composición de células de los islotes del páncreas en combinación con PRP o concentrado de plasma de acuerdo con la divulgación, y
- b) Aplicación de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de células de los islotes del páncreas en combinación con PRP o concentrado de plasma de acuerdo con la divulgación de el paciente, por ejemplo por inyección.

20 **[0197]** En otro aspecto, el presente documento describe un método para el tratamiento de la incontinencia urinaria en un mamífero u otra condición que requiere la regeneración de la vejiga comprendiendo:

- a) proporcionar una composición celular de mioblastos en combinación con PRP o concentrado de plasma de acuerdo con la divulgación, y
- b) aplicación de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición celular de mioblastos en combinación con PRP o concentrado de plasma de acuerdo con la divulgación al cuello de la vejiga que requiere regeneración.

25 **[0198]** En otro aspecto, el presente documento describe un método para el tratamiento de la incontinencia anal en un mamífero u otra condición que requiere regeneración del músculo anal que comprende:

- a) Proporcionar una composición celular de mioblastos en combinación con PRP o concentrado de plasma de acuerdo con la divulgación, y
- b) Aplicación de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición celular de mioblastos en combinación con PRP o concentrado de plasma de acuerdo con la divulgación al área para-anal que requiere la regeneración.

30 **[0199]** En otro aspecto, el presente documento describe un método para el tratamiento de la esofagitis por reflujo o trastornos de reflujo gastroesofágico en un mamífero o otras condiciones y que requieren regeneración del esfínter de esófago que comprende:

- a) Proporcionar una composición celular de mioblastos en combinación con PRP o concentrado de plasma de acuerdo con la divulgación,
- b) Aplicación de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición celular de mioblastos en combinación con PRP o concentrado de plasma de acuerdo con la divulgación al esfínter de esófago que requiere regeneración.

35 **[0200]** En otro aspecto, el presente documento describe un uso de una composición de curación de herida o tejido, un agente hemostático, una composición celular o una preparación de células para la fabricación de un medicamento para la curación de heridas o tejidos, mesoterapia, intramuscular, o para promover el crecimiento del hueso o periodonto y/o hueso y/o la regeneración de tejidos tales como piel, cartílago, músculo, tendón, tejido adiposo, la córnea, los nervios periféricos, la columna vertebral o la regeneración ósea.

40 **[0201]** En otro aspecto, el presente documento describe un uso de una composición de curador de herida o tejido, un agente hemostático, una composición celular o una preparación de células para la fabricación de una preparación cosmética para uso como agente anti-envejecimiento o agente de reparación de la piel tal como agente de reparación de la cicatriz, agente de reparación de lipoatrofia o llenado de arrugas y/o agente de reparación.

**[0202]** En otro aspecto, el presente documento describe una composición farmacéutica que comprende una composición de curador de herida o tejido, un agente hemostático, una composición celular o una preparación de células y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 **[0203]** En otro aspecto, el presente documento describe una composición cosmética que comprende una composición de curador de herida o tejido, un agente hemostático, una composición celular o una preparación de células y un vehículo cosméticamente aceptable.

10 **[0204]** En otro aspecto, el presente documento describe un dispositivo implantable para su uso en el tejido que comprende la terapia de regeneración:

15 a) un núcleo permeable que comprende una composición de curador de herida o tejido, un agente hemostático, una composición celular o una preparación de células, opcionalmente en combinación con ácido hialurónico, y  
 b) una camisa externa que rodea dicho núcleo, comprendiendo dicha chaqueta un material biocompatible, preferiblemente ácido biorreabsorbible, preferiblemente hialurónico.

20 **[0205]** En una realización, las composiciones, composiciones de herida o curador, extractos de células, composiciones celulares, concentrado de plasma y preparaciones de trombina utilizan sustancias alogeneicas, composiciones, sangre o células.

25 **[0206]** Los usos, procedimientos y composiciones de acuerdo con a la divulgación son útiles en la regeneración y/o el rejuvenecimiento de tejidos, huesos y/o cartílagos. Los usos, los métodos y composiciones de acuerdo con la divulgación son particularmente útiles en el tratamiento de úlceras neuropáticas diabéticas o llagas de decúbito; daños de hueso y cartílago tales como cartílago de la articulación profunda o daños condrales tales como la  
 30 reparación quirúrgica de tendones desgarrados; la artritis en las articulaciones causadas por traumas o por el envejecimiento; trastornos de manguito rotador; heridas tales como heridas que no cicatrizan como la vasculitis inducida por heridas, por ejemplo en las extremidades inferiores equino que no cicatrizan; enfermedades periodontales; cirugía de implante; cirugía cardiovascular, torácica, de trasplante, de cabeza y cuello, oral, gastrointestinal, ortopédica, neurocirugía y plástica; mesoterapia y/o inyecciones de mesoterapia; daños musculares cardíacas tales como en la insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca, trastornos isquémicos y no  
 35 isquémicos, cardiomiopatía; enfermedad de reflujo gastroesofágico; incontinencia anal o urinaria; cirugía facial, como la alopecia inducida por cirugía facial (alopecia debida a la pérdida de pelo del folículo en las áreas de los lados de la cara), pérdida de cabello, alopecia, cirugía de cara (ritidectomía), rinoplastia, injertos de grasa dérmicos (en el tratamiento de aumento facial, hemiatrofia congénita de la cara tales como atrofia congénita del cartílago de la nariz y la lipoatrofia tal como en pacientes que sufren VIH/SIDA, disfunción genital, erosión y artroscopia); complicaciones de la cicatrización como después de blefaroplastia de los párpados; trastornos de la córnea, tales como opacidad de la córnea tales como la causada por quemaduras químicas, aflicción por el síndrome de Steven Johnson y úlceras de la córnea; cicatrización de la córnea; síndrome de ojo seco; enfermedades hematológicas tales como la talasemia; daño nervioso periférico, sutura del nervio y lesión de la médula espinal; defectos óseos o trastornos tales  
 40 como injerto óseo o fractura ósea, daños de la piel o trastornos tales como el acné (especialmente después de tratamiento de dermoabrasión), quemaduras, rubéola o pequeñas cicatrices de viruela, vitiligo, lipoatrofia, sarcoma de Kaposi, esqueloides de piel o fibromatosis palmar de Dupuytren.

45 **[0207]** Los usos, procedimientos y composiciones de acuerdo con a la divulgación son útiles en la cicatrización de tejido, incluyendo la regeneración ósea y la reparación, la mitogénesis, angiogenesis y/o la activación de macrófagos.

50 **[0208]** Las ventajas adicionales y características novedosas de esta invención se expondrán en parte en la descripción que sigue, y en parte serán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de la siguiente memoria descriptiva o se pueden aprender por la práctica de la invención. Los objetos y ventajas de la invención se pueden realizar y alcanzar por medio de las instrumentalidades, combinaciones, composiciones, y métodos particularmente indicados en las reivindicaciones adjuntas.

55 **[0209]** Las composiciones, usos y métodos de acuerdo con a la divulgación son particularmente útiles en la hemostasia, en la regeneración, la revitalización, hidratación y/o la estimulación de tejido, como pegamento biológico, sellador bioadhesivo o relleno biológico.

60 **[0210]** Ventajosamente, el fuerte adhesivo biológico de la presente invención tiene una resistencia mecánica mayor que otros conocidos, en particular para todas las intervenciones quirúrgicas invasivas. Tales pegamentos biológicos de la presente invención tienen una mayor capacidad para curar el tejido dañado por que contiene células apropiadas, plaquetas, leucocitos, factores de crecimiento y otros factores de reducción/prevención de las infecciones eventuales.

65 **[0211]** Las composiciones, usos y métodos de acuerdo con a la divulgación son particularmente útiles en el cuidado de heridas, cirugía, inyecciones para correcciones ortopédicas y inyecciones para correcciones estéticas, cosméticas o de volumen.

- 5 **[0212]** En otro aspecto, los usos, métodos y composiciones según la invención son útiles en la regeneración y/o el rejuvenecimiento de tejidos de la piel, particularmente en la promoción y/o el inicio de la regeneración de la piel tales como la reducción de arrugas de la piel, arrugas profundas, acné (especialmente después del tratamiento de dermoabrasión), quemaduras, cicatrices de rubéola o viruela, vitiligo y lipoatrofia (por ejemplo, composiciones de anti-envejecimiento y composiciones de regeneración de la piel), mejora de líneas nasolabiales y daños de tratamiento de la piel o trastornos tales como quemaduras de la piel, sarcoma de Kaposi, esqueloides de la piel o fibromatosis palmar de Dupuytren, en la reducción del dolor asociado con la piel y la regeneración de tejidos, para el amortiguador hemorroidal, disfunción eréctil, caverna, fibrosis cavernosa, enfermedad de Lapeyronie, la vagina y/o los labios.
- 10 **[0213]** Las composiciones, usos y métodos de acuerdo con a la divulgación son particularmente útiles en la herida o la cicatrización del tejido, tratamientos de regeneración o medicina deportiva para la rodilla, el codo, músculos (desgarrados), columna vertebral, disco espinal, tendón, ligamento, tratamiento de heridas traumáticas o quirúrgicas en el ajuste y/o sujeción y/o sellado de injertos nativos o protésicos (especialmente la piel, injertos de hueso y/o prótesis dentales o implantes o similares, incluyendo también el sitio donante del injerto); tratamiento de artritis, gonartritis, tendinitis, manguito de rotadores, tratamiento de vasculitis; úlceras, tales como úlceras neuropáticas diabéticas o úlceras de decúbito; radiodermatitis (por ejemplo, después de la irradiación en un carcinoma de piel epidermoidal) y fístulas de cierre (como para ciclistas).
- 20 **[0214]** Además, las composiciones, usos y métodos de acuerdo con la divulgación son particularmente útiles en el tratamiento de trastornos cardíacos, la regeneración cardíaca como en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca isquémica y no isquémica y la miocardiopatía.
- 25 **[0215]** Además, las composiciones, usos y métodos de acuerdo con la divulgación son particularmente útiles en el tratamiento de la incontinencia urinaria y/o anal.
- [0216]** Además, las composiciones, usos y métodos de acuerdo con la divulgación son particularmente útiles en el tratamiento de la esofagitis de reflujo y/o trastorno de reflujo gastro-esófago.
- 30 **[0217]** Además, las composiciones, usos y métodos de acuerdo con la divulgación son particularmente útiles en el tratamiento de daños de la piel tal como en pieles dañadas por radiaciones (radiodermatitis o piel dañada por el sol), pieles envejecidas o pieles quemadas y/o en la mejora de las arrugas faciales, acné (especialmente después de tratamiento de dermoabrasión), quemaduras, rubéola o viruela cicatrices, vitiligo, lipoatrofia o lipodistrofia, sarcoma de Kaposi, esqueloides de la piel o fibromatosis palmar de Dupuytren y/o en tratamientos de rejuvenecimiento de la piel.
- 35 **[0218]** Además, las composiciones, usos y métodos de acuerdo con la divulgación son particularmente útiles en el tratamiento de la lipoatrofia tal como en pacientes de VIH/SIDA y en otra hemiatrofia congénita de la cara, como atrofia congénita de la nariz de cartílago. Además, las composiciones, usos y métodos de acuerdo con la divulgación son particularmente útiles en el tratamiento de trastornos de los huesos, cartílagos y articulares tales como daño condral, artritis, cartílago y/o lesiones óseas tales como el daño del cartílago profundo y/o la erosión y/o artroscopia, tendón desgarrado y del manguito rotador en el hombro.
- 40 **[0219]** Además, las composiciones, usos y métodos de acuerdo con la divulgación son particularmente útiles en el tratamiento de enfermedades hematológicas tales como talasemia.
- 45 **[0220]** Además, las composiciones, usos y métodos de acuerdo con la divulgación son particularmente útiles en el tratamiento de trastornos de la córnea, tales como síndrome de ojo seco; opacidad de la córnea tales como las causadas por quemaduras químicas, aflicción por el síndrome de Steven Johnson; cicatrización de la córnea y úlceras corneales.
- 50 **[0221]** Además, las composiciones, usos y métodos de acuerdo con la divulgación son particularmente útiles en el tratamiento de daño del nervio periférico, la sutura del nervio y lesión de la médula espinal.
- 55 **[0222]** Además, las composiciones, usos y métodos de acuerdo con la divulgación son particularmente útiles en el tratamiento de la diabetes tipo I, diabetes dependiente de insulina y/o hiperglucemia.
- [0223]** Además, las composiciones, usos y métodos de acuerdo con la divulgación son particularmente útiles en el tratamiento de defectos óseos o trastornos tales como injerto de hueso o una fractura ósea.
- 60 **[0224]** El uso de la composición resultante de la invención se puede modificar adicionalmente antes de la aplicación y de acuerdo con el objetivo terapéutico.
- 65 **[0225]** Las composiciones se pueden utilizar junto con materiales óseos de llenado, especialmente materiales de relleno reabsorbibles, tales como (cerámica de fosfato de calcio utilizado como biomaterial) hidroxiapatita o hueso desmineralizado, o usarse como una mezcla con extractos de hueso en un procedimiento para el recrecimiento de

hueso, por ejemplo, en los procedimientos craneofaciales y ortopédicos.

**[0226]** Dependiendo del uso o de la enfermedad, las composiciones se pueden utilizar junto con el ácido hialurónico 10%, ácido hialurónico 20%, ácido hialurónico 30%, ácido hialurónico 40%, y/o ácido hialurónico 50%.

**[0227]** Las composiciones se pueden usar como un sellador de heridas en cirugía plástica incluyendo injerto de quemadura y otras aplicaciones de injerto libre de piel, por ejemplo en oncología para favorecer la regeneración de tejidos, incluyendo la aceleración de la (neo)vascularización. Las composiciones son particularmente útiles en los tratamientos de curación de heridas en el sitio donante de injerto de piel. La eliminación de un injerto de piel en una piel sana crea una nueva herida en el sitio del donante que normalmente se cura espontáneamente entre 12 a 14 días. Sin embargo, esta cicatrización es muy exigente para el cuerpo, sobre todo si la zona donante es amplia o la persona es menos resistente (por ejemplo, víctimas de quemaduras, personas que sufren de múltiples traumas, personas tratadas con corticoides, niños o ancianos) y las pérdidas energéticas incluso se aumentaron en la pérdida de minerales, oligoelementos y proteínas inducidas por las pérdidas de líquido de la nueva herida. Además, el dolor importante durante los primeros 8 días a menudo está presente en el sitio del donante del injerto. Tratamientos de reducción de dolor a menudo se utilizan como el uso de los analgésicos (por ejemplo morfina) y/o en apósitos para heridas hidrocelulares, sin embargo el dolor sigue presente, especialmente durante el cambio de apósito que ocurre imperativamente dentro de las 48 horas hasta 1 semana después de la eliminación del injerto. Además, los apósitos para heridas hidrocelulares tienen los inconvenientes no sólo a ser bastante caros, sino también por el mantenimiento de la humedad en la herida, para evitar su secado, para aumentar la profundidad de la herida, para favorecer la brote de infecciones bacterianas y para conducir a cicatrices no estéticas. Por lo tanto, una estimulación del injerto de piel del sitio donante de curación es muy deseable.

**[0228]** Las composiciones de la divulgación están particularmente adaptadas a las heridas crónicas que pueden carecer de suficiente circulación de la sangre para facilitar la cicatrización de la herida en cascada.

**[0229]** Las composiciones y métodos según la invención también pueden usarse en el tratamiento de la enfermedad periodontal, donde se observa una pérdida y/o un daño de los tejidos periodontales, comprendiendo tal tratamiento por ejemplo la colocación en el sitio periodontal o cavidad en un humano o un animal inferior en necesidad de la regeneración del tejido periodontal una composición de acuerdo con la divulgación.

**[0230]** Las composiciones de acuerdo con esta descripción son eficaces en la eliminación o en gran medida la reducción del sangrado post-operativo y la extravasación o la pérdida de fluido seroso o de otro tipo en estas aplicaciones, en la reducción del riesgo de infección causada por la mayoría de bacterias y/o mejora formación de tejido conectiva en comparación con la curación natural (es decir, no hay agentes exógenos añadidos) o a la curación obtenida a través de la utilización de otros concentrados de plaquetas preparados con métodos conocidos. Las composiciones de acuerdo con la divulgación son particularmente útiles en la preparación de fármacos para la promoción y/o el inicio de la cicatrización de heridas y/o la regeneración de tejidos o para la preparación de composiciones cosméticas para la regeneración de la piel tales como reducción de arrugas de la piel, acné (especialmente después de tratamiento de dermoabrasión), la rubéola o pequeñas cicatrices de viruela, vitiligo y lipoatrofia (por ejemplo, composiciones de anti-envejecimiento y composiciones con regeneración de la piel).

**[0231]** Las composiciones de la presente divulgación se pueden administrar de forma local o inyectarse en la herida o en o cerca del órgano injertado o se inyectan por vía subcutánea. Administración local puede ser por inyección en el sitio de la lesión o defecto, o por inserción o fijación de un excipiente sólido en el sitio, o mediante la mezcla con una crema o emulsión, o por inclusión en un tejido o soporte de papel o hidrogel, o por aplicación directa, tópica de la composición de la divulgación, tal como en forma de gotas para los ojos. Preferiblemente, las composiciones son fácilmente composiciones con jeringa. El modo de administración, la dosificación administrada, como dosis únicas o múltiples, a un individuo variará dependiente de una variedad de factores, incluyendo las propiedades farmacocinéticas, condiciones del paciente y características (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), alcance de los síntomas, tratamientos concurrentes, frecuencia del tratamiento y el efecto deseado.

**[0232]** Las composiciones de la presente divulgación se pueden administrar en combinación con un co-agente útil en el tratamiento de la regeneración de tejidos, tales como un agente curativo, un relleno de arrugas, un agente anti-envejecimiento, tales como un anti-envejecimiento de la vitamina del complejo, un agente antibacteriano, agente anti-biótico, un agente corticosteroide, un antálgico y agente analgésico, o un agente anestésico como la adrenalina, etc... En el presente documento se divulgan composiciones en combinación con un co-agente útil en el tratamiento de la regeneración de los tejidos para uso simultáneo, separado o secuencial en terapia de regeneración de tejido tal como la cicatrización de heridas, reparación de crecimiento óseo y de periodonto.

**[0233]** Las composiciones, el dispositivo y los procedimientos para la preparación de concentrados de plaquetas autólogas o composiciones celulares de la descripción son particularmente útiles para uso terapéutico, en particular pegamento biológico autógeno en un sistema hemostático destinado a aceleración del proceso fisiológico de la regeneración de tejidos, por ejemplo en la implantología dental, cirugía de la piel y el hueso, la cirugía de cartilago y tendón, la regeneración del nervio periférico y corneal y cirugía cardíaca. Las composiciones, el dispositivo y los procedimientos para la preparación de concentrados de plaquetas autólogas y la composición celular de la

descripción son particularmente útiles para uso cosmético, particularmente como material de rejuvenecimiento autógeno para utilizarse por ejemplo como arrugas, cicatriz o llenado de deficiencia de grasa, solo o en combinación con al menos un agente anti-envejecimiento.

5 **[0234]** El concentrado de plaquetas se puede combinar con una preparación de extracto de células autólogas tales como, por ejemplo queratinocitos, células de médula ósea, osteoblastos, condrocitos, fibroblastos, periostio, melanocitos y células de Langheran; células grasas; células de médula ósea; células del músculo, tales como mioblastos y células satélite; células de filtro del periostio; células madre mesenquimales (MSCs), preadipocitos, células pre-endoteliales, células de la córnea; células de cordón umbilical; células de tendón o células de los islotes pancreáticos. Los queratinocitos se pueden cosechar a través de un método descrito por Reinwald y Green, 1975, 10 Cell, 6 (3): 331-43. Otras células mencionadas se pueden recoger a través de métodos descritos en "Culture de cellules animales; méthodologies-applications", 2003, Ed. Barlovatz-Meimom y Adolphe, INSERM editions, París. Alternativamente, los extractos celulares se derivan de un banco de células o un cultivo celular o se recogieron como se ha descrito en los ejemplos de abajo.

