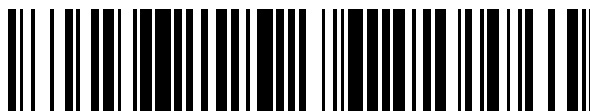


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 755**

51 Int. Cl.:

A61L 27/20	(2006.01) A61K 31/722	(2006.01)
A61L 27/36	(2006.01) A61K 31/728	(2006.01)
A61L 27/54	(2006.01) A61K 45/06	(2006.01)
A61L 31/00	(2006.01)	
A61L 31/04	(2006.01)	
A61L 31/16	(2006.01)	
A61L 24/00	(2006.01)	
A61L 24/08	(2006.01)	
B65B 3/00	(2006.01)	
B65B 3/02	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2012 PCT/IB2012/055974**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2013 WO13061309**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2012 E 12805468 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 2771241**

54 Título: **Nuevos dispositivo médico y composición para ingeniería tisular basados en A-PRP, máquinas y procesos de fabricación**

30 Prioridad:

27.10.2011 GB 201118586

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.11.2020

73 Titular/es:

**REGEN LAB SA (100.0%)
En Budron B2
1052 Le Mont-sur-Lausanne, CH**

72 Inventor/es:

TURZI, ANTOINE

74 Agente/Representante:

DÍAZ DE BUSTAMANTE TERMINEL, Isidro

ES 2 791 755 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

Nuevos dispositivo médico y composición para ingeniería tisular basados en A-PRP, máquinas y procesos de fabricación

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la regeneración tisular. Se refiere, más particularmente, a nuevas composiciones o dispositivos médicos que comprenden o están destinados a la preparación de PRP, A-PRP, ácido hialurónico y/o quitosano, solos o en combinación, máquinas y procesos de fabricación de los mismos.

Antecedentes de la invención

La importancia de los materiales biológicos autólogos en el proceso de cicatrización ha sido bien documentada. Lo más importante, 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 es garantizar la hemostasia y sellar la herida: (1) fibrina, que se deriva de la separación de fibrinógeno plasmático en dos hebras a través de la acción de la trombina y (2) las membranas activadas de las plaquetas. El proceso de cicatrización de heridas generalmente se presenta como la sucesión de una fase de coagulación, un proceso inflamatorio y un proceso de regeneración. La fase de coagulación (coagulación sanguínea o formación de coágulos) es un proceso complejo por el cual una pared de vasos sanguíneo dañada es cubierta por un coágulo de fibrina para detener la hemorragia y la reparación del vaso dañado se inicia mediante la liberación en grandes cantidades de citocinas y factores de crecimiento a partir de gránulos alfa plaquetarios. La formación de coágulos sanguíneos (formados en condiciones fisiológicas por fibrina, plaquetas y glóbulos rojos, entre otros componentes sanguíneos) es un fenómeno natural que resulta del trauma tisular y su papel en el proceso de cicatrización de heridas, así como en la unión de fracturas óseas, es bien conocido.

La coagulación de la sangre es el resultado de la interacción compleja de varios 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 de forma reversible. La proteína trombina, formada durante la activación de la vía de coagulación genera fibrillas reticuladas insolubles de la proteína fibrina y hace que las plaquetas se agreguen de forma irreversible. El coágulo resultante de plaquetas y fibrina es una barrera eficaz contra la pérdida de sangre del sistema vascular y también sirve como almacén para la posterior reparación del revestimiento del vaso sanguíneo.

El plasma rico en plaquetas (PRP) se puede definir 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 solo consiste en un concentrado de plaquetas, sino que también contiene factores de crecimiento (tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas: PDGF, el factor de crecimiento endotelial vascular: VEGF, el factor de crecimiento transformante: TGF y el factor de crecimiento epidérmico: EGF, etc.) que son secretados activamente por plaquetas y se sabe que tienen un papel fundamental en el proceso de iniciación de la cicatrización de heridas.

Se han desarrollado diversas técnicas de preparación de PRP por procesos de centrifugación. Sin embargo, debido a la sensibilidad de las células plaquetarias y la variabilidad de la eficacia de los métodos de separación de las plaquetas de los glóbulos rojos, existe una gran variabilidad entre los métodos usados para la preparación de concentrados de plaquetas. También hay una pérdida importante de tejido biológico valioso de los pacientes cuando PRP se prepara con viejos dispositivos empíricos o semiautomáticos. Además, para obtener concentrados de plaquetas, se requiere el uso de kits relativamente complejos y maquinaria costosa dedicada y la participación igualmente costosa de técnicos especializados.

Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar un tubo de hematología con estándares de calidad farmacéutica, que permita una extracción segura de sangre, el agotamiento de todos los eritrocitos y la preparación de células plasmáticas con altos rendimientos de plaquetas y leucocitos, fácil de usar y rentable.

El documento WO2011/110948 desvela la preparación de tubos que comprenden ácido hialurónico, plasma enriquecido, gel selector de células y citrato de sodio para la preparación de composiciones cicatrizantes de heridas.

Además, la preparación de células en vista de la regeneración celular o tisular para su uso en trasplantes, regeneración postoperatoria o con fines estéticos se enfrenta al problema de conservación a largo plazo de células y tejidos por crioconservación. Esta técnica ha mostrado graves inconvenientes y problemas tales como la formación de cristales, problemas osmóticos, agregación, inhibición de la capacidad de síntesis de proteínas, expresión de proteínas de estrés en respuesta al estrés térmico. Por lo tanto, se sabe que la crioconservación de tejidos o células altera la viabilidad y estabilidad celulares. Algunos de los efectos secundarios de la crioconservación pueden

limitarse mediante el uso de agentes anticongelantes tales como DMSO o glicerol u otros crioconservantes, pero la concentración de estos agentes debe adaptarse para limitar su toxicidad y efectos secundarios. Posteriormente, las células se lavan y se dispensan con PBS u otra preparación biológica, la tasa de supervivencia de las células publicada en la bibliografía es baja. En cualquier caso, esas células no pueden producir un PRP eficiente, porque el facultativo dispensa células frescas y viables en un plasma lleno de proteína nutritiva para la expansión celular.

