

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 747**

51 Int. Cl.:

A61M 1/02 (2006.01)

A61M 1/36 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2015** **E 15152110 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018** **EP 3047864**

54 Título: **Composiciones y métodos para la separación de plasma rico en plaquetas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.06.2018

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (50.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland CA 94607-5200, US y
UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA (50.0%)

72 Inventor/es:

EMERSON, JANE F.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 671 747 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para la separación de plasma rico en plaquetas

Campo de la invención

El campo de la invención es las tecnologías de separación.

5 Antecedentes

La descripción de antecedentes incluye información que puede ser útil para comprender la presente invención. No es una admisión de que nada de la información proporcionada en presente memoria sea técnica anterior o relevante para la invención reivindicada por el presente documento, ni de que ninguna publicación citada específica o implícitamente sea técnica anterior.

- 10 La terapia con plasma rico en plaquetas (PRP) ha sido usada para la reparación y la regeneración óseas, en aplicaciones de cirugía plástica, cirugía oral y tratamiento ocular, y está recibiendo atención y reconocimiento por su eficacia en el tratamiento de lesiones deportivas, lesiones nerviosas, tendinitis y osteoartritis. Puede entenderse que el PRP es una fuente concentrada de plaquetas que pueden ser administradas al sitio de una lesión y activadas para permitir una liberación rápida del factor de crecimiento y la estimulación de la recuperación del hueso o el tejido
- 15 blando. Debería evitarse una activación involuntaria prematura de las plaquetas, ya que muchos factores de crecimiento tienen una vida media corta y puede lograrse mayor eficacia si son activadas en el momento del uso o inmediatamente antes (por ejemplo, inyección).

- Se ha emprendido algún esfuerzo por preparar o separar PRP usando métodos de centrifugación. Ejemplos incluyen las patentes estadounidenses n^{os} 6.596.180, 6.610.002, 6.827.863, 6.899.813, las publicaciones de solicitud de
- 20 patente estadounidense n^{os} 2014/0113795 y 2009/0294383, y la publicación de solicitud de patente internacional n^o WO 02/081007. Desgraciadamente, los métodos conocidos adolecen de al menos una de varias desventajas, incluyendo una activación plaquetaria elevada, incapacidad de extracción de la totalidad o sustancialmente la totalidad del PRP sin correr el riesgo de extraer una parte alícuota de una capa o gel leucocitaria con el PRP, o incapacidad de obtener la homogeneidad del PRP y el requisito de un procesamiento estéril en tubos abiertos.

- 25 “Platelet Separation from Whole Blood in an Aqueous Two-Phase System with Water-Soluble Polymers” de Sumida *et al.*, publicado en *J Pharmacol Sci* 101, 91-97 (2006), reconoció un problema de activación plaquetaria elevada usando métodos de centrifugación convencionales, y desarrolló un método para separar plaquetas sin centrifugación. Más específicamente, se mezclaron diversos polímeros con sangre total que contenía citrato-dextrosa y se observaron la separación de las células sanguíneas y la activación plaquetaria. Sumida descubrió que,
- 30 desgraciadamente, cuando los polímeros separaban las plaquetas con mayor eficacia, se activaban más plaquetas. En cambio, cuando se lograba una menor activación de las plaquetas, había un rendimiento plaquetaria deficiente. Además, debido a los protocolos de sedimentación, las plaquetas normalmente no están distribuidas de forma homogénea en las fracciones de PRP y, por lo tanto, su cuantificación es difícil.

Así, sigue existiendo la necesidad de métodos mejorados de preparación de PRP.

- 35 Además, los esfuerzos anteriores de separación requieren, al parecer, la extracción de una parte alícuota de un PRP (u otra fracción de un líquido) del tubo de toma de muestras en el que se prepara o separa para su transferencia a un recipiente separado de almacenamiento para usos comerciales. La etapa de extracción de partes alícuotas puede tener uno o más efectos no deseados, incluyendo, por ejemplo, no extraer una parte alícuota de la totalidad del PRP o de otra fracción deseada, extraer partes alícuotas de fracciones o materiales no deseados, o contaminación.
- 40 Así, sigue existiendo la necesidad de un método o un dispositivo que permita el uso de una fracción deseada de un líquido sin la necesidad de extraer una parte alícuota de la fracción de un tubo de toma de muestras en el que se obtiene o se separa para su colocación en un recipiente separado de almacenamiento.

Compendio de la invención

- 45 La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. El contenido de la invención proporciona aparatos, sistemas y métodos en los que una fracción de plasma rico en plaquetas (PRP) que tiene una concentración deseada de plaquetas funcionales es separada de una muestra de sangre total. La separación se consigue usando una sustancia separadora polimerizable que es autosuspensible con la sangre total y curable para formar una barrera sólida.

- 50 Según se usa en la descripción de la presente memoria y en todas las reivindicaciones que siguen, el significado de “un”, “una”, “el” y “la” incluye referencias plurales, a no ser que el contexto dicte claramente lo contrario. Además, según se usa en la descripción de la presente memoria, el significado de “en” incluye “en” y “sobre”, a no ser que el contexto dicte claramente lo contrario.

Según se usa en la presente memoria, una fracción de PRP comprende al menos un 150% de la concentración de plaquetas en la muestra de sangre total, menos de un 20% de los leucocitos de la muestra de sangre total de la que es obtenida, y menos de un 20% de los hematíes de la muestra de sangre total de la que es obtenida.

5 La sustancia separadora polimerizable puede ser incluida en un tubo de toma de muestras con la muestra de sangre total que es centrifugada hasta que la sustancia separadora polimerizable se asienta entre la fracción de PRP y una fracción no de PRP de la muestra de sangre total. Dado que la sustancia separadora polimerizable (antes del curado) comprende bloques constitutivos menores (por ejemplo, oligómeros), entre las plaquetas y los materiales de la sustancia separadora se producen una fricción y fuerzas de cizallamiento sustancialmente menores, lo que da como resultado una menor activación de las plaquetas.

10 Una vez que la sustancia separadora polimerizable se asienta entre las fracciones de PRP y no de PRP, la sustancia separadora polimerizable puede ser endurecida para formar una barrera sólida, teniendo la sustancia separadora polimerizable de la barrera sólida un peso molecular medio que es mayor que el peso molecular medio de la sustancia separadora polimerizable cuando es autosuspendible, y no teniendo la polimerización un efecto sustancialmente adverso sobre la viabilidad de las plaquetas. Preferentemente, la barrera sólida será estacionaria con respecto al tubo de toma de muestras e impermeable hasta un grado que impida la mezcla de la fracción de PRP y la fracción no de PRP tras su agitación. Esto permitirá ventajosamente a un usuario homogeneizar la fracción de PRP y extraerla completamente del tubo de toma de muestras sin volver a mezclar las fracciones de PRP y no de PRP.

20 El contenido de la invención también proporciona aparatos, sistemas y métodos en los cuales una fracción de PRP o cualquier otra fracción de cualquier otro líquido puede ser usada sin la necesidad de extraer partes alícuotas de la fracción deseada del tubo de toma de muestras en el que es obtenida o separada para su colocación en un recipiente separado de almacenamiento.

25 Por ejemplo, se contempla un adaptador que tiene una aguja que tiene acoplamiento de fluido con un dosificador de líquidos (por ejemplo, un dosificador de gotas oculares). La aguja está dimensionada para perforar al menos una porción del tapón del tubo de toma de muestras y para hacer contacto con la fracción deseada. El dosificador de líquidos estará fuera del tubo de toma de muestras cuando la aguja esté dispuesta al menos parcialmente dentro del tubo, e incluye o está acoplado con un mecanismo que permite una dosificación estéril, controlada, gota a gota, de la fracción del líquido.

30 Diversos objetos, características, aspectos y ventajas del contenido de la invención se harán más evidentes por la siguiente descripción detallada de realizaciones preferentes, junto con las figuras de los dibujos adjuntos, en las que número similares representan componentes similares.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** ilustra un tubo de toma de muestras que es usado según un método del contenido de la invención para separar una fracción de plasma rico en plaquetas de la sangre total.

35 La **Figura 2** es una ilustración esquemática de un método de separación de una fracción de plasma rico en plaquetas de una muestra de sangre total.

La **Figura 3** muestra el "Cts" (umbral de ciclo) del control, del tubo con LAI, y del tubo con LAIT.

La **Figura 4** muestra la falta de reproducibilidad de recuentos de cfDNA tomados de plasma no mezclado.

La **Figura 5** muestra la agregación de un control, LAI y LAIE a ristocetina.

40 La **Figura 6** muestra la agregación de un control, LAI y LAIE a colágeno.

La **Figura 7** es una ilustración esquemática de otro método de separación de una fracción de plasma rico en plaquetas de una muestra de sangre total.

La **Figura 8** es una ilustración esquemática de otro método más de separación de una fracción de plasma rico en plaquetas de una muestra de sangre total.

45 La **Figura 9A** ilustra una realización de un adaptador del contenido de la invención.

La **Figura 9B** ilustra una realización de un tubo de toma de muestras que puede ser acoplado con el adaptador de la Figura 5A.

La **Figura 9C** es una vista del tapón de un tubo de toma de muestras desde arriba.

Descripción detallada

50 La siguiente exposición proporciona muchas realizaciones ejemplares del contenido de la invención.

Debería apreciarse que las técnicas dadas a conocer proporcionan muchos efectos técnicos ventajosos, incluyendo una mayor separación plaquetaria en presencia de una SSP sin activación sustancial de las plaquetas separadas. Además, las composiciones y los métodos proporcionados permiten que un usuario dé la vuelta a un tubo de toma de muestras tras la polimerización de la sustancia separadora para mezclar la fracción separada de PRP, sin volver a mezclarla con las fases separadas o la SSP, hasta que se obtiene una distribución sustancialmente homogénea de las plaquetas. Además, los métodos y los dispositivos proporcionados permiten el uso comercial de un PRP u otra fracción de un líquido sin extraer la fracción del tubo de toma de muestras en el que fue preparada o separada para su colocación en un recipiente separado de almacenamiento.

La **Figura 1** muestra esquemáticamente una realización de separación de una fracción de PRP según el contenido de la invención. Se contempla que pudiera usarse cualquier tubo de toma de muestras adecuado para llevar a cabo los métodos del contenido de la invención. Preferentemente, el tubo está fabricado de un material rígido (por ejemplo, plásticos duros, vidrio, etc.) adecuado para soportar el vacío dentro de su luz, y es de suficiente volumen para contener una muestra deseable de sangre total de la que pueda separarse una cantidad deseable de PRP. Un tubo ejemplar incluye los productos BD Vacutainer®. Aunque los dispositivos y los métodos preferentes descritos en la presente memoria incluyen el uso de un tubo de toma de muestras, se contempla que un tubo de toma de muestras pudiera ser sustituido con otros recipientes tales como matraces, tarros, vasos de precipitados, frascos o viales.