15 **[0235]** Las composiciones de concentrado y de células de plaquetas de la invención han demostrado ser muy beneficiosas en la aceleración y/o promoción del proceso de curación de las heridas, incluso heridas crónicas, lo que lleva a cierres exitosos donde habían fracasado semanas de terapias convencionales y logrando una disminución de los riesgos de infección, una mejora en la recuperación y confort del paciente, una reducción de los costos de atención médica y un resultado final mejor estético.

20 **[0236]** Las composiciones también pueden, por supuesto, prepararse a partir de plasma derivado de varios donantes identificados. La invención no se limita a materiales biológicos autólogos, tales como la recogida de plaquetas concentradas a partir del material biológico propio de heridos. La invención abarca el uso de materiales biológicos obtenidos a partir de uno o más terceros, que no necesitan ser de la misma especie que el paciente cuya herida está siendo tratada con la composición de curador de herida descrita en este documento a menos que bio-incompatibilidad resultaría de la utilización de tales materiales biológicos de terceros. En una realización, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de una composición de concentrado de plaquetas o una 25 composición de células, según lo estipulado en el presente documento.

30 **[0237]** En otra realización, la presente invención proporciona un dispositivo para la preparación de una composición de concentrado de plaquetas a partir de sangre completa como se describe aquí.

35 **[0238]** En una realización adicional, el presente documento describe un procedimiento para la preparación de un suero de trombina y/o la composición de concentrado de plaquetas en el que el paso de centrifugación se realiza a aproximadamente 1500 g y hasta aproximadamente 1700g durante un tiempo seleccionado de aproximadamente 3 min hasta aproximadamente 15 min, preferentemente a 1500 g durante aproximadamente 8 min.

40 **[0239]** En otra forma de realización adicional, el presente documento describe un proceso para la preparación de una composición de concentrado de plaquetas en el que el tubo tiene una entrada para introducir dicha sangre entera, se mantiene en un vacío destinado para aspirar la muestra de sangre entera, es estéril, tiene un vacío utilizable de 8 a 10 ml y es adecuado para someterse a centrifugación.

45 **[0240]** En otra forma de realización adicional, el presente documento describe un proceso para la preparación de una composición de concentrado de plaquetas en el que el tubo es un tubo de tereftalato de polietileno que contiene un gel altamente tixotrópico formado por una mezcla de polímero y un citrato sódico anhidro a 3,5 mg/mL.

**[0241]** En otra realización, la presente invención proporciona una composición de concentrado de plaquetas aislado obtenible del proceso de acuerdo con la invención.

50 **[0242]** En otra realización, la invención proporciona una composición de concentrado de plaquetas aislado obtenido por un procedimiento según la invención que comprende:

- a) plasma,
- b) plaquetas a una concentración de al menos  $300 \times 10^9$  células/L, preferiblemente de al menos  $350 \times 10^9$  células/L, más preferiblemente de al menos  $400 \times 10^9$  células/L,
- 55 c) células blancas de la sangre en una concentración de al menos  $7 \times 10^9$  células/L, preferiblemente de al menos  $8 \times 10^9$  células/L, y
- d) fibrinógeno a una concentración de al menos 3 mg/L.

60 **[0243]** Preferiblemente, la concentración de eritrocitos es menor que  $0,4 \times 10^{12}$  células/L o  $0,5 \times 10^{12}$  células/L.

**[0244]** En otra realización, el presente documento describe una composición de curador de herida o tejido comprendiendo:

- a) plasma,  
 b) plaquetas a una concentración de al menos  $300 \times 10^9$  células/L, preferiblemente de al menos  $350 \times 10^9$  células/L, más preferiblemente de al menos  $400 \times 10^9$  células/L,  
 5 c) células blancas de la sangre en una concentración de al menos  $7 \times 10^9$  células/L, preferiblemente de al menos  $8 \times 10^9$  células/L,  
 d) fibrinógeno a una concentración de al menos 3 mg/L,  
 e) un suero de trombina de acuerdo con la divulgación, y  
 10 f) opcionalmente, un extracto de célula autóloga, tales como extracto de los queratinocitos, las células de la médula ósea, los fibroblastos, periostio, melanocitos y células de Langheran; células grasas; células de médula ósea; células musculares tales como mioblastos y células satélite; osteoblastos; condrocitos; células madre mesenquimales (MSCs), preadipocitos, células pre-endoteliales, células de filtro del periostio; células de la córnea; células de cordón umbilical; células de tendón o células de los islotes pancreáticos.
- 15 **[0245]** Preferiblemente, el activador de coagulación del suero o la trombina se encuentra en una relación de volumen (concentrado de plaquetas: activador de coagulación) de aproximadamente 10: 1 a aproximadamente 10: 3.
- [0246]** Preferiblemente, las células están en una concentración de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^6$  células/ml de plasma o plasma enriquecido y la concentración de eritrocitos es menor que  $0,4 \times 10^{12}$  células/L o  $0,5 \times 10^{12}$  células/L.
- 20 **[0247]** En otra realización, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición de curador de herida o tejido como se describe aquí.
- 25 **[0248]** En otra forma de realización adicional, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición de curador de herida o tejido en el que el activador de coagulación que se mezcla es gluconato de calcio o cloruro de calcio 10%.
- 30 **[0249]** En otra forma de realización adicional, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición de curador de herida o tejido en el que el activador de coagulación que se mezcla con un concentrado de plaquetas (PRP) es una preparación de trombina enriquecida, que puede además combinarse con gluconato de calcio o cloruro de calcio. Un método para la preparación de la trombina para uso en un pegamento biológico se describe en US 6.472.162 por la adición de 8 a 20% de EtOH a un volumen de plasma y esta preparación puede ser utilizada como una preparación enriquecida de trombina en el contexto de la invención. Alternativamente, un suero de trombina autóloga (ATS) se puede utilizar como preparación de trombina enriquecida en el contexto de la invención. Un suero de trombina autóloga alternativa según la invención se obtiene por un procedimiento que comprende (i) la adición de muestra de sangre entera de un paciente (por ejemplo, 8 ml) recogida en un tubo separador de la divulgación, un 10% de volumen final de cloruro de calcio 10% (por ejemplo, 1 ml) y un 10% del volumen final de una preparación de 95% v. solución de etanol (por ejemplo, 1 ml) y (ii) precipitación por alrededor de 30 min a temperatura ambiente. Después de 30 min, una centrifugación a o de aproximadamente 1500 g durante aproximadamente 8 a 10 min se lleva a cabo. En una realización preferida adicional, la preparación enriquecida por trombina y preferiblemente el suero de trombina autóloga de acuerdo con a la divulgación se mezcla con un concentrado de plaquetas (PRP) directamente sobre la herida.
- 35 40 45 **[0250]** En otra forma de realización adicional, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición de curador de herida o tejido de acuerdo con la invención comprendiendo además una etapa b') en la que la composición de preparación activada rica en plaquetas (obtenida por el mezclado del concentrado de plaquetas con el activador de coagulación o suero de trombina autóloga) obtenido en la etapa b) puede ser parcialmente deshidratado por el contacto de un vendaje de heridas cubierto por una capa hidrófoba suave para evitar contaminación con micro-cuerdas desde el apósito con el fin de obtener un gel semi-sólido que puede ser manipulado por los instrumentos adecuados, por ejemplo para llenar una deficiencia de cavidad o tejido, o como una matriz de crecimiento ("andamio") a la espera de la reconstitución de la matriz extracelular autógena. El curador de herida o tejido obtenido es particularmente útil en un método para inducir la regeneración periodontal en una herida, un tejido o un defecto periodontal o una cavidad.
- 50 55 **[0251]** En otra realización adicional, el concentrado de plaquetas, composición de curador de herida de tejido, composiciones células pueden combinarse con un hidrogel como la preparación de Albugel (EP1543846) de 100% de albúmina o de cualquier otro hidrogel resultante de la reticulación de albúmina y de otro compuesto químico como el glicol de polietileno o cualquier otro ingrediente, utilizando un papel de base altamente hidrofílica, un portador para dejar en contacto con la piel hasta que se absorba el plasma rico en plaquetas.
- 60 **[0252]** La resistencia a la tracción de las composiciones de curador de herida o tejido puede ser afectada por la adición de iones de calcio. En consecuencia, si se desea una composición de heridas o curador de tejido más fuerte se pueden añadir más iones de calcio en el momento en que el suero se mezcla con el concentrado de plaquetas. Alternativamente, los iones de calcio pueden ser introducidos directamente en el concentrado de plaquetas, y se formarán las composiciones de la herida o curador de tejido, respectivamente.
- 65

5 **[0253]** Como se discute en más detalle a continuación, el período de tiempo necesario para la formación de las composiciones de curador de herida o tejido depende de la cantidad de suero añadido. Una proporción de suero de 1: 4, 1: 2 y 3: 4 a concentrado de plaquetas resulta en la formación de las composiciones de curador de herida o tejido en aproximadamente 90, 55 y 30 segundos, respectivamente. Además, la trombina se usa preferentemente dentro de cinco horas de preparación, preferiblemente dentro de dos horas e idealmente inmediatamente. Al ser la trombina activa a temperatura ambiente aún después de 10 días, la trombina puede usarse en una etapa posterior. Alternativamente, el suero puede refrigerarse o congelarse indefinidamente, preferiblemente utilizada antes de 1 mes de almacenamiento.

10 **[0254]** Las composiciones de curador de herida o tejido de la presente divulgación se pueden usar para sellar una herida quirúrgica mediante la aplicación a la herida de una cantidad adecuada de concentrado de plaquetas una vez que ha comenzado a gelificarse. Por otra parte, debido al hecho de que las composiciones de curador de herida o tejido de la presente invención se pueden preparar únicamente a partir de componentes de la sangre derivados del paciente que va a recibir las composiciones de curador de herida o tejido hay una probabilidad cero de introducir una nueva enfermedad transmitida por la sangre al paciente.

15 **[0255]** Los métodos de la presente invención pueden modificarse adicionalmente de manera que la composición de curador de herida o tejido funciona no sólo como un agente hemostático, sino también como un adjunto a la cicatrización de heridas y como una matriz para el suministro de fármacos y proteínas con otras actividades lógicas biológicas. Por ejemplo, es bien sabido que la cola de fibrina tiene una gran afinidad para unirse a fragmentos de hueso, que es útil en la reconstrucción de huesos, como en la cirugía plástica o la reparación de grandes fracturas óseas. En consecuencia, de acuerdo con la naturaleza autóloga de la composición de heridas o curador de tejido, hueso autólogo de un paciente se puede moler o convertirse en polvo o similares, y se mezcla en el concentrado de plaquetas. Suero que comprende trombina se mezcla luego con el concentrado de plaquetas y fragmentos de hueso en una cantidad suficiente para permitir que el gel resultante se aplique a la localización deseada donde se congela.

20 **[0256]** En los casos en los que las composiciones de curador de herida o tejido deseado han de funcionar adicionalmente como un dispositivo de suministro de fármacos y proteínas con otras actividades biológicas, el método de la presente invención puede ser modificado del siguiente modo. Antes de añadir el suero que comprende trombina al concentrado de plaquetas, una amplia variedad de fármacos o proteínas con otras actividades biológicas se puede añadir al concentrado de plaquetas. Ejemplos de los agentes que se añaden al concentrado de plaquetas antes de la adición del suero incluyen, pero no se limitan a, compuestos analgésicos, compuestos antibacterianos, incluyendo compuestos bactericidas y bacteriostáticos, antibióticos (por ejemplo, adriamicina, eritromicina, gentamicina, penicilina, tobramicina), compuestos antimicóticos, antiinflamatorios, compuestos antiparasitarios, compuestos antivirales, enzimas, inhibidores de enzima, glicoproteínas, factores de crecimiento, recombinados (por ejemplo, linfoquinas, citoquinas), hormonas, esteroides, glucocorticoesteroides, inmunomoduladores, inmunoglobulinas, minerales, neurolépticos, proteínas, péptidos, lipoproteínas, compuestos tumorocidas, compuestos de tumor estático, toxinas y vitaminas (por ejemplo, vitamina A, vitamina e, vitamina B, vitamina C, vitamina D, o derivados de los mismos). También se prevé que fragmentos seleccionados, porciones, derivados, o análogos de algunos o todos de los pueden ser utilizados anteriormente.

30 **[0257]** Un número de diferentes aparatos médicos y métodos de prueba existen para la medición y determinación de la coagulación y las actividades relacionadas con la coagulación de la sangre. Estos aparatos y métodos se pueden utilizar para ayudar a determinar la formulación óptima de activador, es decir, trombina, concentrado de plaquetas y plasma necesario para formar las composiciones de curador de la herida o tejido. Algunas de las técnicas más exitosas de la evaluación de coagulación de la sangre y la coagulación son las técnicas de émbolo ilustradas en la patente estadounidense Nos. 4.599.219 a Cooper et al., 4, 752 449 a Jackson et al., y 5.174.961 a Smith.

35 **[0258]** Concentrado de plasma, PRP, las composiciones se pueden mezclar con cualquiera de fosfato tricálcico (TCP), ácido hialurónico (HA), quitosano, crema, máscara de crema, extractos de células, células de grasa, lubricina, cd-gealtina y/o toxina de botulinum.

40 **[0259]** En una realización, un concentrado de plasma o composición PRP se pueden mezclar con fosfato tricálcico (TCP), ácido hialurónico (HA), quitosano, crema, máscara de crema, extractos de células, células de grasa, lubricina, cd-gealtina y/o toxina botulínica.

45 **[0260]** En una realización, un concentrado de plasma o composición PRP se pueden mezclar con fosfato tricálcico (TCP), ácido hialurónico (HA), quitosano, crema, máscara de crema, extractos de células, células de grasa, lubricina, cd-gealtina y/o toxina botulínica.

50 **[0261]** En una realización, un concentrado de plasma o composición PRP se pueden mezclar con trombina, preferentemente un suero de trombina de la presente descripción, y mezclarse adicionalmente con el fosfato tricálcico (TCP), ácido hialurónico (HA), quitosano, crema, máscara de crema, extractos de células, células de grasa, lubricina, cd-gealtina y/o toxina botulínica.

55

5 [0262] En una realización, un concentrado de plasma o composición PRP se pueden mezclar con trombina, preferentemente un suero de trombina de la presente descripción, y mezclarse adicionalmente con un extracto de células y fosfato tricálcico (TCP), ácido hialurónico (HA), el quitosano, la crema, la máscara de crema, otras células de extractos, células de grasa, lubricina, cd-gealtina y/o toxina botulínica.

10 [0263] Aparatos automatizados que emplean la técnica de émbolo para la medición y la detección de la coagulación y las actividades relacionadas con la coagulación comprenden generalmente un cartucho de sensor del émbolo o cartuchos y un aparato controlado por microprocesador en el que se inserta el cartucho. El aparato actúa sobre el cartucho y la muestra de sangre colocada en su interior para inducir y detectar el evento relacionado con la coagulación. El cartucho incluye una pluralidad de células de prueba, cada uno de los cuales está definido por un miembro similar a un tubo que tiene una cámara superior de reacción donde se encuentra un conjunto de émbolo y donde la prueba analítica se lleva a cabo, y una cámara de reactivo que contiene un reactivo o reactivos. Para un tiempo de coagulación activado (ACT) de prueba, por ejemplo, los reactivos incluyen un agente de reactivación para activar la coagulación de la sangre. Un miembro de tapón sella el fondo de una cámara de reactivo. Cuando la prueba comienza, el contenido de la cámara del reactivo son impulsa a la cámara de reacción para mezclarse con la muestra de fluido, por lo general sangre humana o sus componentes. Un accionador, que es una parte del aparato, levanta el conjunto de émbolo y lo baja, reciprocando con ello el conjunto de émbolo a través del depósito de líquido en la cámara de reacción. El conjunto de émbolo desciende por la fuerza de la gravedad, resistido por una propiedad del fluido en la cámara de reacción, tal como su viscosidad. Cuando la propiedad de la muestra cambia de una manera predeterminada como resultado de la aparición de una actividad relacionada con coagulación, se cambia la velocidad de descenso del conjunto de émbolo a través del mismo. Tras un cambio suficiente en la velocidad de descenso, se detecta la actividad relacionada con coagulación y se indica por el aparato.

20 [0264] Las composiciones de curado de herida o tejido, agentes hemostáticos, composiciones de células, composiciones de células aisladas, preparaciones de células o extractos de células descritos en este documento pueden combinarse con un concentrado de plaquetas (PRP).

25 [0265] En otra forma de realización adicional, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición de curado de herida o tejido, un agente hemostático, una composición celular o una preparación de células en la que el extracto celular es un extracto de queratinocitos.

30 [0266] En otra forma de realización adicional, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición de curado de herida o tejido, un agente hemostático, una composición celular o una preparación de células en la que el extracto celular es un extracto autólogo de los queratinocitos.

35 [0267] En otra forma de realización adicional, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición de curado de herida o tejido, un agente hemostático, una composición celular o una preparación de células en la que el extracto celular es un extracto de células del músculo esquelético, tales como células progenitoras musculares o células madre satélite.

40 [0268] En otra realización adicional, la invención prevé un procedimiento para la preparación de una composición de curado de herida o tejido, un agente hemostático, una composición celular o una preparación de células en la que el extracto celular es un extracto de fibroblastos.

45 [0269] En otra forma de realización adicional, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición de curado de herida o tejido, un agente hemostático, una composición celular o una preparación de células en la que el extracto celular es un extracto de los adipocitos, preadipocitos, células pre-endoteliales, células madre mesenquimales.

50 [0270] En otra forma de realización adicional, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición de curado de herida o tejido, un agente hemostático, una composición celular o una preparación de células en la que el extracto celular es un extracto de condrocitos.

55 [0271] En otra forma de realización adicional, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición de curado de herida o tejido, un agente hemostático, una composición celular o una preparación de células en la que el extracto celular es un extracto de células madre tales como células madre de cordón umbilical.

60 [0272] En otra forma de realización adicional, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición de curado de herida o tejido, un agente hemostático, una composición celular o una preparación de células en la que el extracto celular es un extracto de células de los tendones.

65 [0273] En otra forma de realización adicional, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición de curado de herida o tejido, un agente hemostático, una composición celular o una preparación de células en la que el extracto celular es un extracto de filtro perióstico o células de la encía.

[0274] En otra forma de realización adicional, la invención proporciona un proceso para la preparación de una

composición de curado de herida o tejido, un agente hemostático, una composición celular o una preparación de células en la que el extracto celular es un extracto de células de la córnea.

5 **[0275]** En otra forma de realización adicional, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición de curado de herida o tejido, un agente hemostático, una composición celular o una preparación de células en la que el extracto celular es un extracto de células de médula ósea.

10 **[0276]** En otra forma de realización adicional, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición de curado de herida o tejido, un agente hemostático, una composición celular o una preparación de células en la que el extracto celular es un extracto de células osteoblásticas.

15 **[0277]** En otra forma de realización adicional, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición de curado de herida o tejido, un agente hemostático, una composición celular o una preparación de células en la que el extracto celular es un extracto de células de Schwann.

**[0278]** En otra forma de realización adicional, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición de curado de herida o tejido, un agente hemostático, una composición celular o una preparación de células en la que el extracto celular es un extracto de células de los islotes del páncreas.