Los procesos de fabricación manual actuales de los kits de PRP son exigentes, requieren mucho tiempo y requieren la intervención de diversos recursos humanos. Además, debido a la exposición de muchas fuentes de contaminación durante el proceso de fabricación, la FDA de los EE. UU. ha establecido claramente como estándar la obligación de garantizar un control de carga biológica bacteriana para la calidad de los dispositivos médicos que estarán "libres de pirógenos". Por lo tanto, existía una necesidad en el desarrollo de nuevas máquinas para tubos hematológicos para la fabricación de estándares de calidad farmacéutica y con resultados biológicos constantes, predecibles y fiables.

Además, dichas máquinas nuevas para procesos de fabricación automatizados de kits de PRP deberán ser capaces de proporcionar un resultado de control de esterilidad y aumentar la calidad de las preparaciones de PRP por parte de los facultativos y el entorno médico.

Además del A-PRP (plasma autólogo rico en plaquetas) o la preparación autóloga de células frescas, existe una necesidad de un soporte mecánico y biológico para la migración y expansión, y eventualmente diferenciación, de las células. Las células y los factores de crecimiento necesitan una matriz provisional para mejorar su expansión biológica.

Resumen de la invención

La invención se refiere al campo de la regeneración de tejidos. Se refiere, más particularmente, a nuevos procesos de fabricación, tubos y dispositivos para trombina, concentrado de plaquetas y preparaciones, composiciones, composiciones de PRP, composiciones de A-PRP cicatrizantes de heridas y usos de las mismas. La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

En un aspecto, la divulgación proporciona una máquina de llenado para la preparación automatizada de tubos de hematología caracterizada por que la máquina de llenado comprende:

- a. un aparato para mover tubos de hematología vacíos o prellenados uno por uno,
- b. al menos un inyector para inyectar en los tubos de hematología:
 - i. un anticoagulante,
 - ii. un polímero y un anticoagulante,
 - iii. ácido hialurónico y/o quitosano y un anticoagulante, o
 - iv. ácido hialurónico y/o quitosano, un polímero y un anticoagulante
- c. opcionalmente al menos un aparato para vacío controlado y taponamiento de los tubos de hematología.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una máquina de sellado para el envasado automatizado en doble blíster de un dispositivo médico, kit de PRP o PRP autólogo (A-PRP) con accesorios, caracterizada por que la máquina de sellado comprende 2 bandas transportadoras paralelas.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de fabricación automática de tubos de hematología por medio de una máquina de llenado que comprende:

- a. llenar los tubos hematológicos con:
 - i. un anticoagulante,
 - ii. un polímero y un anticoagulante,
 - iii. ácido hialurónico y/o quitosano y un anticoagulante, o
 - iv. ácido hialurónico y/o quitosano, un polímero y un anticoagulante,
- b. opcionalmente permitir el vacío controlado y el taponamiento de los tubos de hematología.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para fabricar automáticamente un kit o dispositivo médico de PRP o A-PRP por medio de una máquina de sellado para el envasado en doble blíster de tubos hematológicos con accesorios, que comprende:

- a. moldeado, llenado, sellado y corte de un primer blíster que comprende los tubos hematológicos con

accesorios,

b. moldeado, sellado y corte de un segundo blíster sobre el primer blíster.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de fabricación automática de un kit o dispositivo médico de PRP o A-PRP, que comprende:

5 a. mover tubos de hematología vacíos o prellenados uno por uno,

b. llenar los tubos hematológicos con:

i. un anticoagulante,

ii. un polímero y un anticoagulante,

iii. ácido hialurónico y/o quitosano y un anticoagulante, o

10 iv. ácido hialurónico y/o quitosano, un polímero y un anticoagulante,

c. opcionalmente permitir el vacío controlado y el taponamiento de los tubos de hematología,

d. moldeado, llenado, sellado y corte de un primer blíster que comprende los tubos hematológicos con accesorios, y

e. moldeado, sellado y corte de un segundo blíster sobre el primer blíster.

15 En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende ácido hialurónico de aproximadamente 1400 KDa a aproximadamente 1600 KDa a una concentración de aproximadamente el 1,8 % a aproximadamente el 2,2 % y opcionalmente un concentrado de plaquetas, preferentemente plasma rico en plaquetas.

20 En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende ácido hialurónico de aproximadamente 4000 KDa o por encima de 4000 KDa a de aproximadamente el 1,8 % a aproximadamente el 2,2 % de concentración, más preferentemente de aproximadamente 4000 KDa a aproximadamente el 2 % de concentración.

La invención proporciona una composición que comprende al menos un ácido hialurónico de bajo peso molecular y al menos un ácido hialurónico de alto peso molecular, caracterizada por que:

- dicho ácido hialurónico de bajo peso molecular es inferior a 600 KDa o aproximadamente 600 KDa, y

25 - dicho ácido hialurónico de alto peso molecular es de aproximadamente 4000 KDa o por encima de 4000 KDa (aproximadamente al menos 4000 kDa), en el que la relación de ácido hialurónico de bajo peso molecular respecto a ácido hialurónico de alto peso molecular es 2:3 y en el que la concentración total es del 2,2 % al 2,8 %, y además comprende: i) un anticoagulante y/o un gel tixotrópico.

30 En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición cicatrizante de heridas, composición cicatrizante de tejidos, composición celular, composición, composición de PRP, composición de A-PRP, suero de trombina o agente hemostático obtenido usando un tubo de hematología, kit de PRP, kit o dispositivo médico de A-PRP de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, obtenido mediante el uso de una máquina de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores u obtenido mediante un método de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores para su uso en odontología, ortopedia, medicina deportiva, cosmética, estética, cirugía, oftalmología y/o mesoterapia.