En la realización de la Figura 1, un tubo 100 de toma de muestras que contiene una sustancia separadora autosuspendible/polimerizable 105 es expuesto a una fuente 110 de energía de esterilización, que aplica energía 115 de esterilización (por ejemplo, radiación gamma, radiación de haces de electrones, calor) al tubo 100 y a la sustancia separadora 105, dando como resultado un tubo de separación esterilizado y una sustancia separadora 120 esterilizada (pero aún autosuspendible y curable mediante radiación UV). Al tubo 100 se le puede añadir una muestra de sangre total 125, formando con ello una mezcla 130 de la muestra y de la sustancia separadora esterilizada.

A continuación, el tubo 100 y la mezcla 130 pueden ser centrifugados hasta que el componente de la sustancia separadora 140 de la mezcla 130 se asiente entre la fracción de PRP 145 y la fracción no de PRP 135 de la muestra de sangre total 125. La fracción de PRP 145 tendrá, preferentemente, una concentración plaquetaria que sea al menos un 150% de la concentración plaquetaria de la muestra 125, y la fracción no de PRP 135 comprenderá, preferentemente, al menos un 90% de los leucocitos y los hematíes de la muestra 125.

La sustancia separadora polimerizable 140 puede ser polimerizable en todo o en parte. Por lo tanto, la exposición de la sustancia separadora 140 a la energía 150 (por ejemplo, energía UV) generada por una fuente adecuada 155 de energía (por ejemplo, una fuente de luz UV) iniciará una polimerización por radicales y hará que al menos una porción de la sustancia separadora 140 forme una composición sólida reticulada 160 que actúa como una barrera impermeable entre la fracción de PRP 145 y la fracción no de PRP 135. En algunas realizaciones, el grosor final de la barrera (después del curado por radiación UV) no será de más de 10 mm, y, más preferentemente, de no más de 5 mm.

La sustancia separadora polimerizable (o la porción polimerizable de una sustancia separadora polimerizable) podría estar formulada para polimerizarse en menos de diez minutos hasta una dureza de al menos 1 en la escala de dureza Shore 00, más preferentemente una dureza de al menos 10 en la escala de dureza Shore A, cuando es activada por una fuente de energía adecuada (por ejemplo, luz UV), y formar un sólido con respecto a una sonda, una pipeta, decantándose o incluso congelándose. La barrera sólida endurecida formada puede adherirse a las paredes de una luz de un tubo para sellar sustancial o completamente la fracción de PRP con respecto a una o más fracciones adicionales, protegiendo con ello a la fracción de PRP de una contaminación debida a la difusión, la agitación, la extracción de muestras u otra interacción no deseable.

Cuando una sustancia separadora 140 es polimerizable solo en parte, se contempla que la porción no polimerizable (por ejemplo, un componente de gel tixotrópico) pueda asentarse debajo de la porción polimerizable de modo que la fracción de PRP deseada pueda ser usada o extraída por completo del tubo de toma de muestras sin la mezcla de la fracción de PRP con la fracción no de PRP o la porción no polimerizable. La porción no polimerizable podría incluir, por ejemplo, geles estándar (por ejemplo, tubos de toma de muestras sanguíneas con separadores de gel BD Vacutainer® SST™, BD Vacutainer® PST™, Vacurette®, tubos con gel separador de suero PPMA, etc.), o cualquier otro gel comercial adecuado.

Debería apreciarse que una sustancia separadora del contenido de la invención, gracias a la barrera sólida formada, puede permitir a un usuario lograr o volver a obtener una homogeneidad sustancial de la fracción de PRP mezclando o agitando de otro modo la fracción de PRP en el tubo de toma de muestras sin desprender la barrera entre las fracciones de PRP y no de PRP. Además, la sustancial homogeneidad podría lograrse sin alteraciones de las células; por ejemplo, sin activación sustancial de las plaquetas. Además, cuando al menos una porción de la sustancia separadora es polimerizable para formar un sólido, el curado de la sustancia separadora polimerizable puede formar una red polimérica que mantiene la separación de la fracción de PRP con tanta eficacia como la que mantendría una sustancia separadora polimérica, o aún mayor.

5 Algunas sustancias separadoras polimerizables contempladas pueden comprender: (1) un oligómero (por ejemplo, una combinación de los mismos (por ejemplo, Ebecryl, Cytec)), con (2) un fotoiniciador (por ejemplo, Additol® BDK, Additol® TPO) y (3) un estabilizante (fenotiazina). Ejemplos de composiciones fotocurables contempladas incluyen, entre otras, LAI (por ejemplo, L1A1 y fenotiazina), y LAIR. Según se usan en la presente memoria, L = un oligómero (por ejemplo, L1 = Ebecryl 230 de Allnex, previamente de Cytec Industries, Inc., etc.); A= un fotoiniciador (por ejemplo, A1 = Additol BDK); I= un estabilizante (por ejemplo, fenotiazina, etc.). Véase la **Tabla 1** a continuación para más ejemplos de componentes que pueden estar incluidos en una SSP.

Tabla 1

ABREVIATURA	NOMBRE
R	Gelificante (por ejemplo, DBS, sílice, etc.)
M	Monómero
M1	Triacrilato de propoxilato de trimetilolpropano
L	Oligómero
L1	Ebecryl 230 de Allnex
A	Fotoiniciador
A1	Additol BDK
I	Estabilizante
I1	Fenotiazina
E	Antioxidante/neutralizador de radicales (por ejemplo, vitamina E, BHT, BHA, caroteno, bilirrubina, ácido ascórbico, etc.)
D	Regulador de la densidad (por ejemplo, Ebecryl 113 de Cytec, etc.)
T	Nitróxido de TEMPO

10 En algunas sustancias separadoras polimerizables contempladas, el fotoiniciador está presente a una concentración inferior al 10% en peso, inferior al 5% en peso o incluso inferior al 2% en peso, y un estabilizante está presente a una concentración inferior al 5% en peso, inferior al 2% en peso, inferior al 1% en peso o incluso inferior al 0,5% en peso. Como ejemplo no limitante más específico, una sustancia separadora puede comprender un oligómero presente a una concentración de entre el 95 y el 100% (100% en peso), un fotoiniciador presente a una concentración de entre el 0,8 y el 1,2% (por ejemplo, 1% en peso), y un estabilizante presente a una concentración de entre el 0,01 y el 0,05% (por ejemplo, 0,1% en peso).

15 Fotoiniciadores contemplados incluyen, entre otros, Additol BDK y Additol TPO. Estabilizantes contemplados incluyen, entre otros, fenotiazina. Una sustancia separadora también puede incluir un antioxidante, especialmente cuando se desea la esterilización del tubo de toma de muestras con una sustancia separadora sin un curado sustancial de la sustancia separadora. Los antioxidantes contemplados incluyen, entre otros, tocoferol, butil hidroxitolueno (BHT), butil hidroxianisol (BHA), caroteno, bilirrubina y ácido ascórbico.

20 Una sustancia separadora polimerizable ejemplar comprende un oligómero, un fotoiniciador y un estabilizante, estando presente el fotoiniciador a una concentración inferior al 5%, y estando presente el estabilizante a una concentración inferior al 0,5% en peso.

25 La LAI (por ejemplo, L1, A1 y fenotiazina) compone algunas composiciones especialmente preferidas, y puede ser formulada para que tenga el intervalo deseado de densidad de 1,00-1,09 g/cm³. Aunque se realizaron experimentos usando una composición fotocurable que tenía un oligómero, se contempla que también puedan ser adecuadas composiciones que contienen monómeros para su uso en la preparación de PRP, dado que muchos monómeros y oligómeros tienen una reactividad similarmente alta, y muchos monómeros y oligómeros pueden polimerizarse en presencia de luz.

30 Otros ejemplos de sustancias separadoras fotocurables potencialmente adecuadas incluyen las descritas en las patentes estadounidenses n^{os} 7.674.388, 7.673.758, 7.775.962, 7.971.730, 7.780.861, 8.206.638, 8.282.540, 8.151.996, y 8.318.077, LAIE (por ejemplo, L1, A1, fenotiazina y tocoferol), y LAIER, siendo R = un gelificante (por ejemplo, DBS, sílice, etc.), y E = al menos uno de un antioxidante y un neutralizador de radicales (por ejemplo, vitamina E, butil hidroxitolueno (BHT), butil hidroxianisol (BHA), caroteno, bilirrubina, ácido ascórbico, etc.). Aunque generalmente R y E no son componentes necesarios de una composición fotocurable, cada uno puede aportar características ventajosas a la composición fotocurable para algunos usos. Por ejemplo, un gelificante puede no ser un componente necesario de la composición fotocurable cuando la sustancia separadora también comprende un componente de gel tixotrópico blando que es cargado en el tubo de toma de muestras encima de la composición

fotocurable, de modo que no resulte flujo alguno antes del uso. No obstante, puede ser deseable contar con una composición fotocurable tixotrópica; por ejemplo, cuando sea deseable hacer que el sellante esté dispuesto en el tubo sin un componente de gel blando, o encima del componente de gel blando.

5 Aunque no sea necesario, se puede incluir un neutralizador de radicales tal como compuestos que tengan actividad de vitamina E (por ejemplo, tocoferol) para permitir que la composición fotocurable sea esterilizada mediante irradiación sin curado (por ejemplo, cambiando las propiedades de densidad), en vez de requerir esterilización por calor para mantener una fluidez eficaz para permitir su sedimentación entre dos fracciones de una muestra de sangre total. Cuando se desee una esterilización por calor, puede lograrse exponiendo el tubo de toma de muestras y la sustancia separadora a un calor de al menos 200 grados Celsius, más preferentemente de al menos 225 grados Celsius, y siendo lo más preferible de al menos 250 grados Celsius.

10 Se contempla que pueda incluirse un anticoagulante en el tubo de toma de muestras, opcionalmente como parte de la sustancia separadora, para impedir la coagulación de la muestra de sangre total y obtener plasma que contenga fibrinógeno y factores de coagulación. Los anticoagulantes contemplados incluyen citrato sódico, EDTA, citrato-dextrosa o cualquier otro anticoagulante adecuado. Es digno de mención que, aunque se inicie y lleve a cabo una polimerización por radiación, la química usada y, especialmente, la polimerización acrílica no afectará a la activación ni a la función de las plaquetas, ni interferirá en muchos o la mayoría de otros ensayos que pueden realizarse en la fracción de PRP.