20 **[0279]** En otra realización adicional, la composición de concentrado de plaquetas aislado, la composición de curador de herida o tejido, el suero de trombina enriquecido, el extracto de células, la composición de curador de herida o tejido, el agente hemostático, la composición celular y/o la preparación de células es/son autóloga(s).

25 **[0280]** En un aspecto adicional, el presente documento describe un kit adaptado para regeneración tisular de acuerdo con el seguro de información que se expone en el que el kit comprende además viales separados que contienen gluconato de calcio, albúmina, quitosano, crema, lubricina, TCP, ETOH y/o CaCl<sub>2</sub>, sostenedores de jeringa, cespitoso y/o un aplicador de punta con una salida dual. El uso de suero autólogo de trombina según la invención tiene la ventaja de que los aditivos como ETOH, CaCl<sub>2</sub> no son necesarios para la preparación de un curador de herida o preparación PRP.

30 **[0281]** En otra realización, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición celular de acuerdo con a la invención en el que el extracto celular proporcionado en el paso d) o e) se obtiene por un procedimiento que comprende las etapas de:

- 35 (A) Proporcionar dichas células en un concentrado de plaquetas según la invención,  
 (B) Opcionalmente el cultivo de las células, y  
 (C) Re-suspender las células cultivadas obtenidas en la etapa (B) en un concentrado de plaquetas de acuerdo con la invención.

40 **[0282]** En una realización adicional, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición celular de acuerdo con la invención en la que la expansión de las células en el paso (A) se realiza en un concentrado de plaquetas de acuerdo con la invención, tales como la concentración final en las plaquetas está comprendida entre aproximadamente 5% y aproximadamente 40% del volumen del medio de cultivo.

45 **[0283]** En otra realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de una composición de células según la invención en la que la etapa de cultivo de células (B) comprende al menos una etapa de aplicar placas a las células, por ejemplo, en una superficie de cultivo de células tal como una placa de Petri o un frasco de cultivo.

50 **[0284]** En otra realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de una composición de células según la invención que comprende al menos una etapa adicional de recoger las células después de la etapa de cultivo celular (B).

55 **[0285]** En otra realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de una composición de células según la invención el que la etapa de cultivo de células (B) se realiza a 37 ° C.

60 **[0286]** En otra realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de una composición de células según la invención en la que la etapa de cultivo de células (B) se lleva a cabo bajo un flujo de gas que comprende oxígeno o aire y dióxido de carbono, típicamente el flujo de gas comprende 95% de oxígeno o aire y 5% de dióxido de carbono.

**[0287]** En otra realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de una composición de células de acuerdo con la invención en la que la etapa de cultivo de células (B) dura de 3 hasta aproximadamente 4 semanas.

65 **[0288]** En otra realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de una

composición de células de acuerdo con la invención en la que durante la etapa de cultivo de células (B), el medio de cultivo celular se cambia regularmente durante la incubación, típicamente aproximadamente cada 3 días.

5 **[0289]** En otra realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de una composición de células según la invención en la que la etapa de cultivo de células (B), comprende al menos una etapa de exposición de las células a la luz visible, típicamente a aproximadamente 633 nm, durante unos 10 minutos. En otro aspecto, la etapa de exposición a la luz visible se repite una vez a la semana durante incubación celular.

10 **[0290]** En otra forma de realización adicional, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición celular de acuerdo con la invención en la que la composición de células es una composición celular de queratinocitos o fibroblastos y la etapa de cultivo de células (B), comprende por lo menos una etapa de exposición de las células a la luz visible, típicamente a aproximadamente 633 nm, durante unos 10 minutos. En otro aspecto, la etapa de exposición a la luz visible se repite una vez por semana durante la incubación de células.

15 **[0291]** En otra realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de una composición de células según la invención en la que la etapa de cultivo de células (B), comprende al menos una etapa de adición de concentrado de plaquetas diluido de acuerdo con la invención tales como la concentración final en las plaquetas comprendidas entre aproximadamente 5% y aproximadamente 40% del volumen del medio de cultivo.

20 **[0292]** En otra forma de realización adicional, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición celular de acuerdo con la invención en la que la composición de células es una composición celular de queratinocitos o fibroblastos y la etapa de cultivo de células (B), comprende por lo menos una etapa de adición de concentrado de plaquetas diluido de acuerdo con la invención, tales como la concentración final en las plaquetas comprendida entre aproximadamente 5% y aproximadamente 40% del volumen del medio de cultivo.

25 **[0293]** En otra realización, la presente invención proporciona una composición de célula aislada obtenible a partir de un proceso de acuerdo con la invención.

30 **[0294]** En otra realización, el presente documento describe una composición de célula aislada, en la que la composición de células aislada es una composición de las células de grasa tal como una composición de células de adipocitos.

35 **[0295]** En otra realización, el presente documento describe una composición de célula aislada, en la que la composición de células aisladas es una composición de células de músculo tal como una célula de mioblastos o una composición de células madre satélite.

40 **[0296]** En otra realización, el presente documento describe una composición de célula aislada, en el que la composición de células aislada es una composición de las células de la córnea.

45 **[0297]** En otra realización, el presente documento describe una composición de célula aislada, en el que la composición de células aislada es una composición de células de cartilago, tal como una composición celular de condrocitos.

50 **[0298]** En otra realización, el presente documento describe una composición de célula aislada, en el que la composición de células aislada es una composición celular de la piel, tal como una composición de células de fibroblasto o células de queratinocitos.

55 **[0299]** En otra realización, el presente documento describe una composición de célula aislada, en el que la composición de células aislada es un filtro perióstico o composición de células gengivales.

60 **[0300]** En otra realización, el presente documento describe una composición de célula aislada, en el que la composición de células aislada es una composición de células de tendones, tales como la composición celular de células del tendón.

65 **[0301]** En otra realización, el presente documento describe una composición de célula aislada, en el que la composición de células aislada es una composición de células madre, tal como una composición de células madre de cordón umbilical.

**[0302]** En otra realización, el presente documento describe una composición de célula aislada, en el que la composición de células aislada es una composición de las células de la médula ósea.

**[0303]** En otra realización, el presente documento describe una composición de célula aislada, en el que la composición de células aislada es una composición de células de Schwann.

**[0304]** En otra realización, el presente documento describe una composición de célula aislada, en la que la composición de célula aislada es una composición de células de los islotes del páncreas.

5 **[0305]** En otra realización, el presente documento describe una composición de célula aislada, en la que la composición de células aislada es una composición celular de los osteoblastos.

10 **[0306]** En otra realización, el presente documento describe una composición de célula aislada, en el que las células están en una concentración de aproximadamente  $3 \times 10^5$  a aproximadamente  $10^6$  células/ml de plasma o plasma enriquecido.

15 **[0307]** En otra realización, el presente documento describe composiciones, métodos y usos para la promoción de la herida o tejido de sellado y/o tejido y/o la regeneración ósea en una herida de un humano o un animal inferior como se describe en el presente documento.

20 **[0308]** En otra forma de realización adicional, el presente documento describe composiciones, métodos y usos para la promoción del sellado de heridas o tejidos y/o regeneración de tejido y/o ósea en una herida de un mamífero, preferiblemente humano. En otra realización, el presente documento describe composiciones, métodos y usos para inducir la regeneración periodontal en una herida o un defecto periodontal de un mamífero con la enfermedad periodontal u otra condición tal como se describe en el presente documento.

25 **[0309]** En otra forma de realización adicional, el presente documento describe un método para inducir la regeneración periodontal en una herida o un defecto periodontal o cavidad de un mamífero con la enfermedad periodontal u otra condición en la que el mamífero es humano.

30 **[0310]** En otra forma de realización adicional, el presente documento describe un método para inducir la regeneración periodontal en una herida o un defecto periodontal o cavidad según la descripción en que dicha cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición de heridas o curador de tejido se aplica en una forma de gel semi-sólido 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, 11 (6), 41-44.

35 **[0311]** En otra realización, el presente documento describe un método para promover la regeneración de tejido de la piel en una cicatriz o arrugas como se describe en el presente documento.

40 **[0312]** En otra realización, el presente documento describe un método para inducir la regeneración miocárdica de acuerdo con la divulgación, en el que dicha cantidad terapéuticamente efectiva de dicha composición de células de músculo según la invención se inyecta en combinación con un concentrado de plaquetas (PRP) en el miocardio, por lo general en el miocardio ventrículo izquierdo. La inyección puede hacerse como inyección directa o inyección de catéter múltiple. Los mioblastos o células de satélite pueden modificarse por ingeniería genética ex vivo como se describe en la presente descripción a amnios biológico humano de-epitelizado e irradiado por UV y constructo biocompósito, como una monocapa en la presente descripción. El amnios se sutura al epicardio isquémico con el fin de repoblar el tejido subyacente con células madre, con el fin de mejorar el poder de contracción de la pared ventricular y los miocitos.

45 **[0313]** En otra realización, el presente documento describe un método para inducir la regeneración miocárdica de acuerdo con la divulgación, en el que dicha cantidad terapéuticamente efectiva de dicha composición de células de músculo según la invención se inyecta en combinación con un concentrado de plaquetas (PRP) en el miocardio, junto con una cantidad terapéuticamente eficaz de composición celular de fibroblastos según la invención en combinación con un concentrado de plaquetas (PRP). En otra realización, el presente documento describe un método para inducir la regeneración de infarto de acuerdo con la invención, en el que se aplica dicha cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición de células de músculo según la invención en combinación con un concentrado de plaquetas (PRP) en la superficie ventricular en forma de un parche de amnios incubado preablemente en una composición de mioblastos y células madre satélite de acuerdo con la divulgación.

50 **[0314]** En otra realización, el presente documento describe un método para inducir la regeneración de la córnea de acuerdo con la divulgación, en el que dicha cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición de células de la córnea según la invención en combinación con un concentrado de plaquetas (PRP) se aplica al tejido de la córnea en la forma de un parche de amnios preablemente extendido sobre una lente de contacto soluble.

55 **[0315]** Dicho método de tratamiento de una herida, un tejido o una enfermedad pueden incluir el uso de cualquiera de las composiciones descritas en este documento; También puede incluir el uso de cualquier composición hecha por cualquiera de los métodos descritos en este documento.

60 **[0316]** Los métodos, los dispositivos y el kit según la invención presentan las ventajas de proporcionar una manera eficaz en el tiempo y de relativamente bajo coste de la obtención de concentrados de plaquetas en una única operación que es fácil de aplicar y adaptar a un punto la aplicación de la atención. Los métodos de la invención presentan la ventaja de no sólo llevar a preparaciones enriquecidas en las que las plaquetas se concentran en un

65

rendimiento alto, sino también en que el contenido en los eritrocitos es bajo. Las composiciones de la invención presentan la ventaja de tener un alto contenido en plaquetas, un bajo contenido en eritrocitos con propiedades completamente mantenidas para su posterior uso terapéutico in-vivo. Más específicamente, se mantiene la capacidad de las plaquetas para liberar los principales factores de crecimiento implicados en la regeneración tisular (PDGF, TGF-beta, IGF, VEGF y EGF) en los niveles de varios días (o el período de vida de 30 días de los trombocitos). Además, en la medida en que las composiciones de la invención se hacen a partir de sangre autóloga, la invención descrita en el presente documento reduce los riesgos de transmisión de enfermedades y riesgos de inmunorreacción asociados con el uso de los materiales de tratamiento a partir de materiales biológicos obtenidos a partir de uno o más terceros. Por consiguiente, la invención proporciona un material de curado de heridas y de regeneración de tejido mejorada, preferiblemente autóloga, la promoción de tejido tal como la piel, el cartílago y la regeneración ósea, especialmente la cicatrización y/o el rejuvenecimiento. Los beneficios de la invención comprenden un método simple y rápido de preparación de materiales de curado de heridas y de regeneración de tejido mejorada adaptados a servicios de punto de atención y que han demostrado disminuir el tiempo de curación de heridas, el dolor asociado y los costos médicos. Además, la cicatrización de heridas y material de regeneración de tejidos disminuye el riesgo de rechazo del injerto y mejora las tasas de éxito del injerto. Además, los materiales de curación de herida y de regeneración de tejido mejorados conducen a cicatrices que tienen un aspecto final estético mucho mejor y al relleno durable de cicatrices y arrugas.

**[0317]** Típicamente, los extractos de células se obtienen de una biopsia de tejido en la que la biopsia se lleva a cabo preferiblemente el mismo día en que se realiza la mezcla con el concentrado de plaquetas. El tamaño de las biopsias se adapta a la finalidad terapéutica dirigida y los tipos de células usadas en la preparación de la composición de células de acuerdo con la interinvención. Ejemplos de biopsias se dan en los ejemplos de continuación para diferentes tipos de tejidos. En otro aspecto, el presente documento describe un tubo que comprende al menos un filtro que separa el tubo en dos partes.

**[0318]** En otro aspecto, el presente documento describe un tubo separado en dos partes por al menos y preferiblemente un filtro.

**[0319]** En una realización, el tubo se utiliza para recoger y/o separar una muestra de fluido.

**[0320]** Preferiblemente, las dos partes difieren en tamaño y/o diámetro.

**[0321]** En otro aspecto, el presente documento describe un tubo para recoger y separar una muestra de fluido que comprende

- i) dos partes distintas que difieren en tamaño y diámetro,
- ii) al menos un filtro que separa las dos partes, y
- iii) opcionalmente un anticoagulante.

**[0322]** En una realización preferida de la invención, el tubo consiste de las características como se ilustra en las Figuras 1 a 14.

**[0323]** En una realización preferida, el tubo está hecho de Polímero de Olefina Cíclica (COP) o Copolímero de Olefina Cíclica (COC).

**[0324]** En una realización, el tubo contiene un anti-coagulante, solución de citrato sódico preferiblemente tamponada o un citrato sódico anhidro.

**[0325]** En una realización preferida, el tubo contiene una solución de citrato sódico tamponada a 0,10 M o un citrato sódico anhidro a 3,5 mg/mL.

**[0326]** En una realización preferida, el filtro está fijado al tubo. Preferiblemente, el filtro se prolonga verticalmente con el fin de tener una superficie extendida en contacto con el tubo (extendido en el eje vertical del tubo). Esto tiene la ventaja de aumentar la estabilidad del filtro, impidiendo además cualquier movimiento del filtro. En una realización preferida, el tubo comprende un filtro hecho de dos capas. Preferiblemente, las 2 capas están superpuestas (una encima de la otra; Figura 4, Figuras 10 a 14). Preferiblemente, la capa exterior se prolonga verticalmente con el fin de tener una superficie extendida en contacto con el tubo (extendido en el eje vertical del tubo Figuras 2, 3 y 5A). Preferiblemente, la capa interior también se prolonga con el fin de alinearse con la capa exterior. En una realización, la capa interior no se prolonga (sólo en el eje horizontal). En una realización, 2, 3, 4, 5 o más filtros están comprendidos en el tubo.

**[0327]** En una realización preferida, la primera parte del tubo situada en la parte superior del tubo es de mayor volumen que la segunda parte situada en la parte inferior o fondo del tubo. En una realización preferida adicional, la primera parte del tubo que comprende el filtro tiene un volumen de aproximadamente 9,5 cm<sup>3</sup> y la segunda parte del tubo tiene un volumen de aproximadamente 3,5 cm<sup>3</sup> (Figura 5A).

- 5 **[0328]** En una realización preferida, el volumen de la primera parte del tubo situada en la parte superior del tubo que comprende el filtro representa aproximadamente el 70% del volumen total del tubo. En una realización, el volumen de la primera parte del tubo situada en la parte superior del tubo que comprende el filtro representa alrededor del 51%, 55%, 60%, 65%, 68%, 70%, 73%, 75%, 80%, 90%, 95% o más del volumen total del tubo. En una realización preferida adicional, el volumen de la segunda parte del tubo situada en la parte inferior del tubo representa alrededor del 30% del volumen total del tubo. En una realización, el volumen de la segunda parte del tubo situada en la parte inferior del tubo representa alrededor del 49%, 45%, 40%, 35%, 32%, 30%, 27%, 25%, 20 %, 15%, 10% o 5% o menos del volumen total del tubo.
- 10 **[0329]** En una realización preferida, el tubo tiene un volumen total de aproximadamente 13 cm<sup>3</sup> (Figura 5A).
- 15 **[0330]** En una realización preferida, la segunda parte del tubo situada en la parte inferior del tubo tiene un diámetro menor que la primera parte del tubo situada en la parte superior del tubo. Esto tiene la ventaja de que el filtro se mantendrá en su posición bajo la centrifugación o cualquier otro tipo de estrés mecánico.
- 20 **[0331]** En una realización preferida, el diámetro exterior de la primera parte del tubo situada en la parte superior del tubo es de alrededor de 15,5 mm o de aproximadamente 15,4 mm (Figura 3). En una realización preferida, el diámetro interno de la primera parte del tubo situada en la parte superior del tubo es de aproximadamente 13,32 mm o 13,31 mm (Figura 3).
- 25 **[0332]** En una realización preferida, el diámetro exterior de la segunda parte del tubo situada en la parte inferior del tubo es de alrededor de 13,7 mm (Figura 5A). En una realización preferida, el diámetro interno de la parte segunda del tubo situada en la parte inferior del tubo es de alrededor de 11,6 mm.
- 30 **[0333]** En una realización preferida, un filtro hecho de dos capas separa las dos partes del tubo. Preferiblemente, las 2 capas están superpuestas (una encima de la otra; la Figura 4, las Figuras 10 a 14).
- 35 **[0334]** Un filtro preferido se muestra en la Figura 4 y las Figuras 7 a 14. Preferiblemente, el filtro comprende una capa interna y externa (Figuras 10, 11 y 13).
- 40 **[0335]** En una realización preferida, el filtro está fijado al tubo. En otra realización, el filtro no está fijado al tubo.
- 45 **[0336]** En una realización, el filtro comprende una serie simétrica de rangos con aberturas dispuestas como se muestra en las Figuras 7A, 7B, 8 y 9. Preferiblemente, el filtro consiste en 4 series simétricas de rangos con 2 rangos por serie, constando cada rango de una abertura. Para la primera serie de aberturas situadas hacia el centro del tubo, la distancia entre la parte interna de una abertura y la parte interna de otra abertura es de aproximadamente 5,13 mm (Figura 4, punto 4). Para la primera serie de aberturas situadas hacia el centro del tubo, la distancia entre la parte externa de una abertura y la parte externa de otra abertura es de aproximadamente 5,67 mm (Figura 4, punto 3). Para la segunda serie de aberturas situadas hacia el borde del tubo, la distancia entre la parte interna de una abertura y la parte interna de otra abertura es de aproximadamente 7,73 mm (Figura 4, punto 2). Para la segunda serie de aberturas situadas hacia el borde del tubo, la distancia entre la parte externa de una abertura y la parte externa de otra abertura es de aproximadamente 8,27 mm (Figura 4, punto 1). En una realización, la distancia de cada abertura es de aproximadamente 0,53 o 0,54 mm (Figura 9 y la Figura 14, punto 21).
- 50 **[0337]** Preferiblemente, la capa superior o interna consiste en 4 series simétricas de rangos con 2 rangos por serie (Figura 9, 13 y 14), consistiendo cada rango en un número apropiado de embudos dispuestos regularmente (Figuras 13 y 14). Preferiblemente, el hueco o abertura situada en la parte inferior de cada embudo es de una longitud de aproximadamente 0,27 mm (Figura 14, punto 26). Preferiblemente, la distancia de un extremo al otro del embudo es de aproximadamente 1 mm, correspondiendo al grosor de la capa superior (Figura 14, punto 24). Preferiblemente, el espesor de la capa superior es de aproximadamente 1 mm (Figura 12, punto 34 y Figura 14, punto 24). El número de embudos dependerá del tamaño de la capa. Preferiblemente, el embudo comprende una abertura cerrada en su base (elemento 26 de la Figura 14)
- 55 **[0338]** Preferiblemente, la capa inferior o externa se compone de 4 series simétricas de rangos con 3 rangos por serie (Figura 8, 13 y 14), consistiendo cada rango de un número apropiado de trapecios dispuestos regularmente (Figuras 13 y 14). El número de trapecios dependerá del tamaño de la capa. Preferiblemente, cada trapecioide está separado por una distancia de aproximadamente 0,53 mm (Figura 14). La base de cada trapecioide es de una longitud de aproximadamente 0,77 mm (Figura 14). Preferiblemente, la altura de cada trapecioide es de aproximadamente 0,5 mm (Figura 14). Preferiblemente, el espesor de la capa inferior es de aproximadamente 1 mm (Figuras 12 y 14).
- 60 **[0339]** Preferiblemente, los rangos de las capas superior e inferior siempre se alternan. Preferiblemente, una primera gama de trapecios de la capa inferior será seguida por una primera gama de embudos de la capa superior, que se seguirán por una segunda gama de trapecios de la capa inferior seguida de una segunda gama de embudos de la capa superior que se seguirá finalmente de una tercera gama de trapecios de la capa inferior (Figuras 4, 13 y 14).
- 65

5 [0340] Preferiblemente, cada embudo de la capa superior se sitúa de tal manera que la prolongación del centro del embudo caerá aproximadamente entre dos trapezoides de la capa inferior (Figuras 4, 13 y 14). Más preferiblemente, cada embudo de la capa superior está situado de tal manera que la prolongación del centro del embudo caerá exactamente entre dos trapecios de la capa inferior (Figuras 4, 13 y 14). Preferiblemente, un trapecioide se alterna continuamente con un embudo.