Descripción de las figuras

35 Los dibujos adjuntos, que se incorporan en el presente documento y forman parte de la memoria descriptiva, ilustran realizaciones preferidas de la presente invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

40 Figura 1. Vista esquemática de la máquina de llenado. La figura 1-A representa una bomba peristáltica (bomba de pistón) con un primer inyector que permite la inyección de un polímero en el tubo de hematología. La figura 1-B representa un tanque de prellenado presurizado para el gel o polímero a inyectar. La figura 1-C representa el segundo inyector que permite la inyección de un anticoagulante (por ejemplo, citrato) en los tubos de hematología. La figura 1-D representa una copa de vibración o 2 componentes con forma de campana (estación de recogida y colocación con vibrador) que permite un vacío controlado y el taponamiento de los tubos.

45 Figura 2. Vista detallada de la máquina de llenado. La máquina de llenado consta de discos vacíos (figura 2-1), una mesa giratoria de entrada en sentido antihorario (CCW) (figura 2-2), ubicación donde se insertan los discos con tubos y entran en una rueda giratoria CCW (figura 2-3), una estación de dosis caliente (figura 2-4), una manguera caliente (figura 2-5), un tanque presurizado (figura 2-6), una bomba peristáltica (figura 2-7), una segunda estación de dosificación (figura 2-8), una estación de recogida y colocación (figura 2-9), un vibrador

(figura 2-10).

Figura 3. Vista detallada de la máquina de sellado. La máquina de sellado comprende una película de banda inferior (figura 3-1), una estación de precalentamiento y formación (figura 3-2), una estación de sellado (figura 3-3), un sistema de cámara (figura 3-4), una película de banda superior (figura 3-5), una impresora (figura 3-6), un panel operativo (figura 3-7), una estación de troquelado (figura 3-8), una bobinadora de banda sobrante (figura 3-9), una cinta transportadora de descarga (figura 3-10) y una unidad de transferencia (figura 3-11).

Figura 4. Volumen en ml de sangre extraída y de PRP o Mezcla de PRP-HA obtenido para BCT solo y los tres subconjuntos BCT-HA A, BCT-HA B y BCT-HA C.

Figura 5. pH medio de sangre y PRP a tiempo T = 0 y tiempo T = 4 horas para sangre completa, Regen BCT PRP y Regen BCT-Mezcla de HA.

Figura 6. Concentración de glóbulos rojos en sangre y PRP ($10^6/\text{mm}^3$) a tiempo T = 0 y tiempo T = 4 horas para sangre completa, Regen BCT PRP, Regen BCT-HA PRP y Regen BCT-Mezcla de HA.

Figura 7. Concentración de glóbulos blancos (WBC) en sangre y PRP ($10^3/\text{mm}^3$) a tiempo T = 0 y tiempo T = 4 horas para sangre completa, Regen BCT PRP, Regen BCT-HA PRP y Regen BCT-Mezcla de HA.

Figura 8. Recuperación de glóbulos blancos (WBC) en % a tiempo T = 0 y tiempo T = 4 horas para Regen BCT PRP y Regen BCT-HA PRP.

Figura 9. Distribución de glóbulos blancos (WBC) para los subconjuntos de granulocitos (GRA) y monocitos (MNC) en sangre y PRP a tiempo T = 0 y tiempo T = 4 horas para sangre completa, Regen BCT PRP y Regen BCT-HA PRP.

Figura 10. Recuperación de subconjuntos de glóbulos blancos (WBC) (granulocitos (GRA) y monocitos (MNC)) en % a tiempo T = 0 para Regen BCT PRP y Regen BCT-HA PRP.

Figura 11. Concentración de plaquetas (PLT) en sangre y PRP ($10^3/\text{mm}^3$) a tiempo T = 0 y tiempo T = 4 horas para sangre completa, Regen BCT PRP, Regen BCT-HA PRP y Regen BCT-Mezcla de HA.

Figura 12. Factor de concentración de plaquetas a tiempo T = 0 y tiempo T = 4 horas para Regen BCT PRP, Regen BCT-HA PRP y Regen BCT-Mezcla de HA.

Figura 13. Recuperación de plaquetas en % a tiempo T = 0 y tiempo T = 4 horas para Regen BCT PRP y Regen BCT-HA PRP.

Figura 14. Expresión de CD62P en plaquetas con o sin ADP a tiempo T = 0 y tiempo T = 4 horas para Regen BCT PRP y Regen BCT-Mezcla de HA.

Figura 15. Respuesta al estrés hipotónico (diferencia en absorbancia a 405 nm) a tiempo T = 0 y tiempo T = 4 horas para Regen BCT PRP y Regen BCT-Mezcla de HA.

Figura 16. Agregación plaquetaria en respuesta al colágeno (unidades de agregación AU) a tiempo T = 0 y tiempo T = 4 horas para Regen BCT PRP y Regen BCT-HA PRP.

Figura 17. Viscosidad en mPa.S para diversos ácidos hialurónicos (HA1 a HA4) que difieren en peso molecular y para diversas concentraciones (2 %, 3 % o 4 %).

Figura 18. Viscosidad de diversos ácidos hialurónicos (HA1 a HA4, 500 KDa y 4000 KDa) representada frente a la concentración (1 % a 4 %).

Figura 19. Liberación en pg/ml de PDGF-AA, EGF y PDGF-BB respectivamente en el día 0 (T0) para una preparación de PRP solo (BCT T0) frente a una combinación de PRP y HA (BCT + IALUR T0).

Figura 20. Liberación en pg/ml de PDGF-BB para dos casos en el día 0 (T0), día 3 (T3) y día 5 (T5) para una preparación de PRP solo (BCT) frente a una combinación de PRP y HA (BCT HA).