15 La **Figura 2** ilustra un método 200 de separación de una fracción de PRP de una muestra de sangre total en un tubo de toma de muestras que incluye una sustancia separadora polimerizable (SSP). Aunque en la luz del tubo se puede incluir cualquier cantidad adecuada de la sustancia separadora, se prefiere que se incluyan no más de aproximadamente 1 ml o 2 gramos de la sustancia separadora por 10 ml de volumen del tubo.

20 El método 200 incluye la etapa de centrifugación de la muestra de sangre total en el tubo de toma de muestras que incluye la SSP usando un protocolo de centrifugación mostrado en la etapa 210. Se contempla cualquier protocolo de centrifugación adecuado que sea suficiente para hacer que la SSP fluya entre dos fracciones de una muestra, incluyendo por ejemplo, una centrifugación durante diez minutos a 24°C y 1000 RPM, según se muestra en la etapa 212. Otros ejemplos de protocolos de centrifugación adecuados podrían incluir: un tiempo de centrifugación de entre un minuto y treinta minutos, inclusive, a entre 500 RPM y 5000 RPM, inclusive; o un tiempo de centrifugación de entre cinco minutos y veinte minutos, inclusive, a entre 700 RPM y 3600 RPM, inclusive. Según es bien sabido en la técnica, las condiciones de centrifugación determinan la sedimentación y la velocidad de sedimentación de las plaquetas. La persona con un dominio normal de la técnica, sin experimentación indebida, podrá determinar las fuerzas G aplicadas y el tiempo apropiados para lograr una producción deseada de plaquetas encima de la SSP. Por lo tanto, puede lograrse fácilmente un aumento o una disminución en las producciones deseadas usando las consideraciones anteriores.

25 A no ser que el contexto dicte lo contrario, debería interpretarse que todos los intervalos definidos en la presente memoria son inclusivos de sus puntos extremos y debería interpretarse que los intervalos de extremo abierto incluyen únicamente valores comercialmente prácticos. De modo similar, debería considerarse que todas las listas de valores son inclusivas de los valores intermedios, a no ser que el contexto indique lo contrario.

30 En las realizaciones más preferentes, la SSP será autosuspensible con la sangre total y tiene una densidad entre la densidad media de una fracción de PRP y la densidad media de una fracción no de PRP según la etapa 215.

35 Para lograr una densidad inicial deseada, se contempla que la densidad de la sustancia separadora pueda ser regulada en virtud de la composición molecular, o por la inclusión de materiales de carga apropiados (por ejemplo, sílice, látex u otro material inerte).

40 Además, o alternativamente, la centrifugación con un protocolo adecuado puede hacer que la SSP fluya entre la fracción de PRP y la fracción no de PRP sin activación sustancial de plaquetas según la etapa 218. Se contempla, cuando se use la SSP para la separación de una muestra de un líquido diferente, o para la separación de una muestra de sangre total en fracciones distintas de un PRP y una fracción no de PRP, que la SSP pudiera tener una densidad entre la densidad media de una primera fracción que haya de separarse y la densidad media de una segunda fracción que haya de separarse.

45 Según se usa en la presente memoria, una centrifugación que usa un primer protocolo de centrifugación para hacer que la SSP fluya entre dos fracciones de una muestra sin activación sustancial de plaquetas significa que las plaquetas conservan su función hasta dentro de un 15%, más preferentemente dentro de un 10%, de la que mantendrían las plaquetas durante un protocolo de centrifugación por lo demás idéntico al primer protocolo de centrifugación en el que no se usa una SSP (por ejemplo, sin ninguna sustancia separadora). La activación sustancial de las plaquetas es medible, entre otras cosas, en función de la capacidad de las plaquetas de la fracción de PRP, de la fracción no de PRP, o de ambas, de agregarse a al menos uno de ristocetina y colágeno.

50 El método 200 también incluye la etapa 220 de endurecimiento de la SSP sin activación sustancial de plaquetas para formar una barrera sólida entre la fracción de PRP y la fracción no de PRP. Dependiendo de la formulación de la sustancia separadora, se contempla que el modo o mecanismo de polimerización pueda variar

- considerablemente. Aunque la exposición de la presente memoria va dirigida fundamentalmente hacia la polimerización mediante energía UV, se considera que todos los métodos de polimerización conocidos son adecuados para su uso en la presente memoria. Por ejemplo, las polimerizaciones contempladas incluyen diversas polimerizaciones de radicales o catiónicas (por ejemplo, usando compuestos fotolábiles, cebadores de radicales, etc.), polimerización por condensación, esterificación, formación de amidas, etcétera. Los grupos reactivos pueden incluir grupos ácidos, siendo los más preferibles los grupos mono y dicarboxílicos, grupos dieno conjugados, grupos vinilo aromáticos y (met)acrilato alquílico. La polimerización puede estar, ventajosamente, completamente soportada por grupos reactivos de los monómeros u oligómeros de la sustancia separadora, pero también pueden ser adecuados reactivos adicionales, incluyendo los cebadores de radicales.
- 5 La etapa de endurecimiento puede formar ventajosamente una barrera sólida entre la fracción de PRP y la fracción no de PRP que es estacionaria con respecto al tubo de toma de muestras. Además, la barrera sólida puede ser impermeable hasta un grado que impida la mezcla de la fracción de PRP y la fracción no de PRP tras su agitación, según se muestra en la etapa 222. La SSP de la barrera sólida tendrá un peso molecular medio que es mayor que el peso molecular medio de la SSP cuando es autosuspensible con la sangre total según la etapa 225.
- 10 Según se usa en la presente memoria, endurecimiento de la sustancia separadora polimerizable sin activación sustancial de plaquetas significa que las plaquetas conservan su función hasta dentro de un 15%, más preferentemente dentro de un 10%, de lo que conservarían las plaquetas cuando no se usa SSP y cuando no hay ninguna etapa de endurecimiento.
- 15 La barrera sólida permite ventajosamente un paso de extracción de al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95% y lo más preferible es que sea el 100% de la fracción de PRP del tubo de toma de muestras sin volver a mezclar la fracción de PRP con la fracción no de PRP. Esto podría lograrse extrayendo la fracción de PRP, tal cual está, del tubo de toma de muestras (por ejemplo, vertiéndola, extrayéndola con pipeta, etc.), o incluyendo suero fisiológico u otro líquido en el tubo para contribuir a extraer toda la fracción de PRP.
- 20 El método 200 podría incluir opcionalmente una etapa de homogeneización de la fracción de PRP, después de la etapa de endurecimiento, de modo que diferentes partes alícuotas tomadas de la misma tengan recuentos plaquetarios que se encuentren dentro de un coeficiente de variación del método de recuento celular usado. Esto puede ser sumamente beneficioso para proporcionar reproducibilidad y uniformidad. La homogeneización de la fracción de PRP puede lograrse usando cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, agitación mecánica, agitación por burbujas, poner el tubo boca abajo o agitarlo de otra manera, o titulación con una pipeta de boca ancha.
- 25 Recuperación de las plaquetas
- 30 Muchas personas en las industrias cosmética y de salud han descubierto que un PRP que tenga un 200-250% de concentración plaquetaria de una muestra de sangre es óptimo. Los tubos de toma de muestras usados previamente (por ejemplo, Vacutainers BD de tapón violeta sin ninguna sustancia separadora) para recuperar fracciones de sangre total implican la centrifugación de la sangre para producir un sobrenadante de la fracción de suero, una capa leucocitaria intermedia y una fracción de hematíes debajo de la capa leucocitaria. Tales tubos y tales métodos hacen muy difícil o incluso imposible extraer el sobrenadante sin extraer leucocitos de la capa leucocitaria. Por otro lado, cuando se usa un gel, el resultado es una fracción de PRP o suero, dependiendo del protocolo de centrifugación, luego una capa de gel intermedia, luego una capa leucocitaria y una fracción de hematíes. Nuevamente, es muy difícil, si no imposible, extraer la totalidad de la fracción de PRP o suero sin aspirar el gel con el PRP o el suero. Y, en cualquier caso, hay una distribución significativamente deficiente de plaquetas en la fracción de PRP.
- 35 La SSP y los métodos del contenido de la invención permiten ventajosamente una recuperación de plaquetas a diversas concentraciones (incluyendo el intervalo del 200-250%), y también permiten el uso de la totalidad del sobrenadante de PRP. La **Tabla 2** ilustra a continuación que la producción plaquetaria usando LAI o LAIR fue al menos tan buena como cuando se usa un control. La Tabla 2 también ilustra que podía lograrse la misma
- 40 disminución de hematíes usando LAI o LAIR que cuando se usaba el control.
- 45

Tabla 2

Tapón azul (citrato sódico), tubo de vidrio, sangre nueva, exposición a radiación UV de 30 segundos								
Composición del gel = L (100%); A (1,00%); I (0,10%); R (5%)								
	FCR (g)	Tiempo (min)	Plaquetas (pre)	Plaquetas (post)	Aumento porcentual de plaquetas	Hematíes (pre)	Hematíes (post)	Disminución porcentual de hematíes
Control 1	300	5	198	435	220	4,19	0,03	99
Control 2	300	5	216	462	214	4,71	0,04	99