10 [0341] Cuando el tubo de la presente invención está centrifugado, la abertura cerrada en la base del embudo (elemento 26 de la figura 14) se abre debido a la fuerza centrífuga que permite el paso de los glóbulos rojos que están dirigidos entre dos trapezoides y, finalmente, a la sección inferior del tubo. Una vez que la centrifugación se detiene, la apertura de los embudos se cerrará obstaculizando el reflujo de los glóbulos rojos a la parte superior del tubo. Los trapecios de la capa inferior situada debajo de cada embudo facilitarán el paso de los glóbulos rojos a la parte inferior del tubo y ayudarán en la prevención del reflujo de los glóbulos rojos.

15 [0342] Preferiblemente, el volumen de la capa superior es de aproximadamente 0,26 cm<sup>3</sup>. Preferiblemente, el volumen de la capa inferior es de aproximadamente 0,29 cm<sup>3</sup>.

20 [0343] Preferiblemente, la capa superior está hecha de polipropileno (PP). Preferiblemente, la capa inferior está hecha de un elastómero termoplástico (TPE). Otros componentes pueden ser utilizados como se describe en la presente invención o se conocen por el experto en la materia.

25 [0344] Preferiblemente, el centro del filtro está curvado (Figuras 4, 10 a 13). Esto tiene la ventaja de canalizar toda la sangre hacia los embudos. Preferiblemente, el filtro está curvado de una manera tal como para tener una longitud de aproximadamente 0,5 mm desde el centro del tubo a la base de la capa inferior (Figura 12, punto 36).

30 [0345] Preferiblemente, la altura de la capa inferior es de aproximadamente 8 mm (Figura 2 y la Figura 10, punto 14). Preferiblemente, el diámetro exterior de la capa inferior es aproximadamente 12,74 mm (Figura 10, artículo 17). Preferiblemente, el diámetro interior de la capa superior es de aproximadamente 9,6 mm (Figura 10, punto 16). Preferiblemente, la altura de la capa de la superficie no curvada superior de la capa superior es de aproximadamente 6 mm (Figura 10, punto 9). Preferiblemente, la altura de la capa desde el centro de la superficie superior curvada de la capa superior es de aproximadamente 5,5 mm (Figura 10, punto 11).

[0346] En una realización de la invención, el tubo comprende solamente un filtro con embudos.

35 [0347] En otra realización de la invención, el número de embudos y/o trapezoides puede variar. En otra realización de la invención, el número de rangos de embudos y/o trapezoides puede variar. En otra forma de realización de la invención, el número de serie simétrica de rangos de embudos y/o trapezoides puede variar. En otra realización de la invención, el tubo consiste en 2 series simétricas de rangos de embudos y/o trapezoides.

40 [0348] La presente invención también abarca un tubo en el que las longitudes de todos los componentes difieren de los indicados en el presente documento. La presente invención también abarca un tubo en el que las longitudes de todos los componentes difieren de los indicados en este documento con una longitud de aproximadamente 0,1 mm, 0,2 mm, 0,3 mm, 0,5 mm, 1 mm, 1,5 mm, 2 mm, 5 mm, 8 mm, 10 mm, 15 mm, 20 mm, 50 mm, 75 mm, 1 cm, 2 cm, 5 cm, 10 cm o más.

45 [0349] En una realización, el filtro tiene la forma o modelo de un láser.

50 [0350] Los tubos de la presente invención tienen la ventaja de separación de glóbulos rojos del plasma con alta eficacia. El uso de los tubos de la presente invención, el porcentaje de glóbulos rojos en el plasma se redujo en más de 99%, 98%, 95%, 93%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65% o 60% en comparación con el porcentaje de glóbulos rojos presentes en sangre entera.

55 [0351] COC o COP, aparte del ahorro de costes y de ser un material médico rígido y fuerte, tienen la ventaja de que su transparencia es similar al vidrio en su forma natural. Material de COC típico tendrá un módulo mayor que el HDPE (polietileno de alta densidad (HDPE) o polietileno de alta densidad (PEHD) es un termoplástico de polietileno hecho de petróleo) y PP (polipropileno o polipropeno (PP) es un polímero termoplástico). COC también tiene una alta barrera contra la humedad para un polímero claro, junto con una baja tasa de absorción. En aplicaciones médicas, se observa que COC es un producto de alta pureza con extractables bajos. COC es también un producto libre de halógenos.

60 [0352] El material de COC tiene excelente claridad óptica y una alta barrera al vapor de agua. Moldea los rasgos finos con gran fidelidad, resiste todos los métodos de esterilización común, y se resiste a la hidrólisis y una amplia gama de sustancias químicas.

65 [0353] El material de COC también tiene buena resistencia al calor, propiedades mecánicas, dureza, estabilidad dimensional, y propiedades de aislamiento eléctrico. Debido a que tiene pocos extractables y tiene una excelente biocompatibilidad in-vivo e in-vitro, cumple requisitos de USP Clase VI e ISO 10993 y ha recibido números de

archivo maestra de drogas y dispositivos de la FDA.

**[0354]** Además, COC, con su transparencia, rigidez, bajo peso, calor y resistencia química, biocompatibilidad, estabilidad dimensional a la barrera de humedad (baja permeabilidad a la humedad), moldeabilidad, y falta de halógenos, ofrece muchos beneficios en uso. Reduce la rotura en dispositivos y embalajes comparados con el vidrio, extiende la vida útil de los medicamentos, permite lecturas de diagnóstico en las longitudes de onda UV, y permite equipos pequeños y más rápidos de diagnóstico. Además, los grados de COC también pueden someterse a esterilización por la radiación gamma, óxido de vapor y etileno y por lo tanto se puede esterilizar por todos los métodos comunes.

**[0355]** En otro aspecto, el presente documento describe un dispositivo de sistema de bolsa de sangre o tubos de recogida de sangre de acuerdo con la Figura 15.

**[0356]** La sangre recogida y/o almacenada en un dispositivo de sistema de bolsa de sangre o tubos de recogida de sangre según la invención puede utilizarse en cualquiera de los procesos, composiciones, productos, usos de acuerdo con la presente descripción.

**[0357]** Los tubos de recogida de sangre o bolsas se pueden evacuar y/o sellar. Los tubos de recogida de sangre o bolsas se pueden llenar de gel y/o anticoagulante tixotrópico.

**[0358]** El sistema de bolsa de sangre o de dispositivos de tubos de recogida de sangre de la descripción consiste en un colector de sangre multi-canal que permite la entrega de los componentes del plasma y de células a múltiples bolsas o tubos.

**[0359]** En otro aspecto, el presente documento describe un dispositivo de sistema de bolsa de sangre o de tubos de recogida de sangre que comprende un único conducto de entrada conectado a un adaptador de conductos múltiples con conductos adaptadores conectados a al menos dos bolsas o tubos, en el que cada conducto de adaptador del adaptador de conductos múltiples está conectado a una sola bolsa o tubo.

**[0360]** En otro aspecto, el presente documento describe un dispositivo de sistema de bolsa de sangre o tubos de recogida de sangre que comprende:

- a) un único conducto de entrada,
- b) un adaptador de conductos múltiples con conductos de adaptador, y
- c) al menos dos bolsas o tubos,

en el que el conducto de entrada única está conectado al adaptador de conducto múltiple y en el que cada conducto de adaptador del adaptador de conducto múltiple está conectado a una sola bolsa o tubo.

**[0361]** En una realización, el presente documento describe un dispositivo de sistema de bolsa de sangre o tubos de recogida de sangre de acuerdo con la invención para la puesta en común de componentes de la sangre.

**[0362]** Preferiblemente, el sistema de bolsa de sangre o dispositivo de tubos de recogida de sangre que comprende un conducto de entrada (1), un adaptador de conductos múltiples (2), conductos del adaptador (3) y al menos dos bolsas o tubos (4) como se ilustra en Figura 15.

**[0363]** En una realización, el sistema de bolsa de sangre o dispositivo de tubos de recogida de sangre comprende además una o más unidades de fijación (5) (Figura 15). Preferiblemente, se proporciona una unidad de fijación para cada conducto adaptador. En una realización, se proporcionan dos o más unidades de fijación para cada conducto adaptador.

**[0364]** Preferiblemente, cada bolsa del sistema de bolsa de sangre o dispositivo de tubos de recogida de sangre comprende además una tapa. La Figura 15 ilustra un sistema de bolsa de sangre o dispositivo de tubos de recogida de sangre en el que cada bolsa (4) comprende una tapa (6). Preferiblemente, la tapa se puede desbloquear o desenroscar a fin de conectar una jeringa estéril. La tapa tiene la ventaja de permitir la fácil aspiración del contenido de la bolsa en condiciones estériles. En una realización, puede utilizarse una jeringa Luer-Lock. Alternativamente, una aguja puede ser usada en lugar de una tapa.

**[0365]** Preferiblemente, el conducto de entrada y conductos de adaptador son flexibles. Preferiblemente, el conducto de entrada y conductos de adaptabilidad son tubulares.

**[0366]** En una realización, el dispositivo de sistema de bolsas de sangre o tubos de recogida de sangre comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o más bolsas o tubos. Preferiblemente, el dispositivo de sistema de bolsa de sangre o tubos de recogida de sangre comprende 8 bolsas o tubos.

**[0367]** Preferiblemente, en el presente documento se describen bolsas desechables o tubos de un solo uso.

- 5 **[0368]** En una realización, cada bolsa puede contener hasta aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30 ml o más de sangre. Preferiblemente, cada bolsa contiene aproximadamente 10 ml de sangre. Preferiblemente, el volumen de cada bolsa está adaptado para un solo uso. Preferiblemente, la cantidad de sangre recogida en cada bolsa está en una cantidad suficiente para un solo uso.
- 10 **[0369]** Preferiblemente, el sistema de bolsa de sangre o dispositivo de tubos de recogida de sangre proporciona una comunicación de flujo sellado. Más preferiblemente, el sistema de bolsas de sangre o dispositivo de tubos de recogida de sangre proporciona una comunicación de flujo de sellado y estéril.
- 15 **[0370]** Preferiblemente, cada bolsa puede sellarse individualmente una vez que las bolsas o tubos están llenos. Esto tiene la ventaja de tener individuales, listos para el uso, las bolsas desechables individuales o tubos.
- 20 **[0371]** Preferiblemente, cada bolsa se somete a una etapa de vacío. Preferiblemente, el sistema de recogida de sangre o dispositivo de tubos de bolsa de sangre se somete a una etapa de vacío.
- 25 **[0372]** En una realización preferida, cada bolsa es inserta en una segunda protección o sobre. Esto tiene la ventaja de ofrecer una doble protección en conformidad con las normas ISO en los envases (ISO11607-1 y/o ISO11607-2).
- 30 **[0373]** Preferiblemente, cada bolsa se inserta en el segundo sobre después de vacío. Preferiblemente, la segunda envoltura se somete a vacío y sellado. Esterilización, pasos de vacío y protección doble ofrecen bolsas o tubos que son muy seguros de usar.
- 35 **[0374]** En una realización, el flujo de fluido puede ser controlado por medios de válvula convencional, tales como los tapones de ajuste, tapones extraíbles, o abrazaderas de diapositivas.
- 40 **[0375]** El sistema de bolsas de sangre o tubos puede ser de construcción convencional siendo hechos de un material plástico que es compatible con la sangre, flexible, translúcido, y esterilizable. El plástico puede ser un cloruro de polivinilo, poliéster, poliolefina, poliuretano, y así sucesivamente, y puede incluir mezclas de los materiales anteriores. El conducto de entrada y/o conductos de adaptador pueden estar hechos de un material plástico que es igual que o diferente del material plástico de las bolsas de sangre o tubos.
- 45 **[0376]** En una realización, medios de filtrado pueden integrarse en el sistema de bolsa de sangre o dispositivo de tubos de recogida de sangre de la divulgación. Los medios de filtrado pueden incluir una carcasa hecha de cloruro de polivinilo rígido o similares y ajustes de tubería. Medios de filtrado pueden ser llenados con un medio de filtración tal como lana de algodón o acetato de celulosa u otras fibras sintéticas tales como poliéster, poliamidas, y similares. La cantidad de medio de filtración depende de la cantidad de glóbulos rojos que se debe filtrar. Por lo general, alrededor de 20-50 gramos de medio de filtración se emplean por 200-250 ml de concentrado de glóbulos rojos.
- 50 **[0377]** En una realización, una solución aditiva se añade para prolongar la vida de almacenamiento de las células rojas. Esta solución de aditivo puede ser, por ejemplo, una solución de almacenamiento de glóbulos rojos convencionales tal como la descrita en Ginzburg et al, Bibl. Haematol., 1971, N° 3, Pt. 2, 217-220; Wood et al, Blood, vol. 42, No. 1, 1973, 17-25; Beutler, "The Red Cell in Vitro", Grum y Stratton, Nueva York, Nueva York, 1974, p. 201; Lovric et al, Medical Journal of Australia, vol. 2, 183-186, 1977; Patente de Estados Unidos. No. 4.267.269; en una cantidad de alrededor de 50-100 ml por 200-250 ml de concentrado de glóbulos rojos.
- 55 **[0378]** En una realización, las bolsas o tubos del dispositivo de sistema de bolsa de sangre o tubos de recogida de sangre de la descripción pueden contener un anticoagulante como Adenina-Citrato-Dextrosa (ACD), Citrato-Fosfato-Dextrosa (CPD), Fosfato-Citrato-277 milimoles de Dextrosa (CP2D), CPD más adenina, u otro anticoagulante convencional, con el que la sangre recogida se mezcla. La sangre recogida puede entonces procesarse directamente o almacenarse por lo general en alrededor de 4°-6° C. En el procesamiento, el sistema de bolsas se puede centrifugar como es habitual en la técnica haciendo que los glóbulos rojos en la sangre se ubiquen en la parte inferior del bolso. El plasma sanguíneo se expresa mediante técnicas convencionales con plasma fresco y un concentrado de plaquetas.
- 60 **[0379]** La sangre contenida en las bolsas o tubos pueden usarse en todos los aspectos y/o realizaciones de la presente divulgación.
- 65 **[0380]** El sistema de bolsa de sangre o dispositivo de tubos de recogida de sangre se fabrica fácilmente y se produce con gran utilidad en el campo de la medicina. Mediante el uso de esta descripción, las extracciones de sangre se hacen fácilmente más seguras y más eficientes. Ventajosamente, la descripción proporciona trazabilidad más fácilmente. Ventajosamente, en el presente documento se describe un sistema de bolsa de sangre o dispositivo de tubos de recogida de sangre y/o kit y/o el dispositivo que comprende el sistema de bolsa de sangre o dispositivo de tubos de recogida de sangre que permite una colección fácil, rápida y segura, almacenamiento y entrega de cualquier componente de la sangre. Una ventaja adicional es que la recogida, el almacenamiento y la entrega del componente de la sangre se realiza bajo condiciones estériles en conformidad con las normas ISO. Una ventaja adicional es que el sistema de bolsa de sangre o de recogida de sangre del dispositivo de tubos y/o kit y/o

dispositivo están particularmente adaptadas para un uso en el punto de atención.

**[0381]** Preferiblemente, la recogida, el almacenamiento y la entrega del componente de la sangre se realiza bajo condiciones estériles.

**[0382]** En una realización, se proporciona una válvula que puede ser desechable, utilizando un material tal como resina acrílica en su fabricación.

**[0383]** En otro aspecto, el presente documento describe un kit estéril y/o dispositivo que comprende al menos un sistema de bolsa de sangre o dispositivo de tubos de recogida de sangre de acuerdo con la divulgación. Todo el aparato requerido para agrupar componentes de la sangre se proporciona en un kit estéril, haciendo seguro y económico el agrupamiento de los componentes de la sangre.

**[0384]** La sangre proporcionada por el sistema de bolsa de sangre o dispositivo de tubos de recogida de sangre y/o kit y/o dispositivo de acuerdo con la invención puede usarse para la preparación de la trombina, plasma rico en plaquetas, concentrado de plaquetas, extracto celular, composición de células, agente de curado de heridas y/o agente de curado de tejidos o el agente hemostático o cola biológica, ya sea de acuerdo con cualquier aspecto y/o formas de realización descritas en este documento.

**[0385]** La sangre proporcionada por el sistema de bolsa de sangre o dispositivo de tubos de recogida de sangre y/o kit y/o dispositivo de acuerdo con la invención puede ser utilizado para todas las aplicaciones descritas en este documento. Por ejemplo, la sangre proporcionada por el sistema de bolsa de sangre o dispositivo de tubos de recogida de sangre y/o kit según la invención puede utilizarse en cirugía, condiciones ambulatorias o en heridas crónicas.

**[0386]** La sangre proporcionada por el sistema de bolsa de sangre o dispositivo de tubos de recogida de sangre y/o kit y/o dispositivo de acuerdo con la invención puede usarse como un componente homólogo o autólogo.

**[0387]** Cuando se utiliza como un componente homólogo, los componentes de la sangre y/o sangre proporcionada por el sistema de bolsa de sangre o dispositivo de tubos de recogida de sangre y/o kit y/o el dispositivo según la invención representa una alternativa ventajosa eficiente, simple y de bajo costo a los sistemas conocidos. Representa cuando la acumulación de sangre autóloga no es posible.

**[0388]** En adelante ejemplos que ilustran la invención se describen de una manera más detallada y por referencia a las realizaciones representadas en las Figuras.

### Ejemplos

**[0389]** Las siguientes abreviaturas se refieren respectivamente a las definiciones a continuación:

ATS (suero de trombina autóloga); BU (unidad de baxotrobina); DMEM (medio esencial mínimo de Dulbecco); DMSO (sulfóxido de dimetilo); CE (coágulo enriquecido); FCS (suero de ternera fetal); HT (tiempo de curación); UI (Unidad Internacional); PBS (salina tamponada por fosfato); PET (tereftalato de polietileno); PRP (plasma rico en plaquetas); PPP (plasma pobre en plaquetas); USP (Farmacopea de Estados Unidos); cm (centímetro); dl (decilitro); g (gramos); Gy (gris); J (Joule); L (litros); min (minutos); mm (milímetro); M (molar); ml (mililitro); nm (nanómetros); rpm (rotación por minuto); Vol. (volumen).