Figura 21. Liberación en pg/ml de EGF para tres pacientes diferentes (pacientes 1, 2 o 3) en el día 0 (T0), día 3 (T3), día 5 (T5), día 7 (T7) y día 10 (T10) para una preparación de PRP solo (BCT) en la figura 21-A frente a una combinación de PRP y HA (BCT HA) en la figura 21-B. Mediana de liberación en pg/ml de EGF en el día 0 (T0), día 3 (T3), día 5 (T5), día 7 (T7) y día 10 (T10) para una preparación de PRP solo (BCT) frente a una combinación de PRP y HA (BCT HA) en la figura 21-C.

Descripción detallada de la invención

Los siguientes párrafos proporcionan definiciones de los términos de acuerdo con la invención y están destinados a

aplicarse de manera uniforme en toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, a menos que una definición expresada de otra manera proporcione una definición más amplia.

La expresión "tixotrópico" significa un gel que se vuelve más fluido como resultado de la agitación o la presión, es decir, un gel cuya viscosidad es decreciente como resultado de la agitación o la presión. El término viscosidad se refiere a aquellas características del o de los materiales especificados que determinan el grado de gelificación, tales como por ejemplo la firmeza o dureza del material, el grado en que el material resiste el flujo como un fluido. Un gel tixotrópico de acuerdo con la invención que comprende un gel de poliéster o una mezcla de los mismos que es insoluble en agua y químicamente inerte a los constituyentes sanguíneos que puede usarse de acuerdo con la invención. Los geles tixotrópicos típicos se usan en la separación de células sanguíneas con fines de diagnóstico y proteómica. Un gel tixotrópico también se denomina en el presente documento un "gel selector de células". Se pueden usar otros geles en la presente divulgación.

La expresión "centro de atención" se refiere a todos los servicios prestados a los pacientes al pie de la cama. La expresión "accesorios de flebotomía" o "accesorios de venopunción" significa accesorios que permiten la punción de una vena con una aguja con el fin de extraer sangre.

Las expresiones alternativas para "cicatrizante de heridas" o "sellador de heridas" o "cicatrizante de tejidos" o "sellador de tejidos" o "composición de cicatrización de heridas" o "composición de cicatrización de tejidos" son "selladores bioadhesivos" o "pegamento de fibrina".

La expresión "cicatrizante de heridas" o "sellador de heridas" o "cicatrizante de tejidos" o "sellador de tejidos" o "composición de cicatrización de heridas" o "composición de cicatrización de tejidos" o "sellador bioadhesivo" o "pegamento de fibrina" significa un agente o una composición que es capaz de promover y/o aumentar la velocidad y/o calidad de la cicatrización de una herida. Los cicatrizantes o selladores de heridas son capaces de promover la regeneración de tejidos. La expresión "herida" significa cualquier tejido dañado, por ejemplo después de un trauma o cirugía. Las heridas en mamíferos incluyen, por ejemplo, úlceras de cama, úlceras, laceraciones y quemaduras, sitios de injerto (sitios donantes y receptores de injerto), fistulas, daños en el tejido periodontal, heridas diabéticas no cicatrizantes, consecuencias de traumas o cualquier acto quirúrgico. En su sentido general, la expresión pretende abarcar también los daños en la piel donde la superficie de la piel presenta algo de depresión sin necesariamente un corte en su superficie, tales como daños en los tejidos relacionados con la edad (por ejemplo, arrugas) y cicatrices como, por ejemplo, acné (especialmente después del tratamiento de dermoabrasión) o cicatrices de rubéola.

La expresión "PRP" significa un plasma rico en plaquetas, preferentemente de origen mamífero o de origen humano, más preferentemente autólogo, preparado por el proceso de la invención para sedimentar y eliminar eritrocitos y concentrar el plasma en leucocitos, trombocitos y proteínas de adhesión en comparación con la sangre completa nativa. La expresión "autólogo" o "autógeno" significa un método in vivo en el que se usa sangre, tejidos y/o células de un solo donante y en el que la sangre, tejidos y/o células extraídos de este donante están destinados para su uso en el mismo donante. A-PRP en el presente documento significa plasma autólogo rico en plaquetas. Por el contrario, los métodos "alógenos" usan sangre, tejidos 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, tales como, por ejemplo, la detección para asegurar que el donante sea biológica o inmunológicamente compatible con el paciente y la posible contaminación con hepatitis, VIH, prión, enfermedad de Creutzfeld-Jacob y similares. La expresión "activador de la coagulación" significa un agente, por ejemplo una enzima, que puede desencadenar o activar la coagulación de plasma y la agregación de plaquetas. Un activador de la coagulación comprende un activador de trombina y/o un activador de fibrinógeno y/o trombina y/o una trombina autóloga y/o un suero de trombina autóloga y/o cloruro de calcio y/o gluconato de calcio y/o sacarato de calcio. La coagulación se puede combinar para cambiar la rigidez de las composiciones.