Tapón azul (citrato sódico), tubo de vidrio, sangre nueva, exposición a radiación UV de 30 segundos								
Composición del gel = L (100%); A (1,00%); I (0,10%); R (5%)								
	FCR (g)	Tiempo (min)	Plaquetas (pre)	Plaquetas (post)	Aumento porcentual de plaquetas	Hematíes (pre)	Hematíes (post)	Disminución porcentual de hematíes
LAI 1	300	5	205	381	186	4,22	0,03	99
LAI 2	300	5	194	392	202	4,16	0,03	99
LAIR 1	300	5	192	480	250	4,18	0,03	99
LAIR 2	300	5	201	469	233	4,17	0,06	99
Tapón rojo, tubo de vidrio, sangre de repositorio, exposición a radiación UV de 30 segundos								
Composición del gel = L (100%); A (1,00%); I (0,10%); R (5%)								
	FCR (g)	Tiempo (min)	Plaquetas (pre)	Plaquetas (post)	Aumento porcentual de plaquetas	Hematíes (pre)	Hematíes (post)	Disminución porcentual de hematíes
Control 1	300	5	193	333	173	1,96	0,03	98
Control 2	300	5	122	186	152	2,05	0,04	98
LAI 1	300	5	117	175	150	2,02	0,03	99
LAI 2	300	5	141	267	189	2,73	0,03	99
LAIR 1	300	5	114	197	173	2,11	0,03	99
LAIR 2	300	5	121	195	161	2,13	0,06	97
Tapón azul (citrato sódico), tubo de vidrio, sangre de repositorio, exposición a radiación UV de 30 segundos								
Composición del gel = L (100%); A (1,00%); I (0,10%); R (5%)								
	FCR (g)	Tiempo (min)	Plaquetas (pre)	Plaquetas (post)	Aumento porcentual de plaquetas	Hematíes (pre)	Hematíes (post)	Disminución porcentual de hematíes
Control 1	200	12	121	155	128	2,20	0,03	99
Control 2	200	12	143	165	115	2,08	0,03	99
LAI 1	200	12	134	164	122	2,19	0,03	99
LAI 2	200	12	138	164	119	2,14	0,03	99
LAIR 1	200	12	122	161	132	2,18	0,03	99
LAIR 2	200	12	122	169	139	2,07	0,03	99
Tapón azul (citrato sódico), tubo de vidrio, sangre de repositorio, exposición a radiación UV de 30 segundos								
Composición del gel = L (100%); A (1,00%); I (0,10%); R (5%)								
	FCR (g)	Tiempo (min)	Plaquetas (pre)	Plaquetas (post)	Aumento porcentual de plaquetas	Hematíes (pre)	Hematíes (post)	Disminución porcentual de hematíes
LAI 1	150	10	171	247	144	2,58	0,04	98
LAI 2	150	10	177	211	119	2,04	0,05	98
LAIR 1	150	10	187	228	122	1,8	0,05	97
LAIR 2	150	10	198	248	125	1,54	0,05	97

Tapón azul (citrato sódico), tubo de vidrio, sangre de repositorio, exposición a radiación UV de 30 segundos								
Composición del gel = L (100%); A (1,00%); I (0,10%); R (5%)								
	FCR (g)	Tiempo (min)	Plaquetas (pre)	Plaquetas (post)	Aumento porcentual de plaquetas	Hematíes (pre)	Hematíes (post)	Disminución porcentual de hematíes
LAI 1	150	20	183	243	133	2,39	0,03	99
LAI 2	150	20	142	139	98	1,69	0,02	99
LAIR 1	150	20	123	150	122	1,62	0,02	99
LAIR 2	150	20	128	146	114	1,6	0,02	99

La **Tabla 3**, a continuación, ilustra que la producción de plaquetas usando LAI o LAIE fue al menos tan buena como cuando se usa un control. La Tabla 2 también ilustra que podía lograrse la misma disminución de leucocitos usando LAI o LAIE que cuando se usaba el control.

Las composiciones (LAI y LAIE) sometidas a ensayo están compuestas de lo siguiente:

	LAI	LAIE
L	100%	100%
A	1%	1%
I	0,10%	0,10%
E	--	200mM

- 5 El diferencial manual de la LAI fue como sigue: 8% neutrófilos, 80% linfocitos, 10% monocitos, 2% eosinófilos. El diferencial manual de la LAIE fue como sigue: 5% neutrófilos, 89% linfocitos, 5% monocitos, 1% eosinófilos.

ID de la muestra	Sangre total de control 1	Sangre total de control 2	Sangre total de control promedio	Plasma de control 1	Plasma de control 2	Plasma de control promedio	Exp UV de control 1
Centrifugada	No	No		Sí	Sí		Sí
Exposición a radiación UV	No	No		No	No		1:45 min a 2,54 cm, 25%
Leucocitos [10 ³ /uL]	3,6	3,66	3,63	0	0,01	0,005	0,10
Hematíes [10 ⁶ /uL]	3,97	3,93	3,95	0,02	0,02	0,02	0,01
HGB [g/dL]	12,8	12,6		0	0		0,00
HCT [%]	38,1	37,6		0,1	0,1		0,10
MCV [fL]	96	95,7		50	50		100,00
MCH [pg]	32,2	32,1		0,0	0,0		0,0
MCHC [g/dL]	33,6	33,5		0,0	0,0		0,0
RDW-SD [fL]	45,7	45,8		--	--		--
RDW-CV [%]	12,8	13		--	--		--
PLT [10 ³ /uL]	130	139	134,5	182	156		186,00
MPV [fL]	11,3	11		11	10,8		10,50

Exp UV de control 2	Exp UV de control promedio	Plasma LAI	Disminución porcentual	Plasma LAIE	
Sí		Sí		Sí	
1:45 min a 2,54 cm, 25%		1:00 min a 2,54 cm, 25%		1:45 min a 2,54 cm, 25%	
0,16	0,13	0,06	98,3	0,06	98,3
0,01	0,01	0,03	99,2	0,02	99,5
0		0		0	
0,1		0,1		0,1	
100		33,3		50	
0,0		0,0		0,0	
0,0		0,0		0,0	
--		--		--	
--		Aumento del factor plaquetario			
177		301	2,2	275	2,0
10,5		11,2		11	

Tabla 3

La **Tabla 4** muestra la producción de plaquetas y la disminución de leucocitos con un protocolo de centrifugación como sigue: 1000 RPM durante diez minutos a 24°C. Hubo un ligero aumento en la producción de plaquetas y una disminución similar de leucocitos/hematíes.

5

Las composiciones (LAI y LAIE) sometidas a ensayo están compuestas de lo siguiente:

	LAI	LAIE
L	100%	100%
A	1%	1%
I	0,10%	0,10%
E	--	200mM

Los experimentos se llevaron a cabo en tubos de citrato sódico.

ID de la muestra	Control 1	Control 2	Controles promedio	LAI 1	Plasma de control 1	Plasma de control 2
Centrifugada	No	No		No	Sí	Sí
Exposición a radiación UV	No	No		No	No	No
Leucocitos [10 ³ /uL]	6,86	6,46	6,66	6,45	0,09	0,03
Hematíes [10 ⁶ /uL]	4,17	4,22	4,20	4,35	0,01	0,01
HGB [g/dL]	12,9	13	13,0	13,2	0	0
HCT [%]	38,3	38,9	38,6	40,3	0,1	0,1
MCV [fL]	91,8	92,2	92,0	92,6	100	100
MCH [pg]	30,9	30,8	30,9	30,3	0,0	0,0
MCHC [g/dL]	33,7	33,4	33,6	32,8	0,0	0,0
RDW-SD [fL]	44,2	44	44,1	44,9	--	--

ES 2 671 747 T3

ID de la muestra	Control 1	Control 2	Controles promedio	LAI 1	Plasma de control 1	Plasma de control 2
RDW-CV [%]	13,2	13,2	13,2	13,2	--	--
PLT [10 ³ /uL]	226	215	220,5	226	385	400
MPV [fL]	8,9	8,8	8,9	8,4	9,4	9,3

Plasma de control promedio	Control 1 post UV	Control 2 post UV	Control promedio post UV	Plasma LAI 1
	Sí	Sí		Sí
	1:00 min a 2,54 cm, 25%	1:45 min a 2,54 cm, 25%		1:00 min a 2,54 cm, 25%
0,06	0,10	0,07	0,09	0,21
0,01	0,02	0,02	0,02	0,02
0	0,00	0	0	0
0,1	0,10	0,1	0,1	0,1
100	50,00	50	50	50
0	0,00	0,00	0	0,0
0	0,00	0,00	0	0,0
	--	--		--
	--	--		--
392,5	336,00	393	364,5	449
9,35	9,90	9,5	9,7	8,9

ID de la muestra	Plasma LAI 2	LAI promedio	Plasma LAIE 1	Plasma LAIE 2	LAIE promedio	Disminución de control de hematíes y leucocitos	Disminución porcentual LAI	Disminución porcentual LAIE
Centrifugada	Sí		Sí	Sí				
Exposición a radiación UV	1:00 min a 2,54 cm, 25%		1:00 min a 2,54 cm, 25%	1:45 min a 2,54 cm, 25%				
Leucocitos	0,15	0,18	0,23	0,02	0,125	99,10	97,30	98,12
Hematíes	0,01	0,015	0,02	0,01	0,015	99,76	99,64	99,64
HGB [g/dL]	0	0	0	0	0			
HCT [%]	0	0,05	0,1	0	0,05			
MCV [fL]	0	25	50	100	75			
MCH [pg]	0,0	0	0,0	0,0	0,0			
MCHC [g/dL]	--		0,0	0,0	0,0			
RDW-SD [fL]	--		-	--				
RDW-CV [%]	--		-	--		Aumento del factor plaquetario		
PLT	394	421,5	456	439	447,5	1,8	1,9	2,0
MPV [fL]	8,8	8,85	9	9	9			

Tabla 4

Recuperación de una fracción homogénea de PRP

La SSP del contenido de la invención proporciona la ventaja adicional de permitir la preparación de una fracción de PRP (u otro) sustancialmente homogénea. El solicitante comparó la recuperación de ADN libre de células (cfDNA) en 3 tipos de tubos y determinó que partes alícuotas tomadas de una muestra no mezclada llevarían a resultados variables. Visto desde una perspectiva diferente, si un usuario extrae partes alícuotas de un tubo sin gel sin mezcla, las partes alícuotas serán sumamente variables. Si un usuario extrae partes alícuotas del plasma del tubo y las mezcla fuera del tubo, los resultados pueden ser más reproducibles, pero la recuperación es peor.

Los 3 tipos de tubo sometidos a ensayo son los siguientes: control ("Sin gel"), tubo con fotogel LAI y tubo con fotogel LAIT, siendo L= oligómero, A= fotoiniciador Additol BDK, I= estabilizante fenotiazina, y T=nitróxido de TEMPO. La **Figura 3** muestra el "Cts" (umbral de ciclo) del control, del tubo con LAI y del tubo con LAIT. El menor Ct de LAI y LAIT en comparación con el control indica mejor recuperación en comparación con el control. La Figura 5 también muestra que los resultados usando LAI y LAIT fueron similarmente reproducibles como el control. N=4 para cada tipo de tubo.

El protocolo usado es como sigue: la sangre de repositorio fue mezclada y cargada por pipeta en cada uno de los nueve tubos. Los tubos con fotogel fueron precargado con LAI o con LAIT. Todos los tubos fueron centrifugados a temperatura ambiente durante 10 minutos a 3000 RPM. Tras la centrifugación, los tubos con fotogel fueron expuestos a luz UV en la caja de iluminación durante 1 minuto. Se extrajo plasma de cada tubo, y, para los tubos que incluían la barrera solidificada, se extrajo todo el plasma. Para el tubo de control sin gel alguno, se tuvo cuidado de no alterar la capa celular, lo que requería dejar parte del plasma (aproximadamente 100 uL). El plasma fue enviado al laboratorio de patología molecular para un análisis de ADN-Braf. Allí, se extrajeron partes alícuotas adicionales de los cuatro tubos en tres muestras de cada uno. Así, la variabilidad mostrada es inclusiva del procedimiento de división del plasma de cada tubo en tres porciones.