### PROCEDIMIENTOS Y CONDICIONES GENERALES

**[0390]** Para determinar la eficacia de las composiciones de la invención en la promoción de la curación de las heridas y/o regeneración de hueso y/o de tejidos, se llevan a cabo los siguientes experimentos. muestras de sangre humana completa se recogen en un tubo separador de acuerdo con la invención. Un tubo que puede ser utilizado es por ejemplo un tubo de vidrio de aproximadamente 10 a 15 ml (diámetro de 16 mm y longitud de 120 a 130 mm) que contiene 2 a 3 ml de gel tixotrópico a base de poliéster así como 1 ml de solución de citrato sódico a 0,1 M y que contiene un vacío utilizable de o alrededor de 8,0 ml a 10 ml. Este tubo constituye un dispositivo listo para el uso para la preparación de una composición de concentrado de plaquetas de la invención.

**[0391]** Otro ejemplo de tubo que se puede usar es un tubo de aproximadamente 10 ml en PET (tereftalato de polietileno) que contiene 2 ml de un gel tixotrópico que comprende una mezcla de polímero y una solución de citrato sódico (aproximadamente 0,1 M) y que contiene un vacío utilizable de aproximadamente 8 ml a 10 ml, constituye un dispositivo listo para el uso para la preparación de un concentrado de plaquetas de acuerdo con la invención. Otro ejemplo de tubo que se puede usar es un tubo según la invención. Estos tubos están llenos de 2 componentes, de vacío de aspiración, esterilizados por irradiación (tal como se prescribe en la norma ISO 11137, UNI EN ISO 11737-2, UNI EN 552, UNI EN 556) y sellados herméticamente por un tapón tradicional como un tapón de caucho convencional de bromobutilo moteado para el tubo de vidrio y un tapón clorobutilo que tiene una cubierta de polietileno para la seguridad del operador. Luego, el tubo se centrifuga a o alrededor de 1500g hasta o

aproximadamente 2000 g durante aproximadamente 3 a 10 min, es decir, de o aproximadamente 2'500 rpm hasta o aproximadamente 3'800 rpm con una centrifuga con un rotor de balanceo, que tiene una radio de 14 cm. En caso de una centrifuga que tiene un rotor con un ángulo fijo de aproximadamente 45°, el tiempo de centrifugación debe durar de 5 a aproximadamente 15 min. Alternativamente, el tubo se centrifuga de acuerdo con la invención.

**[0392]** Después de la centrifugación, el concentrado de plaquetas se recoge para su uso en aplicaciones terapéuticas o cosméticas o para la preparación de nuevas composiciones que contienen el concentrado de plaquetas obtenido a través de la mezcla con otros agentes, tales como extractos de células, preferiblemente autólogos (por ejemplo, queratinocitos, fibroblastos, células de médula ósea, osteoblastos, condrocitos, mioblastos, células de la córnea, células de Schwann, células de grasa, células madre de cordón umbilical, células de tendón, páncreas células de los islotes, ligamento y células gingivales, células de membrana de periostio) y/o sustitutos de hueso y/o activadores de coagulación.

**[0393]** El concentrado de plasma, PRP, composiciones se pueden mezclar con fosfato tricálcico (TCP), ácido hialurónico (HA), quitosano, crema, máscara de crema, extractos de células, células de grasa, lubricina, cd-gealtina y/o toxina botulínica.

**[0394]** Para la preparación de composiciones de células, de acuerdo con la invención, las células se preparan de acuerdo con el protocolo general del siguiente modo:

a) Biopsia

**[0395]** Una biopsia del tejido correspondiente se obtiene en condiciones estériles usando métodos estándares adaptados a la célula específica que se recogerá. Las células pueden purificarse por lavado, centrifugación o sedimentación. Las células pueden aislarse por centrifugación, por digestión enzimática (tripsina, colagenasa o tripsina recombinada).

**[0396]** Las células se usan extemporáneamente o opcionalmente después del cultivo ex vivo y la proliferación de células de la siguiente manera.

b) Cultivo ex vivo y proliferación celular

**[0397]** Las células usadas para la preparación de composiciones de células, tales como queratinocitos, células de médula ósea, fibroblastos; células del periostio o de la córnea, tales como células madre del limbo de la córnea; melanocitos y células de Langheran; células grasas; células del músculo, tales como mioblastos y células satélite; osteoblastos; condrocitos; células de cordón umbilical; células de Schwann, células madre mesenquimales (MSCs), preadipocitos, células pre-endoteliales, células de tendón o pancreáticas tradicionalmente se expanden en un medio de soporte celular (por ejemplo, DMEM o de Ham) en placas (por ejemplo placas de Petri o matraz de cultivo), recubiertas con un concentrado de plaquetas, preferiblemente autólogo, enriquecido con fibronectina. Ventajosamente, un medio de soporte celular como DMEM o de Ham no se requiere con el uso de un concentrado de plasma o PRP, en una concentración de aproximadamente 5% a aproximadamente 20%. Además, de manera ventajosa, esto hace las preparaciones de células 20% más efectivas. Las preparaciones de células pueden eventualmente enriquecerse con fibronectina. Los medios de cultivo pueden ser enriquecidos preferiblemente con DMEM por ejemplo en el caso de queratinocitos. Para las células tales como osteoblastos de hueso, condrocitos y mioblastos, es necesaria la digestión enzimática del tejido correspondiente en presencia de por ejemplo colagenasa o tripsina antes de aplicarse placas. La incubación de las placas se lleva a cabo a 37° C bajo un flujo de gas de 95% de oxígeno o aire y 5% de dióxido de carbono.

**[0398]** Típicamente, el tiempo de incubación puede variar de 10 a 20 min. La expansión de las células puede eventualmente ser mejorada (como por ejemplo en el caso de mioblastos, fibroblastos y células de condrocitos) por la fototerapia (por ejemplo, exposición a la luz a 633 nm de aproximadamente 10 min a 2J/cm<sup>2</sup>, una vez a la semana durante la fase de incubación).

**[0399]** Los explantes pueden cultivarse en placas de Petri o matraz de cultivo utilizando la técnica de aire de elevación (Molnar et al, 1996, Tissue Cell., 28: 547-556) y el método de interfaz de aire (Meller et al, 2002, Br. J. Ophth., 86, 463-471) con la mitad del explante expuesta al aire. El medio de cultivo se cambia regularmente durante la incubación, por ejemplo, cada 3 días. La expansión de las células en un modo de 2D como monocapas planas, se obtiene por ejemplo por mioblastos, fibroblastos y células de condrocitos. Un patrón de células 3D creciente se puede obtener por ejemplo para células de la córnea, mioblastos, fibroblastos, condrocitos, adipocitos y queratinocitos, mediante la adición de composición de concentrado de plaquetas autóloga diluida en volumen de aproximadamente 5 a aproximadamente 40% de plasma o plasma enriquecido al medio de cultivo. Típicamente, la adición de la composición de concentrado de plaquetas autólogo diluido puede realizarse dos o tres veces durante el tiempo de incubación. El andamio biológico 3D obtenido de este modo permite mejorar la matriz extracelular que es útil para transferencia de células madre autóloga.

**[0400]** Después de la incubación, las células pueden liberarse de platos con digestión con tripsina suave que levanta las células y permite que se sedimentan. Alternativamente, las células se hacen termosensibles y las células pueden

liberarse por el calor (puede utilizar una placa de Petri revestida por un polímero termosensible).

c) Calidad de célula y control de seguridad

5 **[0401]** La viabilidad de las células en la preparación de células así obtenida se comprueba por el recuento de células  
microscópico, recuento de células de flujo-citometría junto con inmunquímica en marcadores de tejido por técnicas  
estándar. La viabilidad celular también se prueba a través del tripán azul justo después de la liberación de células  
por la tripsina. La seguridad de la preparación también se comprueba a través de verificación de contaminación a  
10 través de ensayo de microbiología para excluir la contaminación con virus o bacterias y para evitar la transferencia  
de infecciones zoonóticas. El uso de suero de ternero fetal (FCS) se evita impidiendo así la transmisión de la  
enfermedad de las vacas locas.

d) Administración de la preparación de células

15 **[0402]** La preparación de células obtenidas anteriormente se coloca en la composición de concentrado de plaquetas  
autólogo eventualmente como vehículo portador celular para el transporte antes de la administración al paciente.  
Entonces, la preparación de células obtenidas anteriormente se inyecta o se trasplanta al paciente. El modo de  
inyección o trasplante tiene que adaptarse al tipo de células contenidas en la preparación de células y para el  
efecto terapéutico o estético dirigido. Se dan más detalles en los ejemplos siguientes en el método para la  
20 preparación y uso de las composiciones de células de acuerdo con la invención más específicamente, dependiendo  
del tipo de células y efecto terapéutico o estético dirigido.

**[0403]** Preparaciones de células de queratinocitos o celulares de fibroblastos de acuerdo con la invención se pueden  
25 usar fácilmente después de recogida o después de cultivo de células como se describió anteriormente. Sin embargo,  
las preparaciones de células de acuerdo con la invención se pueden preparar después de cultivo de células como se  
describió anteriormente.

**[0404]** Las preparaciones de células según la invención presentan una mejor viabilidad y estabilidad (incluyendo la  
30 integridad de las propiedades de células conservadas tales como la capacidad de las proteínas de sintetizar y  
administrar factores de crecimientos) que las células preparadas en un medio sin composición de concentrado de  
plaquetas autólogo según la invención. Además, la proliferación de células obtenida de este modo se mejora: células  
crecen más rápido (aproximadamente de 2 a 5 días más rápido) y son más densas en comparación con el control de  
medios y los medios de comunicación privados de suero. La ventaja del proceso para la preparación de una  
35 composición de células de acuerdo con la invención es que el mismo medio autólogo se utiliza como vector para el  
cultivo celular, conservación de células, inyección de células, vector para bio-estimulación de células y regeneración  
de tejidos.

**Ejemplo 1: El uso terapéutico del concentrado de placas autólogo de la invención en combinación con un  
suero de trombina enriquecida autólogo**

40 **[0405]** Un suero de trombina autóloga para ser utilizado como una preparación de trombina enriquecido se prepara  
de acuerdo con la invención.

**[0406]** Lo original de este proceso es que los tubos separadores de la invención que contienen, respectivamente, la  
45 preparación de suero de trombina autóloga y la preparación de concentrado de plaquetas se pueden preparar  
simultáneamente. El tubo de vidrio para la preparación de suero de trombina autóloga (ATS) se centrifuga  
aproximadamente 8 minutos a aproximadamente 10 minutos. El tubo de plástico (COC o COP) o tubo de vidrio para  
la preparación de un concentrado de plasma o composición PRP se centrifugaron aproximadamente 8 minutos a  
aproximadamente 10 minutos. Por lo tanto, ventajosamente la ATS y la composición PRP están listas para su uso en  
50 aproximadamente el mismo tiempo.

**[0407]** Para permitir la polimerización de fibrinógeno en una malla de fibrina (que se produce durante el proceso de  
coagulación) que ocurra sólo en el momento de aplicación de la preparación rica en plaquetas sobre la herida, la  
composición de concentrado de plaqueta y suero de trombina autóloga (activador de coagulación) se aplican  
55 simultáneamente en una relación de volumen de aproximadamente 10: 1, 10: 3 a aproximadamente 10:10  
(concentrado a la proporción de activador de coagulación) a la herida, dependiendo de la aplicación. La diferencia en  
la proporción altera la rapidez de la coagulación para el efecto de pegamento.

**[0408]** La administración simultánea de ambas preparaciones se consigue por ejemplo mediante un dispositivo que  
60 comprende dos jeringuillas (por ejemplo, jeringa de 10 ml para la composición de concentrado de plaquetas y una  
jeringa de 1 ml o 3 ml para el suero de trombina), que libera las preparaciones simultáneamente de modo que se  
mezclan y polimerizan al entrar en contacto con la herida.

**Ejemplo 2: Uso cosmético del concentrado de plaquetas autólogo de la invención**

65 **[0409]** Ejemplos de uso cosmético del concentrado de plaquetas autólogo de la presente invención incluyen:

5 **[0410]** Mezclando el concentrado de plaquetas según la invención con una crema, preferiblemente una emulsión, antes de la aplicación a una herida, después de la cirugía o en piel saludable. Durante el proceso de absorción, la preparación de plaquetas se realiza en la piel por la crema o emulsión con el fin de amplificar el beneficio hidratante y para bio-estimular la regeneración o el rejuvenecimiento de la piel. Una inyección en la capa dérmica se puede realizar con la técnica de mesoterapia por inyecciones repetidas con la mano o un dispositivo sin aguja. La inyección puede hacerse subcutáneamente en la arruga para la corrección de volumen. La inyección del concentrado de plaquetas combinado en una proporción de 10: 1 o 10: 3 con el suero de trombina autóloga para el efecto de relleno y/o de corrección de volumen constante puede estar hecho en la arruga, la frente, la mandíbula, la región molar, las mejillas, el cuello barbilla y/o el pecho. Cuando sea apropiado, la inyección de concentrado de plasma combinado a un tejido de grasa recién aspirado en una relación de aproximadamente 10:10 puede hacerse por vía subcutánea para la corrección de volumen importante de la cara. Cuando sea apropiado, la inyección de concentrado de plasma combinado a un tejido graso recién aspirado en una proporción de aproximadamente 10: 3 o aproximadamente 10: 2 por puede hacerse vía subcutánea para la corrección de volumen importante del pecho o el contorneado.

15 **[0411]** El uso de un hidrogel como la preparación de Albugel (EP 1 543 846) de 100% de albúmina o de cualquier otro hidrogel que resulta de la reticulación de albúmina y otros compuestos químicos como polietilenglicol o cualquier otra ingrediente, usando un portador altamente hidrófilo basado en papel, para dejarse en contacto con la piel hasta que se absorba el plasma rico en plaquetas.

20 **[0412]** En la presente memoria se describen métodos de inyecciones de mesoterapia:

- En la dermis papilar,
- Subcutánea en la dermis reticular, o
- En un profundo nivel por encima del periostio.

25 **[0413]** Los 3 niveles de inyección también llamados «eliminación de arrugas médica» se pueden realizar con plasma solo, plasma más tejido adiposo y/o plasma más fosfato tricálcico.

### 30 **Ejemplo 3: Preparación de asociación de células musculares autólogas**

**[0414]** Ejemplo de asociación de células autólogas según la invención se puede preparar mediante el procedimiento según la invención en la que las células del músculo esquelético (células progenitoras musculares o células madre satélite) se proporcionan en el paso (d) o (e).

35 a) Células madre progenitoras de mioblastos

**[0415]** Biopsia muscular esquelética se obtiene del vasto lateral y mide 7x3 cm. El músculo se prepara el día antes de la biopsia, con la inyección intra-muscular en el lugar de la biopsia propuesta (10 por 15 cm área de la piel en cara lateral del muslo que recubre el músculo vasto lateral y justo encima de la articulación de la rodilla, a cada lado) con Decadon y bupivacaína (lidocaína de acción prolongada). El músculo es cortado y enzimáticamente digerido con combinación de colagenasa, pronasa y tripsina (Worthington). Explantes musculares son placas de Petri sembradas recubiertas con una composición de concentrado de plaquetas autólogo según la invención, y se incubaron en 95% de oxígeno y 5% de dióxido de carbono a 37° C durante 3 a 4 semanas. La expresión de desmina o CD-56 se utiliza como marcador de mioblastos para identificar mioblastos a partir de fibroblastos. La proliferación de células progenitoras de mioblastos en 3D se muestra en la Figura 3. La proliferación celular se puede mejorar por la exposición foto-luz a 633 nm de 2 J/centímetros cuadrados para 10 min durante el cultivo. El día de transplatación (por ejemplo, después de 3 a 4 semanas de incubación), las células del músculo esquelético pueden liberarse por tripsina o cualquier método como se describe aquí y se coloca en la composición de concentrado de plaquetas autólogo de acuerdo con la invención. Inyecciones en el miocardio se pueden hacer como inyección directa o múltiples inyecciones de catéter en el miocardio del ventrículo izquierdo. La preparación de células de mioblastos de acuerdo con la invención es útil para los trastornos cardíacos tales como la regeneración del corazón, el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca isquémica y no isquémica y la miocardiopatía no isquémica. La fracción de eyección puede ser mejorada por 9% para los receptores cardíacos de mioblastos esqueléticos.

55 **[0416]** La preparación de células anterior también puede ser útil para el tratamiento de la incontinencia urinaria (extractos de células de mioblastos preparados como se ha descrito anteriormente y se inyecta en el cuello de la vejiga), esofagitis por reflujo o trastorno de reflujo gastroesofágico (extractos de células de mioblastos preparados como se ha descrito anteriormente inyectados en el esfínter esofágico inferior) y la incontinencia anal (extractos de células de mioblastos preparados como se ha descrito anteriormente y inyectados en la zona de para-anal).

60 **[0417]** Alternativamente, una preparación combinada de fibroblastos y mioblastos puede llevarse a cabo (fibroblastos están presentes en la biopsia muscular y emana del perimio lo largo del lado de las células madre de miotubos y satélite). En el caso del tratamiento de trastornos cardíacos, una mezcla de preparación de células de fibroblastos y la preparación de células de mioblastos (obtenidas como se ha indicado anteriormente) se inserta en el miocardio en una proporción de fibroblastos/mioblastos de aproximadamente 30:70.

[0418] Para el tratamiento de la incontinencia cuello de vejiga, un cultivo separado de los fibroblastos se realiza al mismo tiempo que los mioblastos como se ha descrito anteriormente y se inyecta la preparación de células de fibroblastos para-uretral y preparación de células de mioblastos se inyecta en el rabdoesfinter, bajo control de ultrasonidos.

5

b) Células madre satélite

[0419] Los mioblastos y células madre de satélite se cultivan ex vivo en presencia de la composición de concentrado de plaquetas autólogo según la invención. El cebado de proliferación celular se observó después de 7 días de cultivo primario.

10

[0420] Las células se recogieron a continuación después de una incubación de alrededor de 3-4 semanas y se colocaron en medio de cultivo tisular (DMEM más 5-20% vol. de composición de concentrado de plaquetas autólogas según la invención) que contiene un parche de amnios de-epitheliado humano midiendo 4x4 cm y la composición de concentrado de plaquetas autólogas de acuerdo con la invención. Alternativamente, un parche de polímero de fibrina activada autóloga puede ser utilizado. El polímero de fibrina activada autóloga se prepara centrifugando el plasma con gluconato de calcio en una proporción de aproximadamente 10: 3 o aproximadamente 10:10. La preparación se somete entonces a irradiación UV durante 10 min. Durante la incubación (típicamente aproximadamente 2 a aproximadamente 3 semanas), las células repartidas en el constructo amnios y forman una monocapa. Viabilidad y progreso de monocapa se evalúa mediante biopsia dos veces por semana de borde de parche y la evaluación histológica para espesor de monocapa.

15

20

[0421] El día del trasplante (por ejemplo, después de aproximadamente 3 a 4 semanas de incubación), la superficie ventricular se propaga con la composición de concentrado de plaquetas autólogas de acuerdo con la invención y luego el parche obtenido anteriormente se coloca con las células hacia abajo sobre una superficie lateral en bruto del ventrículo isquémico con el fin de permitir que las células madre en el parche llenen el segmento isquémico después de la inyección ventricular. La retención celular se mantiene por amnios que es inerte y no induce ninguna reacción inmunológica.