La expresión "activador de trombina" significa un agente que es capaz de activar la trombina y desencadenar la coagulación. Los activadores de trombina típicos son ciertos factores secundarios tales como sodio o calcio. Al poner en práctica esta invención, la activación de la trombina se produce preferentemente en presencia de iones de calcio. Los iones de calcio generalmente se añaden al concentrado de plaquetas como una solución salina para proporcionar una concentración final generalmente de o aproximadamente 0,1 mg/ml de concentrado de plaquetas. Las sales de calcio adecuadas incluyen, sin limitación, CaCO_3 , CaSO_4 o CaCl_2 . Una sal de calcio preferida para su uso en la invención es el gluconato de calcio (CaGL). El CaGL está disponible como inyección de gel de calcio, USP al 10 % (Regen Lab, Suiza). La expresión "activador de fibrinógeno" significa un agente que puede activar la conversión de fibrinógeno en fibrina y desencadenar la formación del coágulo. Los activadores de fibrinógeno típicos 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 alógena o trombina humana recombinante, preferentemente trombina autóloga. Un activador de fibrinógeno puede ser una composición de trombina enriquecida tal como composiciones de trombina como se describen en el documento US 6.472.162 o un suero de trombina autóloga de acuerdo con la invención. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad o cantidades de los elementos constituyentes o la combinación de los mismos necesarios para mejorar la cicatrización de heridas tal como, por ejemplo, la reducción en el volumen o área de superficie de una herida, el aumento en la

cantidad de tejido de granulación u otro material biológico que facilite la colocación de colágeno, el crecimiento vascular, la proliferación de fibroblastos o la cicatrización general; se supone que todas las versiones de la invención descritas en el presente documento tienen la o las cantidades terapéuticamente eficaces de sustancias constituyentes, o combinaciones de las mismas. Por la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se entiende un ingrediente adicional farmacéuticamente aceptable, tal como estabilizantes, agentes antimicrobianos, tampones, adyuvantes, anestésicos, corticoides y similares. Por la expresión "vehículo cosméticamente aceptable" se entiende un ingrediente adicional cosméticamente aceptable, tal como estabilizantes, tampones, agentes colorantes, agentes aromatizantes, adyuvantes y similares.

La expresión "copolímero olefínico cíclico" (COC) o "polímero olefínico cíclico" (COP) significa un polímero amorfo, copolímero de etileno; COC; COP; copolímero olefínico cíclico; polímero olefínico cíclico; copolímero de etileno-norborneno. Los COP usan un solo tipo de monómero, mientras que los COC usan diferentes tipos de monómeros. La invención abarca copolímeros olefínicos cíclicos basados en diferentes tipos de monómeros cíclicos y métodos de polimerización. Los copolímeros o polímeros olefínicos cíclicos de la presente invención se pueden producir 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-dimetanonaftaleno con eteno, TOPAS de Ticona, APEL de Mitsui Chemical, o mediante polimerización por metátesis de apertura de anillo de diversos monómeros cíclicos seguida de hidrogenación (por ejemplo, ARTON de Japan Synthetic Rubber, Zeonex y Zeonor de Zeon Chemical).

La expresión "ácido hialurónico" (también llamado hialuronano o hialuronato) significa un glucosaminoglucano aniónico no sulfurado distribuido ampliamente por los tejidos conectivos, epiteliales y neurales. Es único entre los glucosaminoglucanos, ya que no está sulfurado, se forma en la membrana plasmática en lugar del Golgi, y puede ser muy grande, y su peso molecular a menudo alcanza el millón. Uno de los principales componentes de la matriz extracelular, el hialuronano contribuye significativamente a la proliferación y migración celular.

La expresión "quitosano" significa un polisacárido lineal compuesto de D-glucosamina con enlaces β -(1-4) distribuida al azar (unidad desacetilada) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada). El quitosano se produce 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 (% de DD) se puede determinar mediante espectroscopía de RMN, y el % de DD en quitosanos comerciales está en el intervalo del 60-100 %. En promedio, el peso molecular del quitosano producido comercialmente está entre 3800 y 20.000 daltons. Un método común para la síntesis de quitosano es la desacetilación de quitina usando hidróxido de sodio en exceso como reactivo y agua como disolvente. Esta vía de reacción, cuando se deja que se complete (desacetilación completa) produce hasta un 98 % de producto. El grupo amino en el quitosano tiene un valor de pKa de -6,5, lo que conduce a una protonación en solución ácida a neutra con una densidad de carga que depende del pH y el % de valor DA. Esto hace que el quitosano sea soluble en agua y un bioadhesivo que se une fácilmente a superficies cargadas negativamente, tales como las membranas mucosas. El quitosano mejora el transporte de fármacos polares a través de las superficies epiteliales, y es biocompatible y biodegradable.

BCT en el presente documento significa terapia de células sanguíneas o tubos de recogida de sangre.

En un aspecto, la divulgación proporciona una máquina de llenado para la preparación automatizada de tubos de hematología, caracterizada por que la máquina de llenado comprende:

a. al menos un inyector para inyectar en los tubos de hematología:

- i. un anticoagulante,
- ii. un polímero y un anticoagulante,
- iii. ácido hialurónico y/o quitosano y un anticoagulante, o
- iv. ácido hialurónico y/o quitosano, un polímero y un anticoagulante

b. opcionalmente al menos un aparato para vacío controlado y taponamiento de los tubos de hematología.

En un aspecto, la divulgación proporciona una máquina de llenado para la preparación automatizada de tubos de hematología, caracterizada por que la máquina de llenado comprende:

a. al menos un inyector para inyectar en los tubos de hematología:

- v. un anticoagulante,
- vi. un polímero y un anticoagulante,
- vii. ácido hialurónico y/o quitosano y un anticoagulante, o
- viii. ácido hialurónico y/o quitosano, un polímero y un anticoagulante

b. opcionalmente 2 componentes en forma de campana para vacío controlado y taponamiento de los tubos de hematología.

En un aspecto, la invención proporciona una máquina de llenado para la preparación automatizada de tubos de hematología, caracterizada por que la máquina de llenado comprende:

- 5 a. un aparato para mover tubos de hematología vacíos o prellenados uno por uno,
- b. al menos un inyector para inyectar en los tubos de hematología:
 - i. un anticoagulante,
 - ii. un polímero y un anticoagulante,
 - iii. ácido hialurónico y/o quitosano y un anticoagulante, o

10 iv. ácido hialurónico y/o quitosano, un polímero y un anticoagulante

c. opcionalmente 2 componentes en forma de campana para vacío controlado y taponamiento de los tubos de hematología.