El plasma obtenido de un tubo con EDTA sin gel alguno fue objeto de muestreo manual en la capa superior, la capa inferior (cerca de las células) y la porción central. El plasma fue mezclado por centrifugación vorticial y muestreado ("mezclado") nuevamente. Las curvas de fusión mostradas posteriormente demuestran que el cfDNA recuperado varía con el muestreo manual. El ADN libre de células fue usado como marcador representante de la recuperación plaquetaria.

En el ejemplo mostrado en la **Figura 4**, la parte alícuota tomada de la capa inferior del plasma no mezclado tenía más cfDNA que la parte alícuota tomada de la porción central o que una porción superior mezclada (la depresión más profunda indica mayor recuperación).

Dado que los métodos descritos en la presente memoria incluyen el uso de una SSP que es endurecida para formar una barrera sólida, la fracción de PRP puede ser mezclada dentro del tubo de toma de muestras en el que es obtenida o separada, lo que permite la homogeneización de la fracción de PRP en el tubo de toma de muestras sin exposición a un entorno externo del tubo de toma de muestras. Debería apreciarse que la SSP permite que un usuario obtenga un recuento homogéneo fiable de las plaquetas, porque las cantidades obtenidas de diferentes porciones del tubo pueden estar dentro de un coeficiente de variación del método de recuento celular usado.

Viabilidad plaquetaria

Según se ha expuesto anteriormente, los solicitantes pudieron demostrar que podía lograr una recuperación plaquetaria similar o incluso mejorada usando los métodos y las SSP del contenido de la invención. Es sabido en la técnica que las barreras sólidas de polímeros largos, aunque a menudo mejoran la recuperación plaquetaria, interfieren en la función plaquetaria. Los experimentos y los datos proporcionados posteriormente muestran que los métodos y las SSP del solicitante permiten una recuperación plaquetaria óptima a la vez que mantienen la viabilidad de las plaquetas.

La viabilidad plaquetaria fue sometida a ensayo observando la agregación de las plaquetas a agonistas específicos en el agregómetro cronologarítmico. El PRP fue obtenido centrifugando sangre total cargada en un tubo de control (tubo BD con citrato sódico, sin gel alguno), un tubo LAI (tubo BD de citrato sódico al que se añadió LAI) y un tubo LAIE (tubo BD de citrato sódico con LAIE añadida). Los tubos con fotogel fueron expuestos a luz UV después de su centrifugación para solidificar la barrera. El PRP fue extraído en partes alícuotas y diluido con plasma pobre en plaquetas hasta una concentración plaquetaria requerida por el procedimiento operativo estándar cronologarítmico. Debajo hay curvas ejemplares de agregación plaquetaria a la ristocetina y al colágeno. El colágeno es un fuerte agonista que induce la agregación y la secreción de gránulos plaquetarios y la síntesis de tromboxano, por lo que es un ensayo incluyente de la viabilidad plaquetaria.

Según se ilustra en la **Figura 5**, no se mostró ninguna diferencia significativa en agregación a la ristocetina estaba entre el control, la LAI y la LAIE.

Según se ilustra en la **Figura 6**, no se ve ninguna diferencia apreciable en las curvas de agregación plaquetaria para las plaquetas al colágeno en las curvas del control, de la LAI o de la LAIE, lo que indica que la LAI y la LAIE no afectan sustancialmente a la funcionalidad plaquetaria.

5 La **Figura 7** ilustra otro método 700 de separación de una fracción de PRP de una muestra de sangre total en un tubo de toma de muestras que incluye una SSP que es autosuspensible con la sangre total y tiene una densidad entre la densidad media de una fracción de PRP y la densidad media de una fracción no de PRP de sangre total.

10 El método 700 incluye la etapa de centrifugación de la muestra de sangre total en el tubo de toma de muestras que incluye la SSP usando un protocolo de centrifugación mostrado en la etapa 710. De modo similar a la etapa de centrifugación del método 200, la centrifugación usando un protocolo de centrifugación adecuado hará que la SSP fluya entre la fracción de PRP y la fracción no de PRP sin activación sustancial de plaquetas, según se muestra en la etapa 712. La activación sustancial es medible en función de la capacidad de las plaquetas en la fracción de PRP de agregarse a al menos uno de ristocetina y colágeno, según se muestra en la etapa 715.

15 El método 700 incluye, además, la etapa de endurecimiento de la SSP sin activación sustancial de plaquetas para formar una barrera sólida entre la fracción de PRP y la fracción no de PRP, según se muestra en la etapa 720. La SSP de la barrera sólida tendrá un peso molecular medio que es mayor que el peso molecular medio de la SSP cuando es autosuspensible con la sangre total (por ejemplo, antes de la etapa de endurecimiento) según la etapa 725.

20 En algunos métodos preferentes, la barrera sólida, después de la exposición a la energía UV, será estacionaria con respecto al tubo de toma de muestras en una posición intermedia debajo de la fracción de PRP y encima de la fracción no de PRP y será impermeable hasta un grado que impida la mezcla de la fracción de PRP y la fracción no de PRP tras su agitación, según se muestra en la etapa 722. La barrera sólida permite la extracción de al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95% siendo lo más preferible que sea el 100% de la fracción de PRP del tubo de toma de muestras. Visto desde una perspectiva diferente, el método 700 incluye una etapa opcional de extracción de al menos el 95% de la fracción de PRP del tubo de toma de muestras según la etapa 730.

25 La fracción de PRP puede comprender, ventajosamente, no más de un 10% de leucocitos de la muestra de sangre total. Además, o alternativamente, se contempla que no más del 25% de los leucocitos en la fracción de PRP sean granulocitos.

30 El método 700 también podría comprender la homogeneización de la fracción de PRP en el tubo de toma de muestras después de la etapa de endurecimiento. La etapa de homogeneización podría llevarse a cabo inmediatamente después del endurecimiento, menos de una hora después del endurecimiento, menos de un día después del endurecimiento, al menos dos días después del endurecimiento, al menos cinco días después del endurecimiento o incluso al menos un mes después del endurecimiento. La homogeneización de la fracción de PRP da como resultado una fracción de PRP sustancialmente homogénea, de modo que diferentes partes alícuotas tomadas de la misma tenga recuentos plaquetarios que se encuentren dentro de un coeficiente de variación del método de recuento celular usado.

35 La **Figura 8** ilustra otro método adicional 800 de separación de una fracción de PRP de una muestra de sangre total en un tubo de toma de muestras que incluye una SSP que es autosuspensible con sangre total y tiene una densidad entre la densidad media de una fracción de PRP y la densidad media de una fracción no de PRP de sangre total.

40 Debería apreciarse que una fracción de PRP podría tener cualquier concentración plaquetaria adecuada que sea mayor que la concentración plaquetaria de una muestra de sangre total de la que es obtenida o separada. Por ejemplo, una fracción de PRP podría comprender una concentración plaquetaria de al menos el 150%, al menos el 200%, al menos el 250% o aún mayor de la concentración plaquetaria de la muestra de la que es obtenida. Visto desde una perspectiva diferente, una fracción de PRP podría comprender una concentración plaquetaria entre el 180% y el 260% o una concentración plaquetaria entre el 200% y el 250% de una concentración plaquetaria de la muestra de la que es obtenida.

45 El método 800 incluye una etapa de centrifugación de una muestra de sangre total en un tubo de toma de muestras que incluye una SSP y con un primer protocolo de centrifugación, según se muestra en la etapa 810. La centrifugación con el primer protocolo puede hacer que la SSP fluya entre la fracción de PRP y la fracción no de PRP, preferentemente sin activación sustancial de plaquetas, según se muestra en la etapa 812.

50 El método 800 también incluye una etapa de exposición del tubo de toma de muestras, después de la centrifugación, a una energía UV durante un periodo no inferior a diez minutos para polimerizar la SSP y formar una barrera sólida, según se muestra en la etapa 820. La SSP de la barrera sólida tendrá un peso molecular medio que es mayor que el peso molecular medio de la SSP cuando es autosuspensible con la muestra de sangre total, según se muestra en la etapa 822.

55 El método 800 incluye, además, una etapa de homogeneización de la fracción de PRP en presencia de la barrera sólida para formar una fracción de PRP sustancialmente homogénea, de modo que las diferentes partes alícuotas

tomadas de la misma tengan recuentos plaquetarios que se encuentre dentro de un coeficiente de variación del método de recuento celular usado.

Los métodos descritos en la presente memoria permiten ventajosamente a un usuario separar fracciones de diferentes densidades de una muestra (por ejemplo, sangre) incluida en un tubo de toma de muestras con una SSP. La barrera sólida permite tanto la homogeneidad como la reproducibilidad, y el solicitante ha descubierto que podrían lograrse ventajas adicionales proporcionando un adaptador tal que los tubos en los que se separan las fracciones nunca precisen ser abiertos.

Las **Figuras 9A-9C** ilustran un dispositivo 900 de toma de muestras y u adaptador 950 que puede ser usado con el dispositivo de toma de muestras para permitir un procesamiento cerrado mientras se mantiene la esterilidad en múltiples usos de un líquido contenido en el mismo, resultando en un menor riesgo de contaminación. Debería apreciarse que el adaptador 950 podría ser usado no solo con aplicaciones de PRP, sino con cualquier otro líquido (por ejemplo, suero separado de una muestra de sangre total, plasma separado de una muestra de sangre total, etc.) que sea procesado en un dispositivo de toma de muestras (por ejemplo, un tubo de toma de muestras o cualquier otro recipiente adecuado).

El dispositivo 900 de toma de muestras incluye una porción 930 de tubo y una porción 920 de tapón de tubo que cooperan para bloquear o sellar un líquido 910 (aquí, una fracción de PRP), y, opcionalmente, una SSP solidificada y una fracción no de PRP, de un entorno externo del tubo de toma de muestras. La porción 920 de tapón de tubo incluye un material duro 922 (por ejemplo, un plástico) que rodea un caucho u otro material 925 que es penetrable por la aguja 960 del adaptador 950.