25

[0422] La preparación de células madre satélite de acuerdo con la invención es útil para la regeneración del corazón y tratamiento de la insuficiencia cardíaca como preparación para la ingeniería de tejidos para mioplastia cardio.

30

#### **Ejemplo 4: Preparación de asociación celular de fibroblastos autólogos**

[0423] Ejemplo de asociación autólogo de células de fibroblasto de acuerdo con la invención se puede preparar mediante el procedimiento según la invención en la que las células de fibroblastos dérmicos se proporcionan en el paso (d) o (e).

35

[0424] Fibroblastos dérmicos están aislados y se expandieron de acuerdo con el siguiente procedimiento: Un mes antes de la biopsia, el área de piel de primer donante (detrás de una oreja de pliegue axilar anterior, por ejemplo, zona no solarmente envejecida) se trata con crema de vitamina A para activar los fibroblastos dérmicos. Una biopsia de piel de 10x6 mm de espesor completo se lleva a cabo y se disecciona bajo el microscopio para eliminar todo el epitelio. La biopsia epitelizada (dermis) se corta entonces en bloques de 3x3 mm como explantes. La dermis papilar se coloca a continuación hacia arriba y se cultivaron utilizando la técnica de aire de elevación (Molnar et al, 1996, anterior) y la interfaz de aire (Metier et al, 2002, anterior) con un medio de explante expuesto al aire. Los explantes se cultivan en placa (por ejemplo, 6 explantes por pocillo) en DMEM y se cultivaron a 37° C en 95% de oxígeno y 5% de CO<sub>2</sub> durante aproximadamente 3-5 hasta aproximadamente 9 días en placas de Petri o matraz de cultivo. El medio se cambia cada 3 días. La expansión de fibroblastos en modo 2D como monocapas planas, al observarse crecimiento estático durante la incubación. A días 7 a 9 después del inicio de la incubación, un cambio en la proliferación y el patrón de fenotipo a 3D se obtiene añadiendo composición de concentrado de plaquetas autólogas diluida al 5-20% de acuerdo con la invención al medio de cultivo: Las células se ceban con la composición de concentrado de plaquetas autólogas (0,2 ml por pocillo) sólo para cubrir la base. Las células crecen a continuación, como una matriz de gel de fibrina 3D. Después, las células se diferencian para formar andamio biológico o red en gel de fibrina. El número de células se mide por recuento diario bajo una rejilla y para evaluar la apoptosis: utilizar microscopio invertido (Olympus®).

40

45

50

55

[0425] Después de 3 a 6 semanas de incubación, las células se recogen a partir del gel de fibrina. La viabilidad celular se ensayó con el método de azul de tripano clásico y con la evaluación bacteriológica, incluyendo la contaminación de virus. El extracto celular de fibroblastos expandido obtenido anteriormente se coloca en una jeringuilla en presencia de la composición de concentrado de plaquetas autólogas según la invención y la preparación se inyecta en las arrugas de la cara, más específicamente en las arrugas. Las inyecciones deben ser realizadas sobre toda la cara para cubrir la frente, la mandíbula, la región molar, las mejillas, la barbilla y cuello. La expansión de células puede aumentarse por foto exposición a la luz de cultivo celular a 633 nm. La preparación de células de fibroblastos de acuerdo con la invención es útil para el rejuvenecimiento facial, mejora de las arrugas faciales y las arrugas, el tratamiento de las pieles dañadas por radiaciones (radiodermatitis o piel dañada por el sol), pieles envejecidas o pieles quemadas y/o en la mejora de arrugas faciales, arrugas, acné (especialmente después

60

65

de tratamiento de dermoabrasión), quemaduras, rubéola o cicatrices de viruela, vitiligo, lipoatrofia o lipodistrofia, tales como lipodistrofia relacionada con el SIDA; sarcoma de Kaposi, esqueloides de la piel o fibromatosis palmar de Dupuytren y/o en tratamientos de rejuvenecimiento de la piel.

#### 5 **Ejemplo 5: Preparación de tejido adiposo autólogo y asociación de células de grasa**

10 **[0426]** El tejido adiposo es aspirado preferiblemente en la zona del abdomen inferior, se purificó por lavado de PBS, centrifugado, con sedimentación con el fin de aislar el tejido graso de los triglicéridos y los residuos. En el ínterin, se recoge sangre y se centrifuga para la preparación de un concentrado de plasma o composición PRP de acuerdo con la interinversión. La combinación del tejido graso y la composición PRP se realiza en la jeringa usada para la aspiración de grasa una vez que los triglicéridos han disminuido, mediante el uso de un dispositivo de transferencia estéril para la aspiración de composición PRP. La relación de concentrado de plasma y el tejido de grasa es 10:10 para la cara y 10: 3 para el pecho y el contorno.

15 **[0427]** Preferiblemente, la inyección se realiza extemporáneamente, en un periodo mínimo de tiempo de preparación de ambas células se concentraron, y por un tiempo mínimo de manipulación de células ex-vivo.

20 **[0428]** Ejemplo de asociación de células autólogas según la invención se puede preparar mediante el procedimiento según la invención en la que, por ejemplo, células madre de tejido adiposo, las células madre mesenquimales (MSC) se proporcionan en el paso (d) o (e). MSCs pueden aislarse por colagenasa (preadipocitos, células pre-endoteliales) y poner en suspensión con PRP y la preparación inyectada incluyendo cirugía subcutánea, intra-articular, o ortopédica. La preparación se puede combinar con una matriz acelular que deben aplicarse directamente sobre una herida, o se pueden cultivar en el laboratorio antes de la aplicación. Células madre adiposas adultas se aislaron por el método de cultivo estándar en 5-20% vol. una composición de concentrado de plaquetas autólogas según la invención. La preparación se inyecta con un aplicador en pacientes que sufren de deficiencias de tejido, tales como deficiencias postraumáticas o deficiencias relacionadas con la edad para los pacientes siendo de aproximadamente 40 años de edad. La preparación de células de grasa de acuerdo con la invención es útil para el tratamiento de la lipoatrofia tal como en pacientes de VIH/SIDA y otra hemiatrofia congénita de la cara.

#### 30 **Ejemplo 6: Preparación de asociación de células de condrocitos autólogos**

**[0429]** Ejemplo de asociación celular autóloga de acuerdo con la invención se puede preparar utilizando el proceso de acuerdo con la invención en la que las células de condrocitos se proporcionan en el paso (d) o (e).

35 **[0430]** El cartílago se aísla de la rodilla del donante (tamaño de biopsia 10 x 5 mm) y cortado. Las células de condrocitos de cartílago se cultivan durante 4-6 semanas en medio enriquecido con una composición de concentrado de plaquetas autólogas diluidas al 5-20% de acuerdo con la invención. Las células del cartílago entonces se liberan por digestión enzimática (colagenasa y pronasa). La preparación de células se incorpora a continuación quirúrgicamente en el paciente con defectos condrales profundos y daños.

40 **[0431]** La preparación de células de condrocitos de acuerdo con la invención es útil para el tratamiento del daño del cartílago y la erosión profunda o artroscopia.

45 **[0432]** Otro ejemplo de la utilización de una preparación de células de condrocitos de acuerdo con la invención es el uso en rinoplastia sin cirugía por un solo procedimiento de inyección: Un paciente que sufre de atrofia congénita de nariz de cartílago.

50 **[0433]** El día antes de la inyección, una biopsia del cartílago 0,4 \* 0,4 cm se realiza y se coloca en un recipiente estéril lleno de DMEM y antibiótico. La biopsia se trata con digestión enzimática incluyendo tripsina y colagenasa. Los condrocitos liberados se resuspendieron después en la composición de concentrado de plaquetas autólogas de acuerdo con la invención. El paciente recibe primero una anestesia local, y la desinfección de nariz. Entonces, la preparación de los condrocitos anteriormente se inyecta en la superficie del cartílago y la membrana o periostio del sitio que requiere de aumento de volumen o de ascensor. En una segunda fase, composición de concentrado de plaquetas autólogas según la invención se inyecta en la parte superficial de la piel de la nariz, a fin de bioestimular regeneración y rejuvenecimiento de la piel. Después de una hora, se logra la inyección y el paciente puede volver a casa. Se observa una recuperación excepcional de células viables: la cantidad de células de condrocitos y células plasmáticas recuperadas e inyectadas era de aproximadamente 10<sup>9</sup> células. La preparación de células de condrocitos de acuerdo con la invención es por lo tanto útil para el tratamiento de defectos de cartílago nasal, sin procedimiento quirúrgico, pero sólo por inyección.

#### 60 **Ejemplo 7: Preparación de asociación de células madre de cordón umbilical autólogo**

65 **[0434]** Ejemplo de asociación de células autólogas según la invención se puede preparar mediante el procedimiento según la invención en la que las células madre del cordón umbilical se proporcionan en el paso (d) o (e). Células madre de cordón umbilical se aíslan y después se crio-conservan y se utilizan para tratar trastornos de la sangre.

[0435] La preparación de células madre de cordón umbilical de acuerdo con la invención es útil para el tratamiento de enfermedades lógicas de hemato (como talasemia).

5 [0436] El proceso de inyección consiste en la resuspensión de las células madre en el concentrado de plasma seguido por reinyección.

#### Ejemplo 8: Preparación de asociación de células de tendón autólogas

10 [0437] Ejemplo de asociación de células autólogas según la invención se puede preparar mediante el procedimiento según la invención en la que las células de los tendones se prevén en el paso (d) o (e).

15 [0438] Las células de fibroblastos del tendón se aíslan de acuerdo con procedimientos estándar de procedimiento en 5-20% vol. de la composición de concentrado de plaquetas autólogas según la invención. Las células de fibroblastos de tendón se cultivan durante aproximadamente 1 a aproximadamente 3 semanas en medio de cultivo enriquecido con una composición de concentrado de plaquetas autólogas de acuerdo con la invención. Antes de la inyección, las células se resuspendieron en concentrado de plasma recién procesado. La preparación celular se inyecta entonces en el paciente en el sitio de la lesión (por ejemplo, tendón desgarrado, área artrítica). La inyección puede ser guiada por ecografía, para la localización del sitio dañado, y mejor injerto de la solución implantada.

20 [0439] La inyección de la preparación celular de fibroblastos de tendón puede también llevarse a cabo junto al manguito de los rotadores: primero el desgarro de manguito de rotadores se repara artroscópicamente, a continuación, la preparación de células de fibroblastos del tendón se inyecta a través de un catéter largo en el área suturada. Esto demuestra la curación del tendón de fibroblastos en el borde del manguito de los rotadores, evita hematoma en el espacio confinado bajo el acromion, y evita el hombro congelado por la aceleración de la cicatrización y mejora la rehabilitación y movimiento de la articulación. La preparación de células de tendón de acuerdo con la invención es útil para el tratamiento de tendones desgarrados, artritis en las articulaciones causadas por traumas o por el envejecimiento, manguito de los rotadores en el hombro.

#### 30 Ejemplo 9: Preparación de asociación de ligamento autólogo y células gingivales

[0440] Ejemplo de asociación de células autólogas según la invención se puede preparar mediante el procedimiento según la invención en la membrana de periostio y células gingivales se proporcionan en el paso (d) o (e).

35 [0441] Bajo anestesia general y local, periostio (aproximadamente 10x10 mm) se cosecha asépticamente desde el lado bucal del cuerpo mandibular en cuatro perros beagle hembra sanos. El periostio cosechado se corta en piezas de 3x3 mm. Los tejidos se colocan directamente en una placa de 6 pocillos y se cultivaron (por aproximadamente 3 a aproximadamente semanas [beta]) en una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire a 37° C en un medio de cultivo enriquecido con una composición de concentrado de plaquetas autólogas al 5-20 % según la invención. La membrana periostio y células gingivales se aíslan mediante digestión enzimática y se cultivaron mediante una técnica estática.

40 [0442] Típicamente, 6 semanas de cultivo es suficiente para obtener espesor de membrana perióstica apropiada para injerto.

45 [0443] La composición de concentrado de plaquetas autólogas y la preparación de células se inyectan después de resuspensión en el paciente en el sitio de la lesión.

#### Ejemplo 10: Preparación de asociación de células corneales autólogas

50 [0444] Preparación en una placa de Petri con membrana de recubrimiento termosensible, para la recogida de las células sin solución enzimática como colagenasa o tripsina.

[0445] Ejemplo de asociación de células autólogas según la invención se puede preparar mediante el procedimiento según la invención en la que células de la córnea se proporcionan en el paso (d) o (e).

55 [0446] Una biopsia se toma del epicántico en el borde de la córnea y las células madre del limbo de la córnea se ampliaron para el trasplante autólogo en la misma persona después de 4 semanas de cultivo en placas Petri o matraces recubiertas con una composición de concentrado de plaquetas autólogas de acuerdo con la invención.

60 [0447] Las células madre cultivadas corneales (de origen limbal) pueden diseñarse ex vivo sobre la superficie de amnios humano de-epitelializado en una monocapa, después de sembrar el constructo con una suspensión de queratinocitos corneales cultivados y viables según la invención. Aproximadamente 500.000 células se utilizan para la siembra y se permite que las células cubren la superficie de la construcción con las células después de una incubación adicional de aproximadamente otras 3 semanas. La ingeniería con células se produce después de aproximadamente tres semanas de cultivo celular primario, y re-siembra puede ser necesaria. El constructo de célula biocompuesto biológico resultante que consiste en colágeno, fibras de amnios y queratinocitos corneales, que

65

consiste en la membrana y la monocapa de células. La preparación de células de la córnea según la invención se puede transmitir sobre una lente de contacto disoluble que se aplica a la córnea dañada. La lente de contacto desaparece y las células cierran el defecto corneal. La preparación de células de la córnea de acuerdo con la invención puede administrarse tópicamente en gotas para los ojos en los pacientes que sufren de síntomas de ojo seco. Alternativamente, el amnios de arriba se puede utilizar sobre la córnea cicatrizada o la construcción y la preparación de células de acuerdo con la invención puede estar unida a la parte interior de una lente de contacto biológica o artificial y luego se aplica a la córnea y se cubre con una almohadilla de ojo.

[0448] Alternativamente, las células de la córnea se resuspenden en concentrado de plasma recién procesado antes de la aplicación.

[0449] La preparación de células de la córnea de acuerdo con la invención es útil para aliviar el dolor de ojo seco, para el tratamiento del Síndrome de Steven Johnson y ceguera corneal debido a quemaduras ácidas y alcalinas corrosivas en la industria, úlceras de la córnea tales como ulceración corneal neurotrófica recalcitrante, herpética e inmunológicamente inducida.

#### **Ejemplo 11: Preparación de asociación de células de médula ósea autóloga**

[0450] El ejemplo de asociación de células autólogas según la invención se puede preparar mediante el procedimiento según la invención en la que células de la médula ósea se proporcionan en el paso (d) o (e).

[0451] La médula ósea de cadera se aspira, se recoge y se centrifuga en un dispositivo listo para el uso para la preparación de un concentrado de médula ósea con el fin de separar las células de sangre rojas.

[0452] La preparación de células de médula ósea se usa solo o mezcla entonces al concentrado de plaquetas de acuerdo con la invención o se centrifuga de nuevo con gluconato de calcio para formar una membrana suturable y se aplica o se inyecta con un aplicador para el sitio de la lesión de los pacientes. La preparación de células de médula ósea de acuerdo con la invención es útil para el tratamiento de defecto óseo o defecto del cartílago. La preparación de células de médula ósea puede ser utilizada solo o en combinación con un concentrado de plasma de acuerdo con la invención. Una membrana de cartílago puede ser utilizada también con gluconato de calcio.

#### **Ejemplo 12: Preparación de asociación de células autólogas de Schwann**

[0453] Ejemplo de asociación de células autólogas según la invención se puede preparar mediante el procedimiento según la invención en la que las células de Schwann se proporcionan en el paso (d) o (e).

[0454] Bajo anestesia local, se realiza una biopsia en N. safena de N. SURALIS en el miembro inferior. La biopsia del nervio se corta en pequeños bloques y se inducen cultivos primarios en placas de Petri enriquecidas en composición de concentrado de plaquetas autólogas según la invención.

[0455] Las monocapas se expanden en 3D y las células se cosecharon, finalmente, por digestión con tripsina y se resuspendieron en un concentrado de plaquetas recién cosechado en una jeringa para la infiltración local de la médula espinal expuesta quirúrgicamente y dañada. Las células cultivadas se han demostrado para contener la mielina. La preparación de células de Schwann de acuerdo con la invención es útil para el tratamiento de daño del nervio periférico, la sutura del nervio y lesión de la médula espinal.

#### **Ejemplo 13: Preparación de células de islote humano autólogo**

[0456] El ejemplo de asociación de células autólogas según la invención se puede preparar mediante el procedimiento según la invención en la que las células de islotes del páncreas se proporcionan en el paso (d) o (e).

[0457] Los islotes del páncreas se recogen por biopsia abierta y se separan por digestión enzimática convencional y separación Ficol o Hypaque (Page et al, 2007, Diba. Vas. Dis. Res., 7-12) después se resuspendieron en un medio enriquecido con una composición de concentrado de plaquetas autólogas de acuerdo con la invención.

[0458] La preparación de células de islotes del páncreas entonces se inyecta a través de la vena portal en el hígado.

[0459] La preparación de células de islotes del páncreas de acuerdo con la invención es útil para el tratamiento de la diabetes tipo I o diabetes dependiente de la insulina y para la reversión de la hiperglucemia de la diabetes mellitus.

#### **Ejemplo 14: Preparación de células de osteoblastos humanos autólogos**

[0460] El ejemplo de asociación de células autólogas según la invención se puede preparar mediante el procedimiento según la invención en la que las células de osteoblastos se proporcionan en el paso (d) o (e).

[0461] Biopsia de médula de punzón cortical se deriva de la cresta ilíaca o sitio equivalente (maxilar) bajo anestesia

5 local. La biopsia de hueso se coloca asépticamente en medio DMEM a 4° C, o medio de transporte equivalente por expertos en el arte de hueso y cultivo de osteoblastos ex vivo. La diopsia ósea entonces se corta en cubos y se digirió y se diluyó en colagenasa de tipo 1 al 10% (Sigma o Boehringer) a 37° C durante 15 min bajo campana de flujo laminar. Alternativamente, la digestión con tripsina (Worthington) se puede utilizar alternativamente. La digestión enzimática se termina con tres lavados con una composición de concentrado de plaquetas autólogas de acuerdo con la invención, al 10% en DMEM a 4° C. La preparación se centrifuga, se sedimenta y se resuspende. Los fragmentos de hueso se sembraron en placas de Petri o matraces como explantes con tecnología de elevación de aire en una composición de concentrado de plaquetas autólogas según la invención. La preparación se cultivó a 37° C con antibióticos, getimicina y anfotericina-B bajo un flujo de gas de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se cambió tres veces por semana, subiendo cada vez el medio DMEM con 10-20% vol. de una composición de concentrado de plaquetas autólogas según la invención. La viabilidad celular y morfología se evalúan tres veces a la semana para evaluar el rastreo celular, la apoptosis y progresión de monocapa 3D. La formación de microfilamentos y diferenciación se evalúa mediante microscopía invertida (Olympus®). La ausencia de contaminación bacteriana y viral está marcada. Los osteoblastos pueden ser diseñados en una membrana de polímero de fibrina autóloga recién cosechada preparada por centrifugación de concentrado de plaquetas con gluconato de calcio en una proporción de aproximadamente 10: 3 o aproximadamente 10:10. El polímero de fibrina es la sutura. Los osteoblastos pueden ser diseñados en amnios humano para crear andamio biocompuesto celular y portador/constructo de monocapa celular después de la siembra de membrana con 100.000 células como se obtuvo anteriormente y permitiendo la expansión de la membrana de monocapa más de 3-4 semanas permitiendo la construcción única de constructo de osteoblastos-amnios-membrana para utilizar y transferir para cubrir un defecto óseo o zona injertada siguiente a la no unión de fractura en cualquier sitio. Osteoblastos se pueden mezclar alternativamente a un concentrado de médula ósea fresca y concentrado de plaquetas antes de la inyección/aplicación, y se combina además con suero de trombina autóloga cuando haya una necesidad de un gel suave.