En un aspecto, la divulgación proporciona una máquina de llenado para la preparación automatizada de tubos de hematología, caracterizada por que la máquina de llenado comprende:

- 15 a. opcionalmente un inyector para inyectar ácido hialurónico y/o quitosano en los tubos de hematología,
- b. opcionalmente un inyector para inyectar un polímero en los tubos de hematología,
- c. un inyector para inyectar un anticoagulante en los tubos de hematología, y
- d. opcionalmente 2 componentes en forma de campana para vacío controlado y taponamiento de los tubos de hematología.

20 En un aspecto, la divulgación proporciona una máquina de llenado para la preparación automatizada de tubos de hematología, caracterizada por que la máquina de llenado comprende solo un inyector para inyectar un anticoagulante en los tubos de hematología.

En un aspecto, la divulgación proporciona una máquina de llenado para la preparación automatizada de tubos de hematología, caracterizada por que la máquina de llenado comprende al menos un inyector para inyectar al menos un anticoagulante en los tubos de hematología. En un aspecto, la invención proporciona una máquina de llenado para la preparación automatizada de tubos de hematología, caracterizada por que la máquina de llenado comprende:

- a. una rueda giratoria para mover tubos de hematología vacíos o prellenados uno por uno,
- b. al menos un inyector para inyectar en los tubos de hematología:
 - 30 i. un anticoagulante,
 - ii. un polímero y un anticoagulante,
 - iii. ácido hialurónico y/o quitosano y un anticoagulante, o
 - iv. ácido hialurónico y/o quitosano, un polímero y un anticoagulante
- c. opcionalmente 2 componentes en forma de campana para vacío controlado y taponamiento de los tubos de hematología.

35

Las figuras 1 y 2 representan vistas detalladas de la máquina de llenado.

Preferentemente, la divulgación proporciona una máquina de llenado de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la máquina de llenado comprende:

- a. una rueda giratoria para mover los tubos de hematología uno por uno,
- 40 b. un primer inyector para inyectar un polímero en los tubos de hematología,
- c. un segundo inyector para inyectar un anticoagulante en los tubos de hematología,
- d. opcionalmente 2 componentes en forma de campana para vacío controlado y taponamiento de los tubos de hematología.

En un aspecto, el método de fabricación se caracteriza además por un aparato, preferentemente una rueda giratoria, para mover tubos de hematología vacíos o prellenados uno por uno.

En un aspecto, el método de fabricación se caracteriza además por un aparato, preferentemente de 2 componentes con forma de campana, para vacío controlado y/o taponamiento de los tubos de hematología.

- 5 El ácido hialurónico y/o el quitosano, el polímero y/o el anticoagulante pueden inyectarse secuencial o simultáneamente, por uno o más inyectores. Preferentemente, el ácido hialurónico y/o el quitosano, el polímero y/o el anticoagulante se inyectan secuencialmente.

En un aspecto de la divulgación, la máquina de llenado comprende un inyector único que permite la inyección simultánea o secuencial de ácido hialurónico y/o quitosano, polímero y/o anticoagulante.

- 10 Ventajosamente, el proceso de fabricación de tubos hematológicos estériles permite el procesamiento de 4 tareas individuales de forma simultánea o secuencial en condiciones estériles.

La máquina de llenado usada permite el llenado de los tubos hematológicos con polímero y citrato, el llenado al vacío y el taponamiento en una sola operación automatizada.

- 15 La máquina de llenado se caracteriza en primer lugar por carruseles que permiten el movimiento de los tubos uno por uno (figura 2-1, 2-2 y 2-3). En segundo lugar, la máquina se caracteriza por un primer inyector que permite la inyección de un polímero en el tubo de hematología (figura 1-A y 1-B; figura 2-4, 2-5 y 2-6). En tercer lugar, la máquina se caracteriza por un segundo inyector que permite la inyección de citrato en el tubo de hematología (figura 1-C; figura 2-7 y 2-8). Otras realizaciones pueden incluir otros inyectores o inyectores que inyectan equivalentes u otras sustancias. En cuarto lugar, la máquina se caracteriza por 2 componentes con forma de campana que permiten (figura 1-D; figura 2-10):

i) un vacío controlado en los tubos. En una realización, el vacío controlado es para tubos de 8 a 9 ml de capacidad. ii) Taponamiento de los tubos. Ventajosamente, esto permite la conservación del vacío. La máquina se caracteriza además por un alimentador de cubetas que alimenta los componentes en forma de campana con tapones y tapas de protección (figura 2-9 y 2-10).

- 25 En otro aspecto, la invención proporciona una máquina de llenado para la preparación automatizada de tubos de hematología, caracterizada por que la máquina de llenado comprende discos (figura 2-1), un primer aparato giratorio, preferentemente una mesa giratoria de entrada en sentido antihorario (CCW) (figura 2 -2), un segundo aparato giratorio conectado al primer aparato giratorio, preferentemente una rueda giratoria CCW (figura 2-3), y al menos un inyector para inyectar sustancias dentro de los tubos de hematología.

- 30 En otro aspecto, la invención proporciona una máquina de llenado para la preparación automatizada de tubos de hematología, caracterizada por que la máquina de llenado comprende discos (figura 2-1), una mesa giratoria de entrada en sentido antihorario (CCW) (figura 2-2), una rueda giratoria CCW (figura 2-3), una estación de dosis caliente (figura 2-4), una manguera caliente (figura 2-5), un tanque presurizado (figura 2-6), una bomba peristáltica (figura 2-7), una segunda estación de dosificación (figura 2-8), una estación de recogida y colocación (figura 2-9) y un vibrador (figura 2-10).

El inyector también puede denominarse en el presente documento como una estación de dosificación.