La aguja 960 está dimensionada para perforar al menos una porción de la porción 920 de tapón de tubo y para hacer contacto con el líquido 910 dentro del tubo. La aguja 960 está acoplada con un dosificador 970 de líquidos que está configurado como un cuentagotas ocular y situado fuera del dispositivo de toma de muestras cuando la aguja esté al menos parcialmente en el tubo. El dosificador 970 de líquidos comprende o está acoplado con un mecanismo 980 (por ejemplo, una pera, una válvula, etc.) que permite una dosificación estéril, controlada, gota a gota, del líquido del dispositivo de toma de muestras.

Según se usa en la presente memoria, y a no ser que el contexto dicte algo distinto, se pretende que la expresión "acoplado con" incluya tanto el acoplamiento directo (en el que dos elementos están acoplados entre sí haciendo contacto mutuo) como el acoplamiento indirecto (en el que hay situado al menos un elemento adicional entre los dos elementos). Por lo tanto, las expresiones "acoplado a" y "acoplado con" son usadas de manera sinónima.

Un dosificador de líquidos que esté configurado como un cuentagotas ocular puede comprender un tubito y una pera de vacío. El cuentagotas ocular puede estar configurado para extraer líquido 910 desde un primer extremo (por ejemplo, la aguja 960), y soltar o distribuir el líquido 910 desde un segundo extremo (por ejemplo, la punta del dosificador 970 de líquidos) una sola gota cada vez. En algunas realizaciones, suero fisiológico u otro(s) líquido(s) pueden ser inyectados o puestos de otra manera en el dispositivo de toma de muestras con el líquido 910 antes de perforar el tapón 920 del tubo con la aguja 960. El PRP, con o sin suero fisiológico, podría ser usado para tratar o prevenir el síndrome de ojo seco u otras afecciones oculares. Debería apreciarse que un cuentagotas ocular es un dispositivo que está configurado para contener un líquido y distribuir el líquido directamente a un ojo de un usuario de manera controlada, gota a gota.

Un ejemplo alternativo de un dosificador de líquidos contemplado es una aguja, que puede estar acoplada a una jeringa para aplicaciones inyectables.

Debería resultar evidente para los expertos en la técnica que son posibles muchas modificaciones adicionales, además de las ya descritas sin apartarse de los conceptos inventivos de la presente memoria. Por lo tanto, no ha de restringirse el contenido de la invención, salvo en el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Además, al interpretar tanto la memoria como las reivindicaciones, todos los términos deberían ser interpretados de la manera más amplia posible coherente con el contexto. En particular, debería interpretarse que los términos "comprende" y "comprendiendo" se refieren a elementos, componentes o etapas de manera no excluyente, indicando que los elementos, componentes o etapas referidos pueden estar presentes, o ser utilizados o combinados con otros elementos, componentes o etapas que no son objeto de referencia expresa. Cuando las reivindicaciones de la memoria se refieren a al menos un elemento de algo seleccionado de un grupo constituido por A, B, C ... y N, debería interpretarse que el texto requiere únicamente un elemento del grupo, no A más N, o B más N, etc.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método de separación de una fracción de PRP de una muestra de sangre total en un tubo de toma de muestras que incluye una sustancia separadora polimerizable, en el que la sustancia separadora polimerizable es autosuspensible con la sangre total, tiene un primer peso molecular medio, y tiene una densidad entre la densidad media de una fracción de PRP y la densidad media de una fracción no de PRP, en el que la sustancia separadora comprende un oligómero, un fotoiniciador y un estabilizante, comprendiendo el método:
- centrifugar la muestra de sangre total en el tubo de toma de muestras que incluye la sustancia separadora polimerizable durante un periodo entre uno y treinta minutos a entre 500 y 5000 RPM;
- 10 haciendo la centrifugación que la sustancia separadora polimerizable fluya entre la fracción de PRP y la fracción no de PRP sin activación sustancial de plaquetas en la fracción de PRP, siendo medible la activación sustancial en función de la capacidad de las plaquetas en la fracción de PRP de agregarse a al menos uno de ristocetina y colágeno;
- 15 endurecer la sustancia separadora, mediante exposición a energía UV durante un periodo no inferior a diez minutos, para formar una barrera sólida, teniendo la sustancia separadora polimerizable de la barrera sólida un segundo peso molecular medio que es mayor que el primer peso molecular medio, siendo la barrera sólida, después de la exposición a la energía UV, estacionaria con respecto al tubo de toma de muestras y en una posición intermedia debajo de la fracción de PRP y encima de la fracción no de PRP que permite la extracción de al menos el 95% de la fracción de PRP del tubo de toma de muestras; y
- 20 extraer la fracción de PRP del tubo de toma de muestras, en un proceso cerrado que mantiene la esterilidad de la fracción de PRP, a un dosificador de líquidos usando una aguja de transferencia que pone en contacto simultáneamente la fracción de PRP y un primer extremo del dosificador de líquidos, comprendiendo el dosificador de líquidos un segundo extremo distinto del primer extremo, estando configurado el segundo extremo para distribuir la fracción de PRP.
- 25 **2.** El método de la reivindicación 1 en el que la barrera sólida permite, además, la extracción del 100% de la fracción de PRP del tubo de toma de muestras.
- 3.** El método de la reivindicación 1 que, además, comprende al menos uno de remover y agitar la fracción de PRP en el tubo de toma de muestras al menos un día después de la etapa de endurecimiento de la sustancia separadora, sin desprender la barrera sólida.
- 30 **4.** El método de la reivindicación 1 en el que la centrifugación comprende centrifugar la muestra de sangre total en el tubo de toma de muestras que incluye la sustancia separadora polimerizable entre 5 y 20 minutos a entre 700 y 3600 RPM.
- 5.** El método de la reivindicación 1 en el que la centrifugación comprende centrifugar la muestra de sangre total en el tubo de toma de muestras que incluye la sustancia separadora polimerizable a temperatura ambiente.
- 6.** El método de la reivindicación 5 en el que la sustancia separadora comprende, además, un antioxidante.
- 35 **7.** El método de la reivindicación 1 en el que el fotoiniciador está presente a una concentración inferior al 5%, y en el que el estabilizante está presente a una concentración inferior al 0,5% en peso.
- 8.** El método de la reivindicación 1 en el que el dosificador de líquidos es un cuentagotas ocular configurado para distribuir la fracción de PRP de manera estéril, controlada y gota a gota.

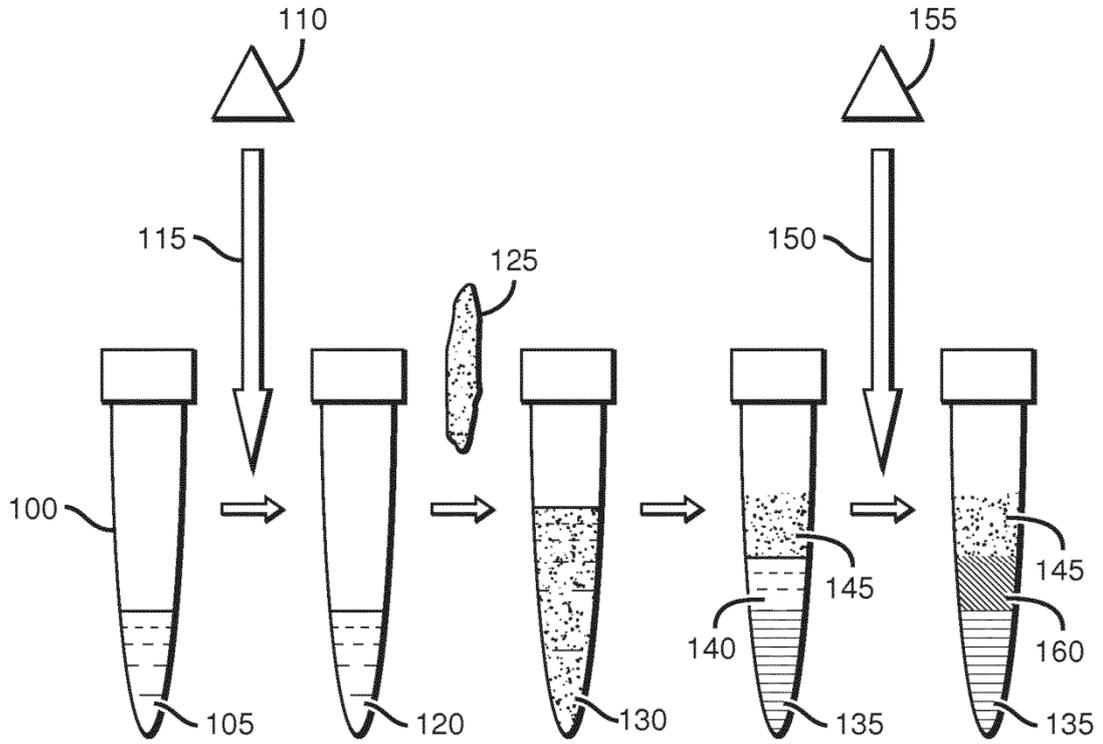
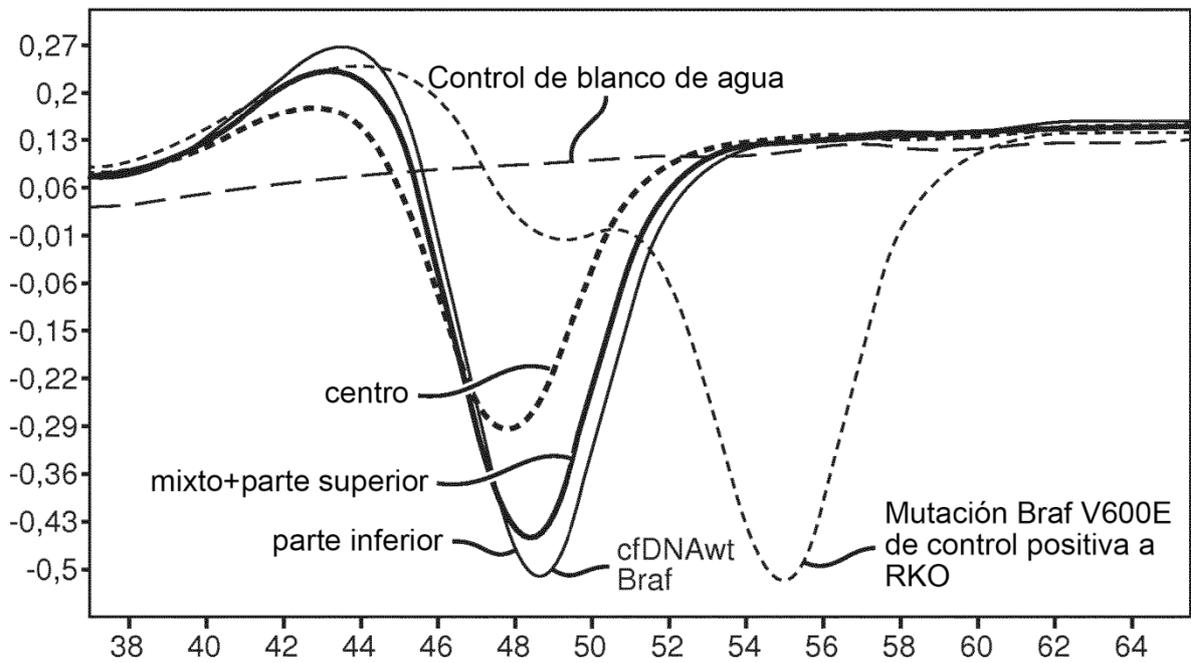