25 **[0462]** La preparación de células de osteoblastos de acuerdo con la invención es útil para el tratamiento de defectos óseos, injertos óseos o trastornos óseos.

**Reivindicaciones**

- 5
1. Un método para la preparación de una composición de curador de herida o composición de curador de tejido, comprendiendo las etapas de:
- a) Recogida de sangre total en un tubo que comprende ácido hialurónico y un gel tixotrópico,
  - b) Centrifugar dicho tubo, y
  - c) Recogida del sobrenadante que comprende dicho ácido hialurónico y plasma rico en plaquetas.
- 10
2. El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende además la siguiente etapa:
- d) mezclar dicho ácido hialurónico y dicho plasma rico en plaquetas.
- 15
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho tubo en la etapa a) comprende además un anticoagulante.
4. El método de la reivindicación 3, donde dicho anticoagulante es citrato sódico.
- 20
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho paso de centrifugación se realiza en un período de tiempo suficiente hasta la migración de ácido hialurónico por encima de dicho plasma rico en plaquetas.
- 25
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha etapa de centrifugación se realiza a una fuerza entre aproximadamente 1000 g y hasta aproximadamente 2000 g durante un tiempo seleccionado de aproximadamente 3 min hasta aproximadamente 7 min.
- 30
7. El método de la reivindicación 6, en el que dicha etapa de centrifugación se realiza a una fuerza de aproximadamente 1500 g durante un tiempo seleccionado de aproximadamente 3 min hasta aproximadamente 7 min.
- 35
8. El método de la reivindicación 7, en el que dicha etapa de centrifugación se realiza a una fuerza de aproximadamente 1500 g durante aproximadamente 5 minutos.
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha etapa de centrifugación se realiza en un período de tiempo suficiente hasta la migración de las células rojas de la sangre debajo de dicho gel tixotrópico.
- 40
10. Un tubo que comprende ácido hialurónico y un gel tixotrópico.
11. El tubo según la reivindicación 10, en el que dicho tubo comprende además un anticoagulante.
- 45
12. El tubo según la reivindicación 11, en el que dicho gel tixotrópico está situado entre dicho ácido hialurónico y dicho anticoagulante.
- 50
13. Kit o dispositivo médico que comprende un tubo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12.
- 55
- 60
- 65