- La inyección de sustancias dentro de los tubos de hematología puede comprender una o más estaciones de dosis, una o más estaciones de dosis caliente (figura 2, 4), uno o más tanques presurizados (figura 2, 6), una o más mangueras, una o más mangueras calientes (figura 2, 5), una o más boquillas, una o más bombas peristálticas (figura 2, 7), una o más estaciones de recogida y colocación (P&P) (figura 2, 9), uno o más vibradores (figura 2, 10), y/o una o más varillas en el brazo de recogida de la P&P.

- 45 Ventajosamente, el proceso de fabricación requiere solo una pequeña área de trabajo, aproximadamente 2 metros cuadrados. Ventajosamente, el proceso de fabricación está controlado en carga biológica bacteriana (número de partículas) en una sala limpia ISO 8. Ventajosamente, el proceso de fabricación puede realizarse bajo flujo laminar y, en consecuencia, el área de trabajo es ventajosamente conforme a ISO 5. Más ventajosamente, el proceso de fabricación es controlado por un solo técnico.

En un aspecto, la máquina de llenado se controla a través de una pantalla, preferentemente una pantalla táctil HMI (figura 2-12).

- 50 En otro aspecto, la divulgación proporciona una máquina de sellado para el envasado automatizando en doble blíster de un dispositivo médico, kit de PRP o kit de A-PRP (plasma autólogo rico en plaquetas) con accesorios, caracterizada por que la máquina de sellado comprende 2 bandas transportadoras paralelas. La figura 3 representa una vista detallada de la máquina de sellado. El kit puede ser sustituido en el presente documento por un dispositivo médico.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una máquina de sellado para el envasado automatizado en doble blíster de un dispositivo médico, kit de PRP o kit de A-PRP con accesorios, caracterizada por que la máquina de sellado comprende 2 bandas transportadoras paralelas y un aparato de recogida y colocación (P&P).

5 Ventajosamente, se logra la unicidad en el proceso de fabricación del tubo de hematología mediante el uso de dos máquinas llamadas máquina de llenado y máquina de sellado.

La máquina de sellado usada permite el envasado en doble blíster en una única operación automatizada.

La máquina de sellado se caracteriza por 2 bandas transportadoras paralelas que permiten las siguientes operaciones (figura 3):

i) Formación de una primera carcasa o blíster hecha de película APET o PETG

10 ii) Llenado del primer blíster con los tubos hematológicos que provienen de la máquina de llenado con accesorios.

iii) Sellado del primer blíster con una película Tyvek

iv) Corte de la película Tyvek para adoptar la forma apropiada

v) Formación, sellado y corte de un segundo blíster sobre el primer blíster.

15 Ventajosamente, la máquina de sellado permite la formación, llenado, sellado y corte de un blíster que comprende tubos hematológicos con accesorios.

En un aspecto, solo se usa un blíster. Preferentemente, se usan 2 blísteres para cumplir con las normas ISO.

20 La máquina de sellado se caracteriza además por un sistema de transferencia de recogida y colocación (aparato de P&P) que permite la transferencia del blíster a su posición inicial en la primera banda transportadora con el uso de una segunda banda transportadora. Esta etapa permite la formación de un segundo blíster por la máquina que se sellará más y estará listo para el proceso de impresión. Las dos bandas transportadoras con el aparato P&P permiten la transferencia del primer blíster ya sellado y cortado y que contiene los tubos y accesorios de hematología a su posición inicial para su posterior procesamiento, es decir, para la formación, sellado y corte del segundo blíster en el primer blíster para envasado en doble blíster.

25 Ventajosamente, la máquina de sellado permite el procesamiento de tareas individuales simultánea/secuencialmente en condiciones estériles.

Ventajosamente, la máquina de sellado se puede realizar bajo flujo laminar y, en consecuencia, el área de trabajo es ventajosamente conforme con la norma ISO 5.

30 Ventajosamente, el proceso y el sistema de fabricación, desde la producción de los tubos hematológicos hasta su envasado en un doble blíster, permite la fabricación de tubos y kits para uso médico y quirúrgico en condiciones asépticas totalmente controladas, así como con carga biológica bacteriana controlada.

Los métodos manuales actuales para preparar tubos de hematología, kits de PRP o kits de A-PRP requieren 4 máquinas, varios técnicos (aproximadamente 10 técnicos) y una producción de aproximadamente 1500 kits de PRP por semana.

35 Ventajosamente, los métodos y máquinas de la presente invención solo requieren un pequeño número de técnicos (aproximadamente 3 operadores) y con una producción sustancialmente mayor de aproximadamente 2000 a 5000 kits de PRP por día. Las máquinas se han diseñado para poder producir 5000 kits de PRP por día.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de fabricación de tubos de hematología por medio de una máquina de llenado y/o una máquina de sellado de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores.

40 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de fabricación automática de tubos de hematología por medio de una máquina de llenado que comprende:

a. llenar los tubos hematológicos con:

i. un anticoagulante,

ii. un polímero y un anticoagulante,

45 iii. ácido hialurónico y/o quitosano y un anticoagulante, o

iv. ácido hialurónico y/o quitosano, un polímero y un anticoagulante,

b. opcionalmente permitir el vacío controlado y el taponamiento de los tubos de hematología.

Otras sustancias descritas en el presente documento pueden combinarse durante una o más de las etapas de un método de fabricación de la divulgación.