FIG. 1

FIG. 4



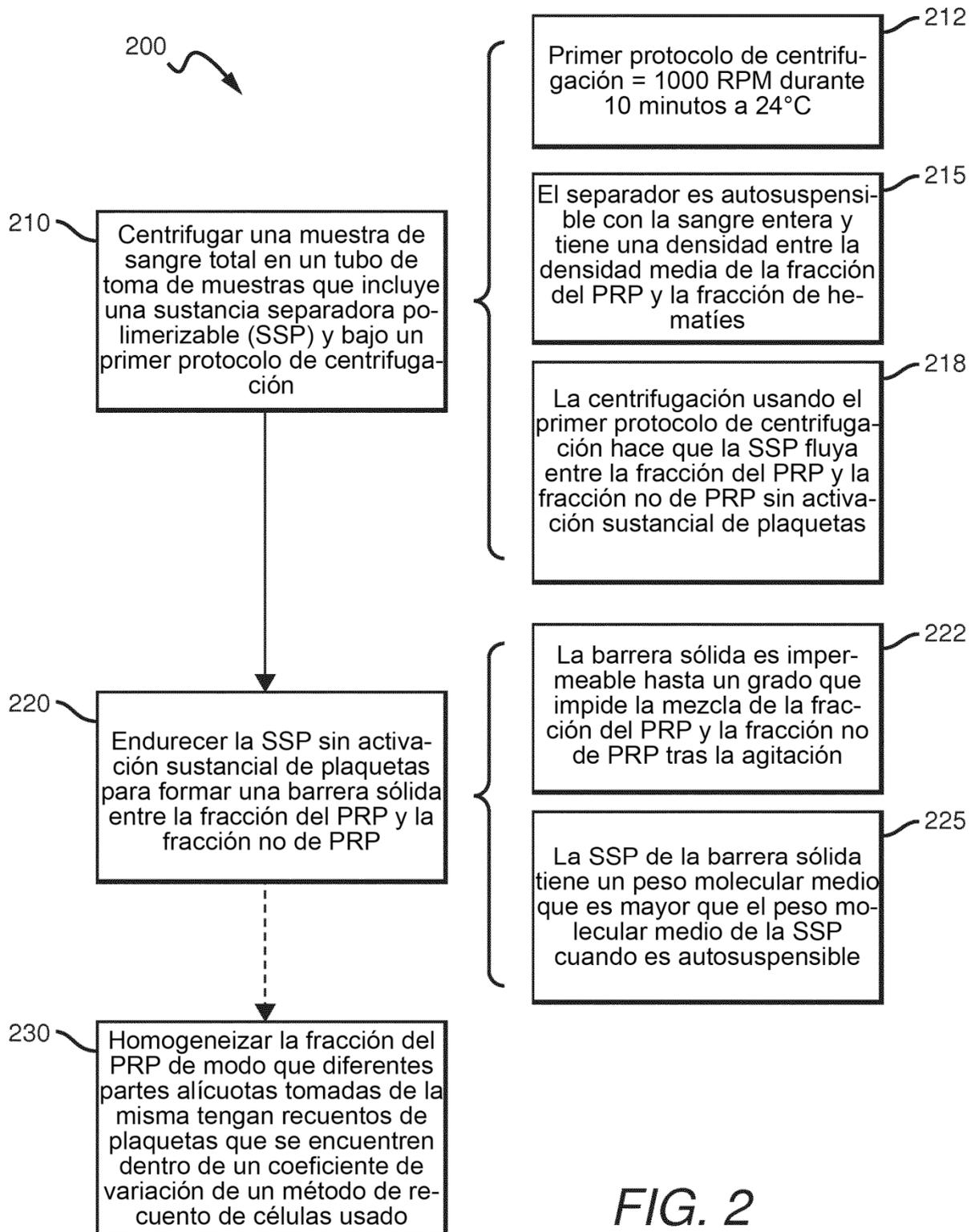


FIG. 2

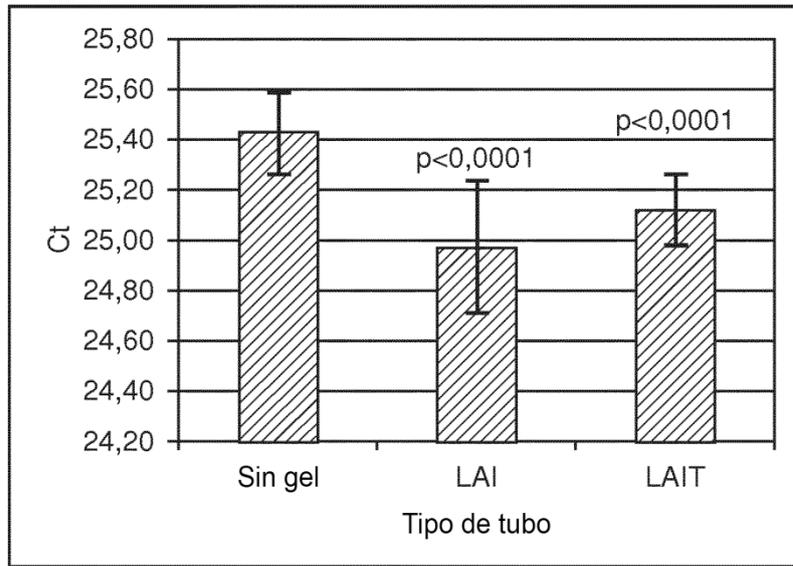


FIG. 3

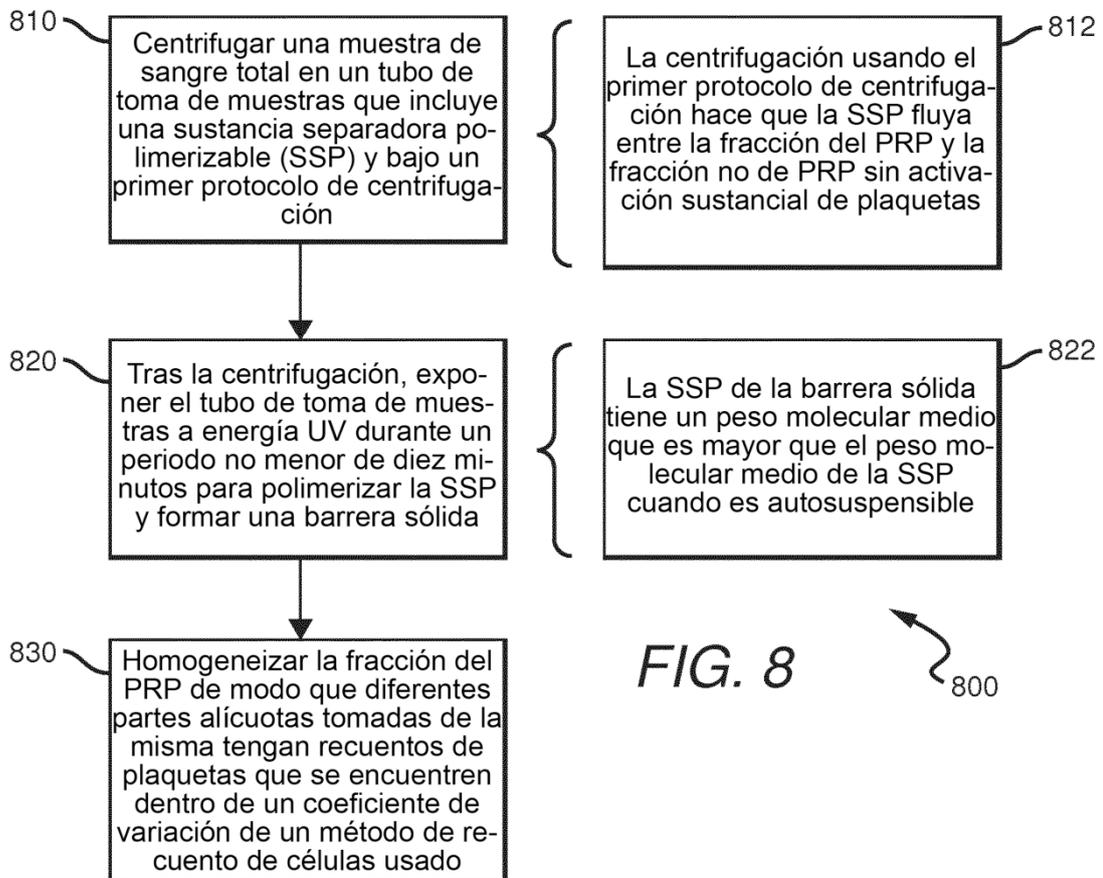


FIG. 8

800

ID de ensayo: Documento de fusión: 09-05-2014

Canal 1 Traza 1 ——— Nombre: Kim, J. ID : Lab : Fecha: 9/5/2014 Hora: 3:05:40 PM Hora de extracción de la sangre:	Canal 2 Traza 3 ----- Nombre: LAI, ID : Lab : Fecha: 9/5/2014 Hora: 3:41:02 PM Hora de extracción de la sangre:
--	---

Canal 3 Traza 5 ——— Nombre: LAIE, ID : Lab : Fecha: 9/5/2014 Hora: 3:27:03 PM Hora de extracción de la sangre:
--