Figura 1A

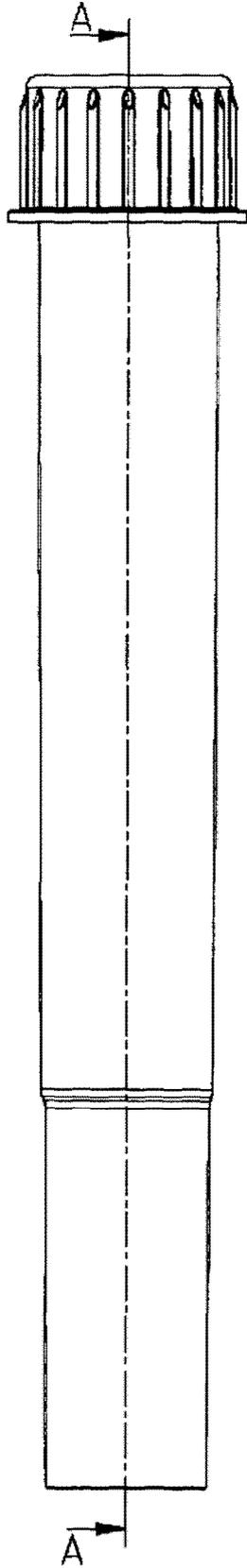


Figura 1B

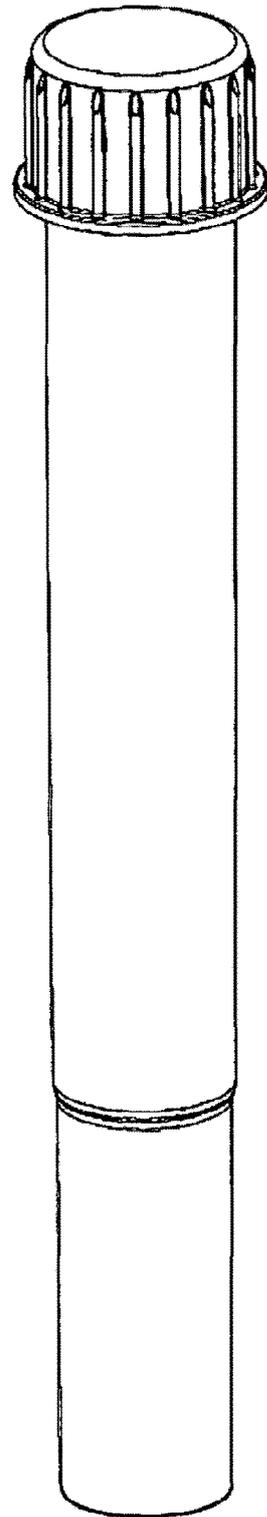


Figura 2

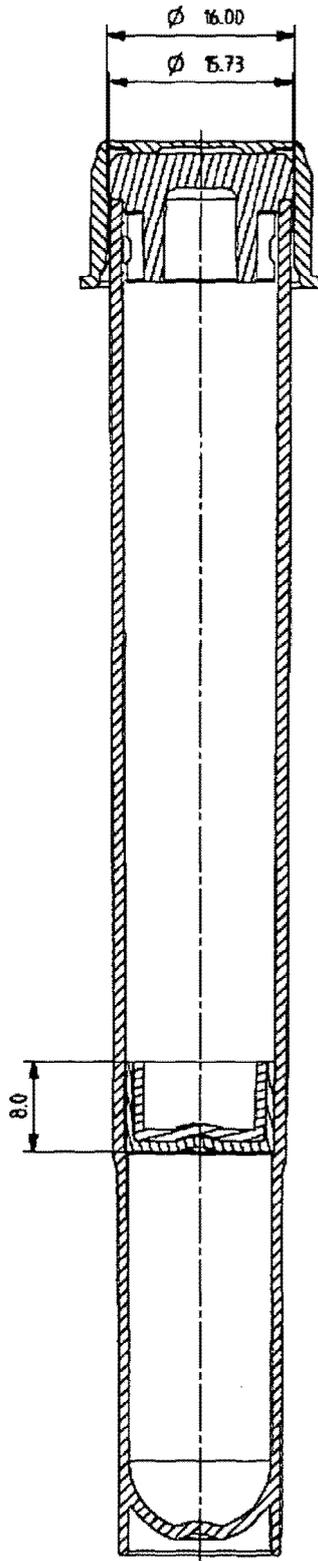


Figura 3

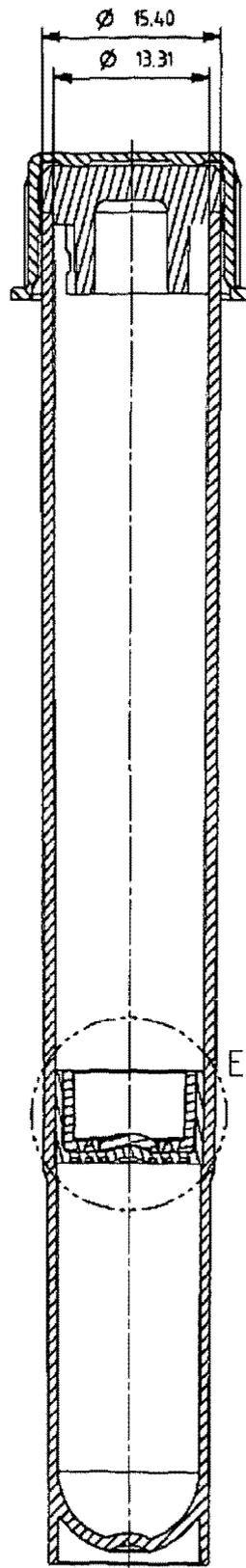


Figura 4

E

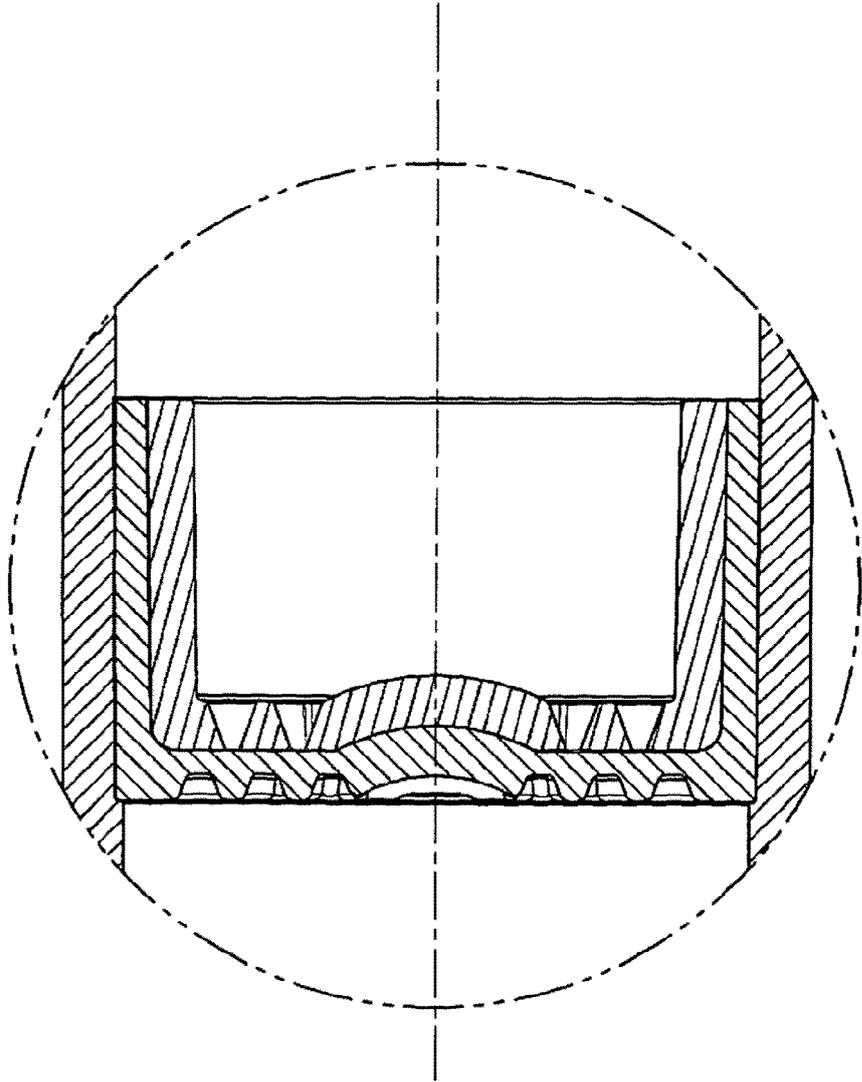


Figura 5A

Figura 5B

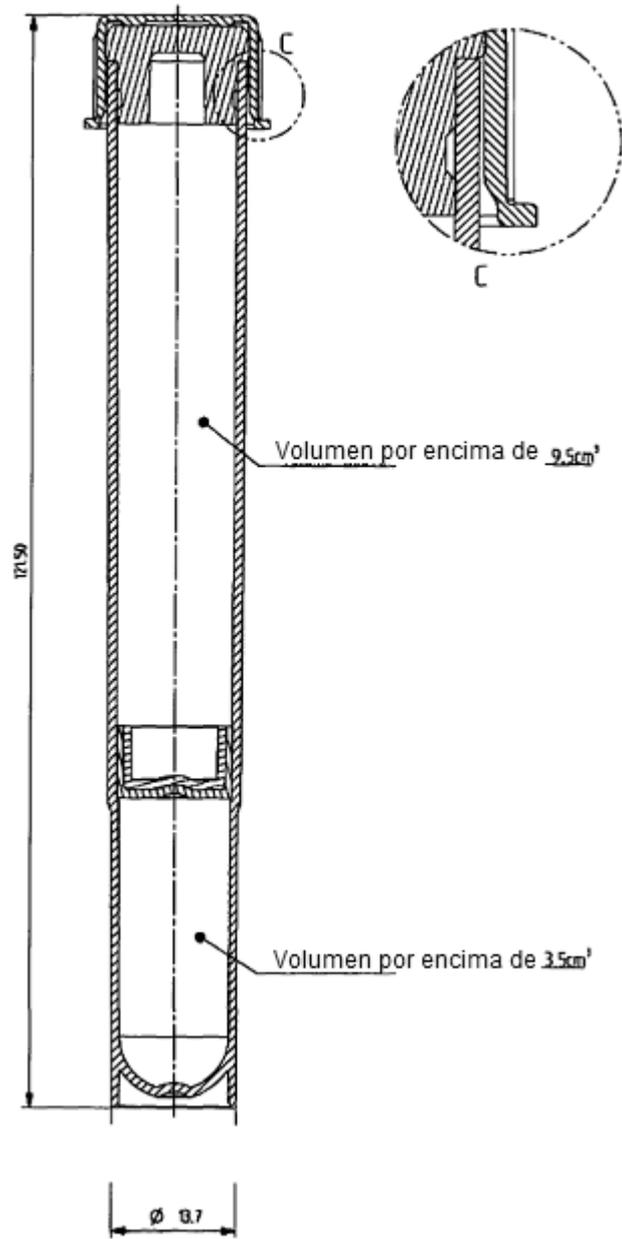


Figura 6

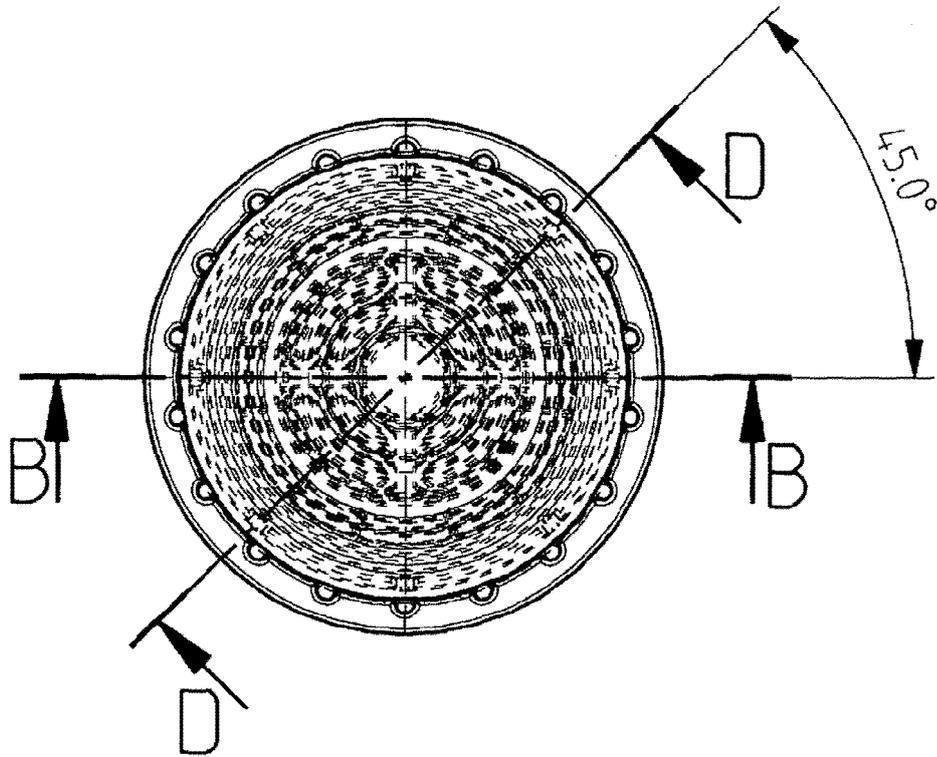


Figura 7A

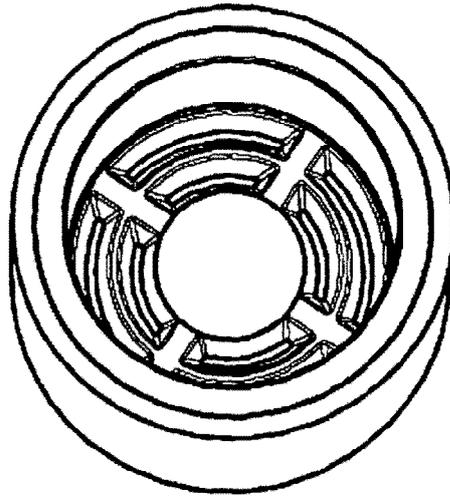


Figura 7B

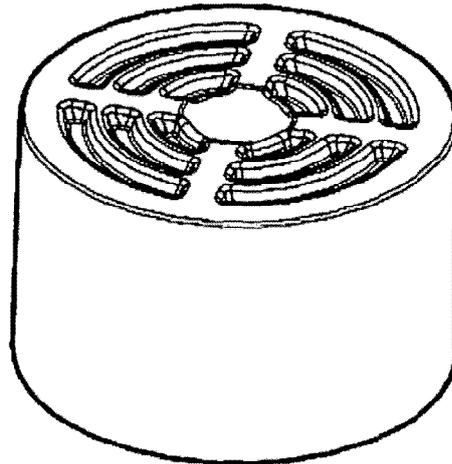


Figura 8

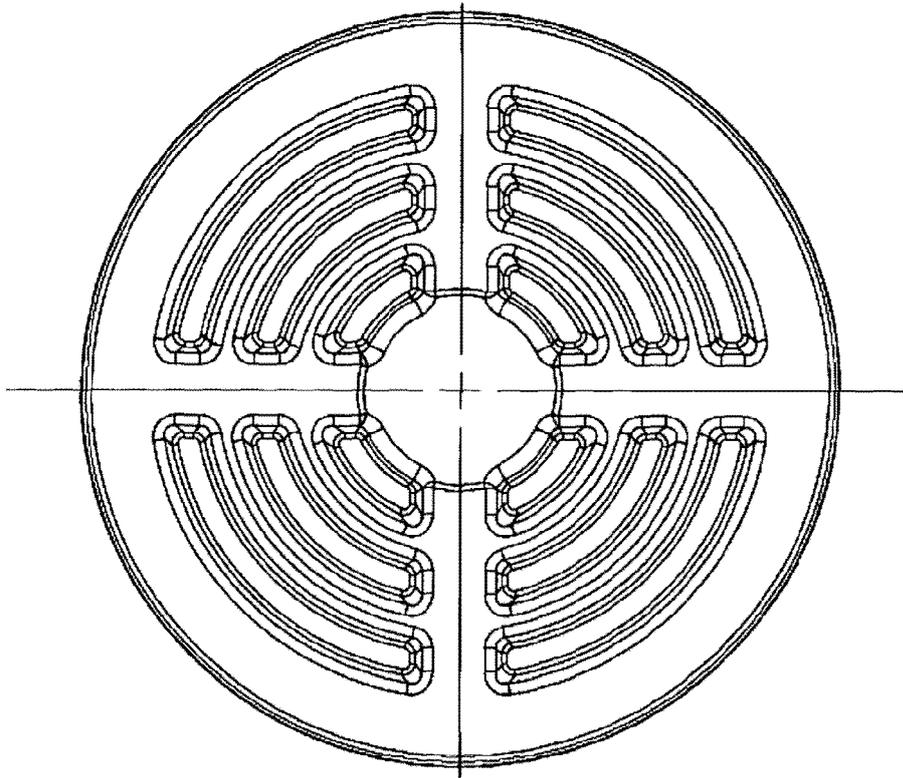


Figura 9

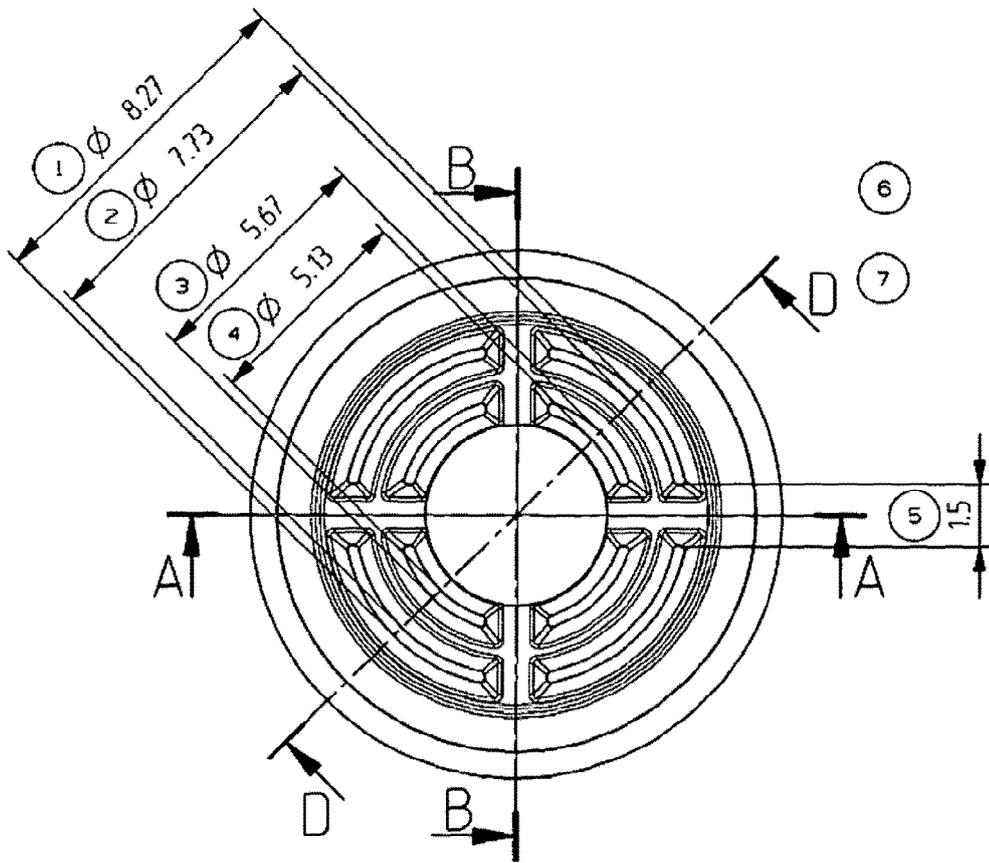
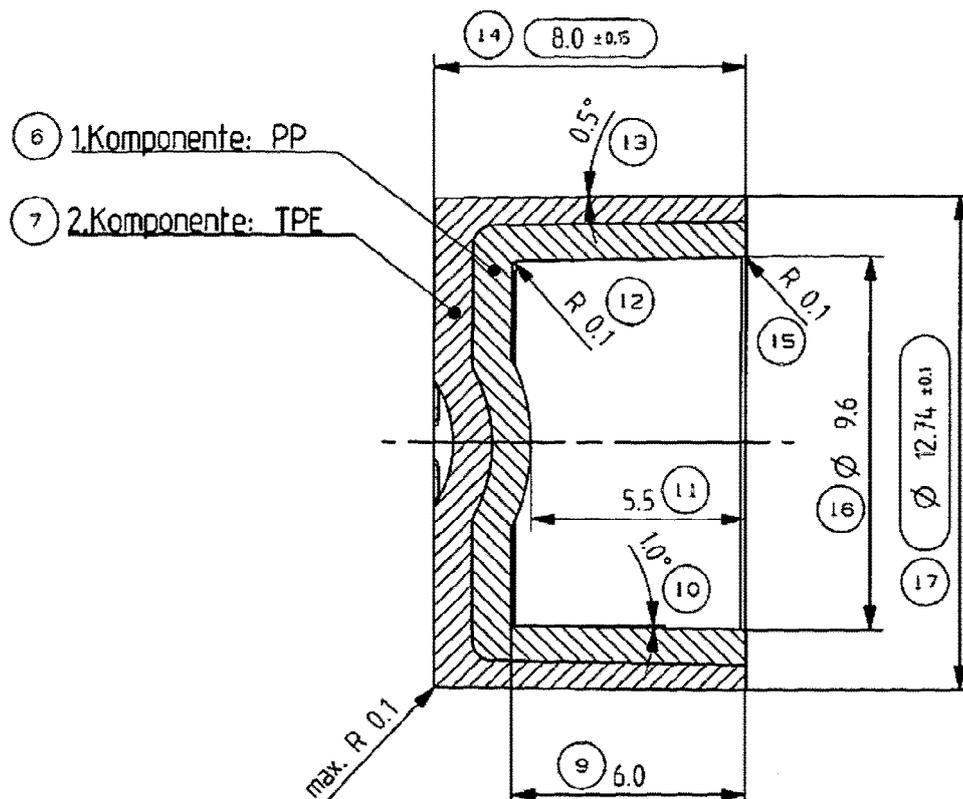


Figura 10



Komponente = Componente

PP = Polipropileno

TPE = Elastómero termoplástico

Figura 11

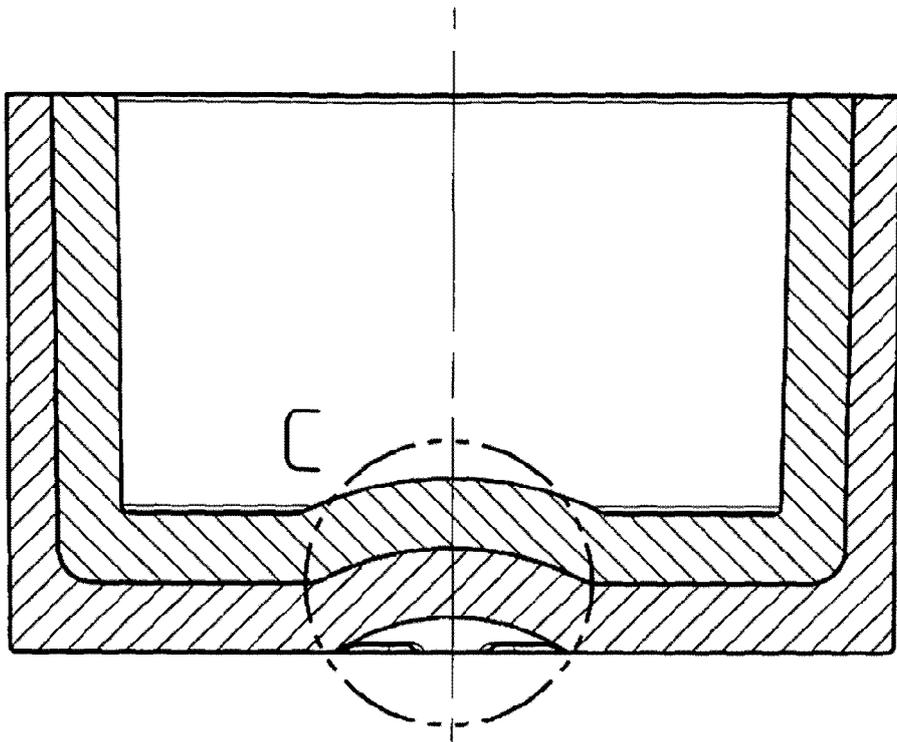
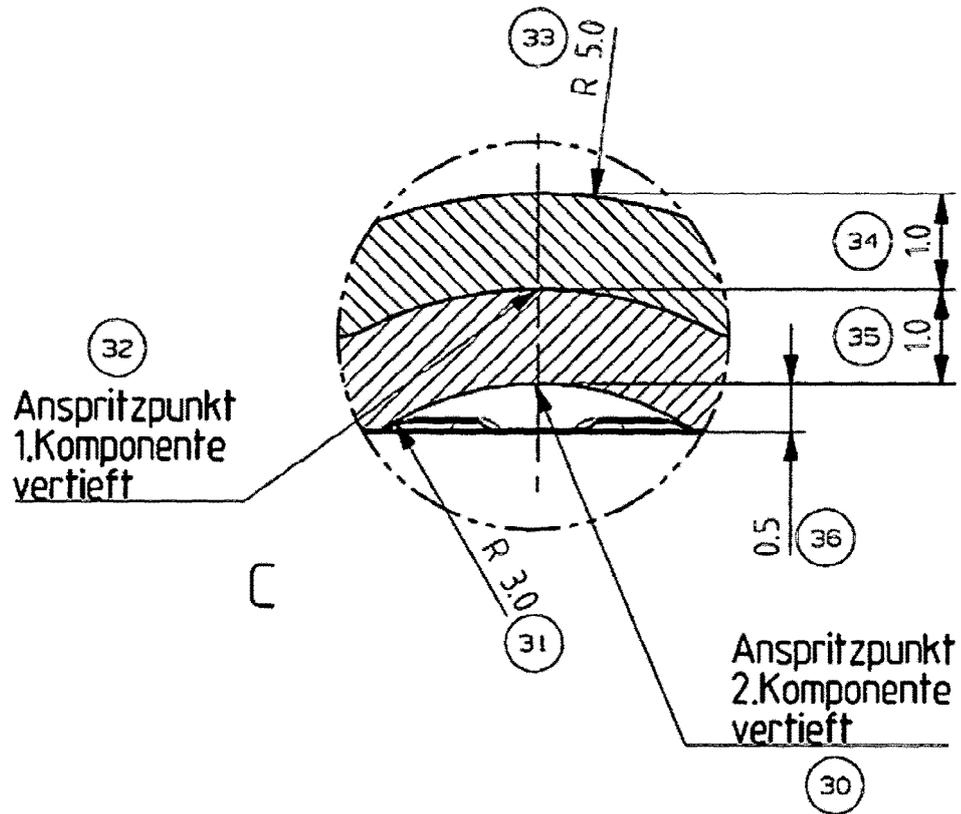


Figura 12



Anspritzpunkt = punto de inyección

Komponente vertieft = componente consolidado

Figura 13

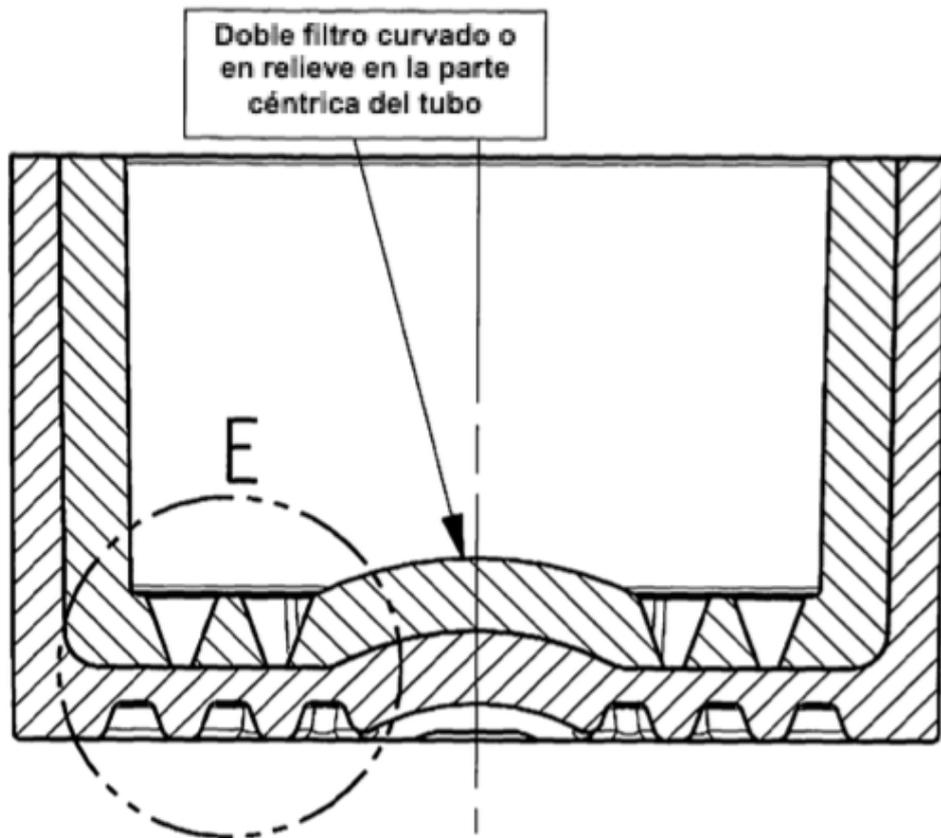
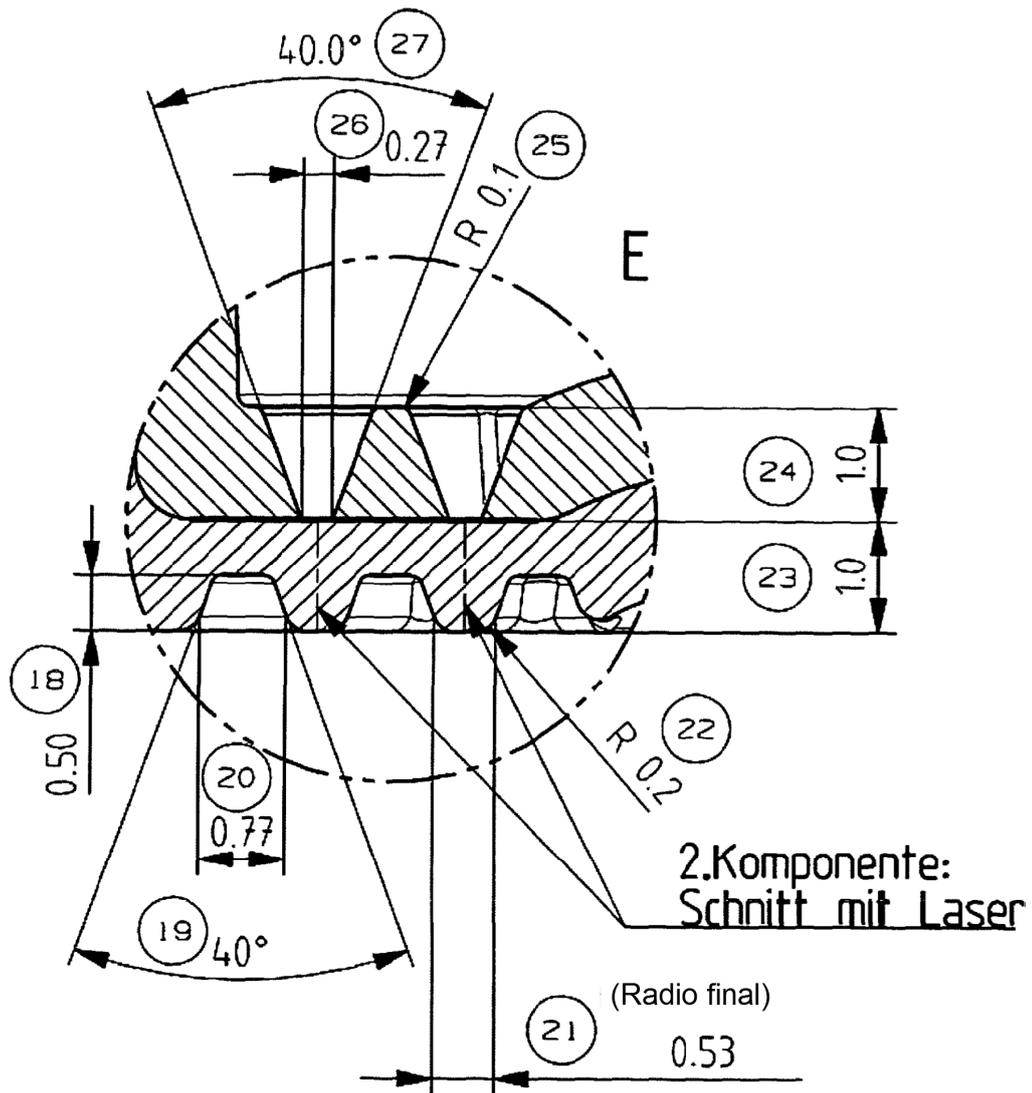


Figura 14



Komponente = Componente

Schnitt mit laser = Modelado con láser

Figura 15

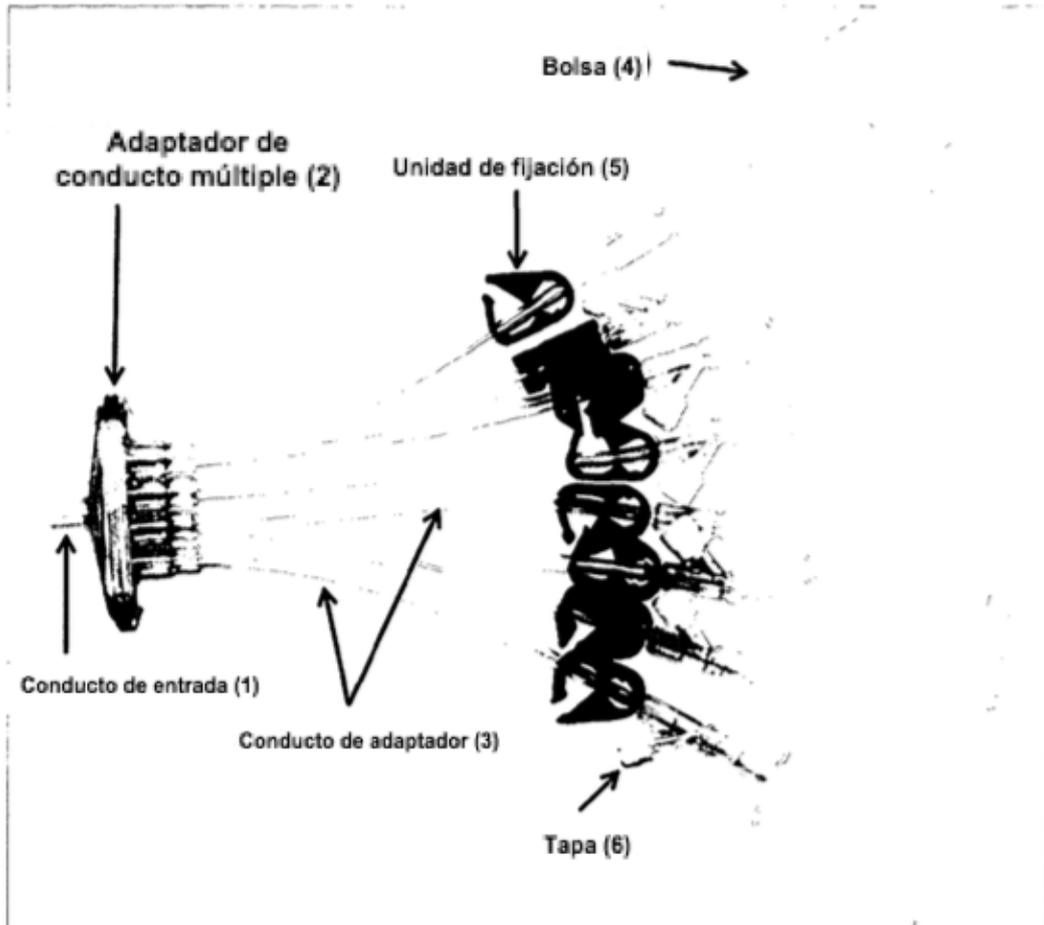


Figura 16