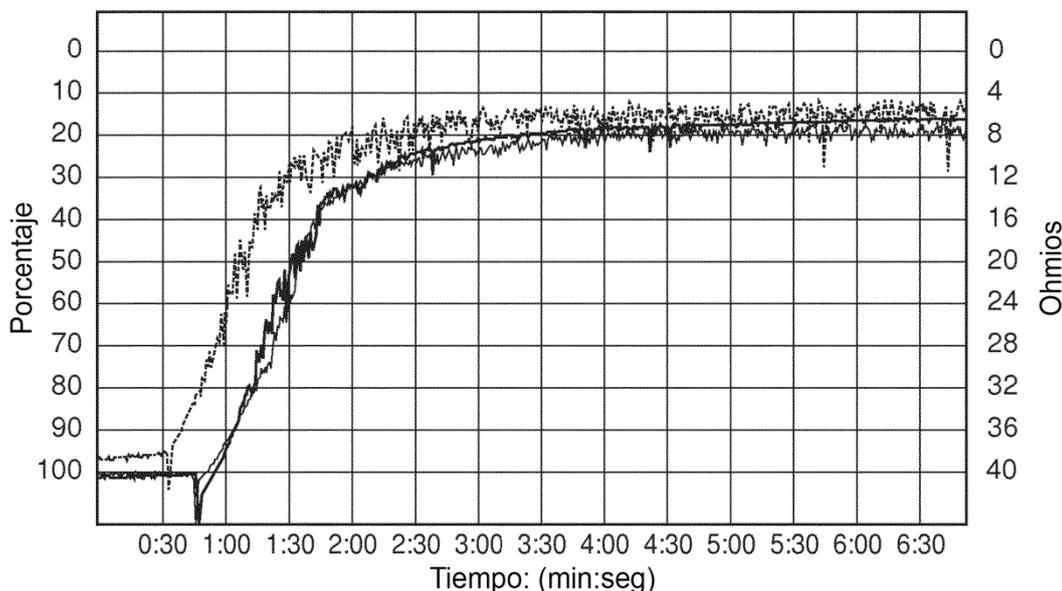
FIG. 5

	Canal 1		Canal 2		Canal 3	
	Traza		Traza		Traza	
	1	2	3	4	5	6
Instrumento	Imp	N/D	Imp	N/D	Imp	N/D
Reactivo	Ristocetina 1,25 mg/mL		Ristocetina 1,25 mg/mL		Ristocetina 1,25 mg/mL	
Agitador	1200		1200		1200	
Ganancia	20/5		20/5		20/5	
Amplitud	0 ohmios		0 ohmios		0 ohmios	
Pendiente	6		16		9	

Comentarios

Documento de fusión: 09-05-2014

Traza 1 Traza 2 Traza 3 Traza 4 Traza 5 Traza 6 Traza 7 Traza 8



Canal 1	Canal 2	Canal 3
Kim	LAI	LAIE
Ristocetina 1,25 mg/mL	Ristocetina 1,25 mg/mL	Ristocetina 1,25 mg/mL
Ganancia 20/5	Ganancia 20/5	Ganancia 20/5
MáxA = 0 ohmios	MáxA = 0 ohmios	MáxA = 0 ohmios
Pend = 6	Pend = 16	Pend = 9

ID de ensayo: Documento de fusión: 09-05-2014

Canal 1 Traza 1 — Nombre: Kim, J. ID : Lab : Fecha: 9/5/2014 Hora: 3:05:40 PM Hora de extracción de la sangre:	Canal 2 Traza 3 Nombre: LAI, ID : Lab : Fecha: 9/5/2014 Hora: 3:15:11 PM Hora de extracción de la sangre:
--	---

Canal 3 Traza 5 — Nombre: LAIE, ID : Lab : Fecha: 9/5/2014 Hora: 3:27:03 PM Hora de extracción de la sangre:
--

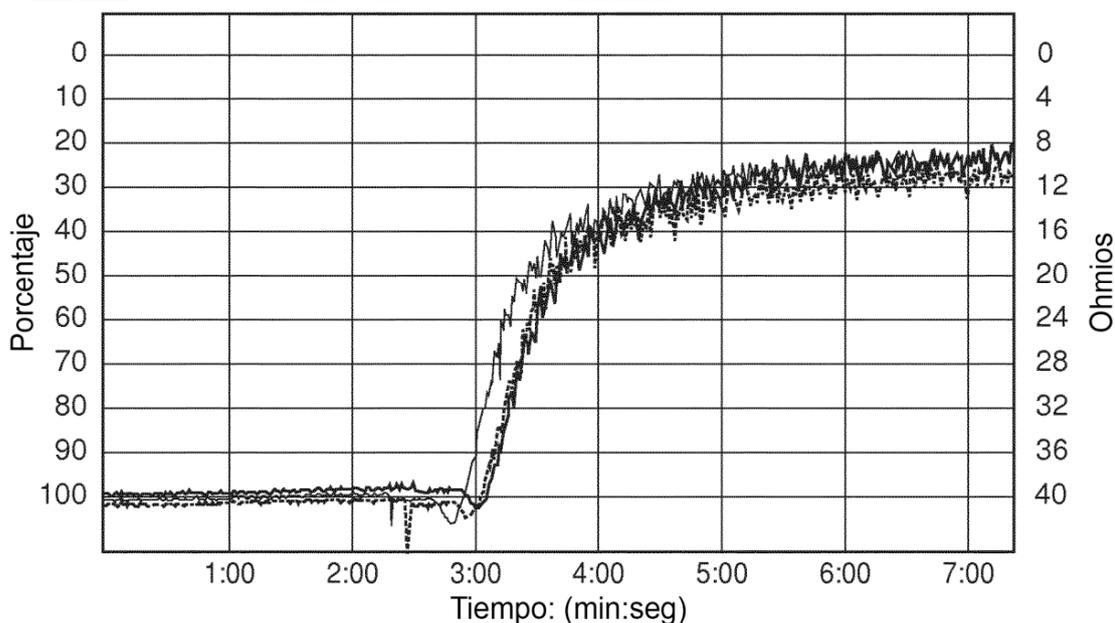
FIG. 6

	Canal 1		Canal 2		Canal 3	
	Traza		Traza		Traza	
	1	2	3	4	5	6
Instrumento	Imp	N/D	Imp	N/D	Imp	N/D
Reactivo	Colágeno 2 ug/mL		Colágeno 2 ug/mL		Colágeno 2 ug/mL	
Agitador	1200		1200		1200	
Ganancia	20/5		20/5		20/5	
Amplitud	0 ohmios		0 ohmios		0 ohmios	
Pendiente	9		10		8	

Comentarios

Documento de fusión: 09-05-2014

Traza 1 Traza 2 Traza 3 Traza 4 Traza 5 Traza 6 Traza 7 Traza 8



Canal 1	Canal 2	Canal 3
Kim	LAI	LAIE
Colágeno 2 ug/mL	Colágeno 2 ug/mL	Colágeno 2 ug/mL
Ganancia 20/5	Ganancia 20/5	Ganancia 20/5
MáxA = 2 ohmios	MáxA = 1 ohmios	MáxA = 2 ohmios
Pend = 9	Pend = 10	Pend = 8

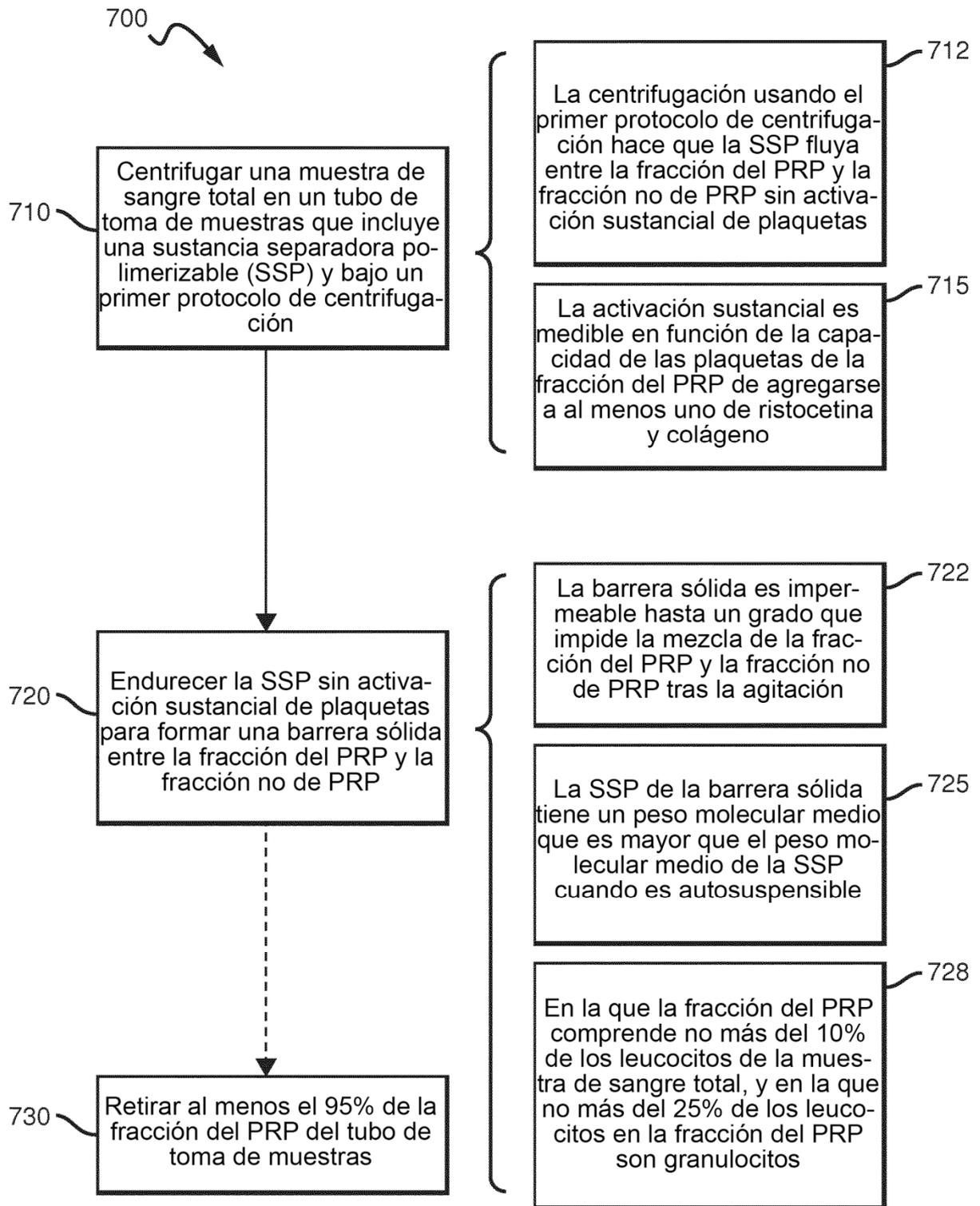


FIG. 7