5 En otro aspecto, los tubos de hematología no se llenan con ninguna sustancia (los tubos permanecen vacíos), sino que se someten a un vacío controlado y taponamiento.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de fabricación automática de tubos de hematología por medio de una máquina de llenado que comprende vacío controlado y taponamiento de los tubos de hematología.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de fabricación automática de tubos de hematología por medio de una máquina de llenado que comprende:

- 10 a. mover tubos de hematología vacíos o prellenados uno por uno,
- b. llenar los tubos hematológicos con:
 - i. un anticoagulante,
 - ii. un polímero y un anticoagulante,
 - iii. ácido hialurónico y/o quitosano y un anticoagulante, o
 - 15 iv. ácido hialurónico y/o quitosano, un polímero y un anticoagulante,
- c. opcionalmente permitir el vacío controlado y el taponamiento de los tubos de hematología.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de fabricación automática de tubos de hematología por medio de una máquina de llenado que comprende:

- a. mover tubos de hematología vacíos o prellenados uno por uno,
- 20 b. llenar los tubos hematológicos con un polímero,
- c. llenar los tubos hematológicos con un anticoagulante,
- d. opcionalmente permitir el vacío controlado y el taponamiento de los tubos de hematología.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de fabricación de tubos de hematología de acuerdo con la reivindicación anterior que comprende:

- 25 a. cargar tubos de hematología vacíos o prellenados en discos vacíos (figura 2, 1) ubicados en una mesa giratoria de entrada en sentido antihorario (CCW) (figura 2, 2),
- b. Inserción y entrada de los discos con los tubos de hematología en una rueda giratoria CCW (figura 2, 3),
- c. mover los discos a una primera estación de dosis caliente (figura 2, 4).
- 30 e. inyectar un polímero desde un tanque presurizado (figura 2, 6) a través de una manguera caliente (figura 2, 5) dentro del tubo de hematología,
- e. mover los tubos de hematología a una segunda estación de dosificación (figura 2, 8),
- f. llenar los tubos de hematología con un anticoagulante a través de una boquilla y una bomba peristáltica (figura 2, 7),
- g. mover los tubos de hematología llenos a una estación de recogida y colocación (P&P) (figura 2, 9),
- 35 h. insertar un tope y un conjunto de tapas provenientes de un vibrador (figura 2, 10), a través de una varilla elevadora en el brazo de selección del P&P,
- i. mover de vuelta los tubos de hematología a la mesa giratoria, y
- j. recogida del tubo de hematología lleno y envasado por un operador.

En un aspecto, la tapa o el tapón están hechos de bromobutilo.

40 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para fabricar automáticamente un kit de PRP, un kit de A-PRP o un dispositivo médico por medio de una máquina de sellado para el envasado en blíster doble de tubos hematológicos con accesorios, que comprende:

a. moldeado, llenado, sellado y corte de un primer blíster que comprende los tubos hematológicos con accesorios,

b. moldeado, sellado y corte de un segundo blíster en el primer blíster.

5 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para fabricar automáticamente un kit de PRP, un kit de A-PRP o un dispositivo médico, que comprende:

a. mover tubos de hematología vacíos o prellenados uno por uno,

b. llenar los tubos hematológicos con:

i. un anticoagulante,

ii. un polímero y un anticoagulante,

10 iii. ácido hialurónico y/o quitosano y un anticoagulante, o

iv. ácido hialurónico y/o quitosano, un polímero y un anticoagulante,

c. opcionalmente permitir el vacío controlado y el taponamiento de los tubos de hematología,

d. moldeado, llenado, sellado y corte de un primer blíster que comprende los tubos hematológicos con accesorios, y

15 e. moldeado, sellado y corte de un segundo blíster sobre el primer blíster.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de fabricación de un kit de PRP, un kit de A-PRP o un dispositivo médico que comprende un método de fabricación de tubos de hematología de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores en combinación con un método de fabricación de un kit de PRP, un kit de A-PRP o un dispositivo médico de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores.

20 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de fabricación de un kit de PRP, un kit de A-PRP o un dispositivo médico por medio de una máquina de llenado de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores y/o una máquina de sellado de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores.

En un aspecto, los tubos de hematología se llenan previamente con una sustancia seleccionada de agar, gelosa, colágeno, quitosano, factores de crecimiento, ácido ascórbico, albúmina, fibroína, proteínas de fibroína de seda o ácido hialurónico. El agar, la gelosa, el colágeno, el ácido ascórbico, la albúmina, las proteínas de fibroína de seda pueden mostrar propiedades estabilizantes y/o de viscosidad útiles para la composición de la presente invención. En un aspecto, el ácido hialurónico o el quitosano pueden sustituirse o combinarse con agar, gelosa, colágeno, ácido ascórbico, albúmina, fibroína y/o proteínas de fibroína de seda. Preferentemente, el ácido hialurónico o el quitosano se pueden sustituir o combinar con fibroína o proteínas de fibroína de seda. En un aspecto, la fibroína o las proteínas de fibroína de seda pueden combinarse con PRP. En otro aspecto, la fibroína o las proteínas de fibroína de seda pueden combinarse con quitosano y/o HA en combinación con PRP. En otro aspecto, la albúmina se puede combinar con PRP. En otro aspecto, la albúmina se puede combinar con quitosano y/o HA en combinación con PRP. En otro aspecto, la albúmina puede combinarse con quitosano y/o HA, proteínas de fibroína de seda, y combinarse además con PRP.

35 En un aspecto, una sustancia seleccionada de agar, gelosa, colágeno, quitosano, factores de crecimiento, ácido ascórbico, albúmina, fibroína, proteínas de fibroína de seda o ácido hialurónico, y/o combinaciones de los mismos pueden inyectarse en los tubos de hematología.

En un aspecto, en lugar de o en combinación con ácido hialurónico, se puede usar o combinar una sustancia similar, por ejemplo gelosa, agar, colágeno, quitosano, albúmina y/o proteínas de fibroína de seda, y/o cualquier combinación de los mismos.

40 Preferentemente, el anticoagulante es citrato o citrato de sodio.

Preferentemente, el polímero es un gel tixotrópico.

En un aspecto, se puede usar una jeringa o una cubeta en lugar de un tubo o tubo de hematología. En un aspecto, cualquier dispositivo que pueda centrifugarse puede usarse en lugar de un tubo.

45 Preferentemente, el tubo, jeringa, kit o dispositivo es para uso humano o tratamiento humano. En un aspecto, el tubo, la jeringa, el kit o el dispositivo pueden usarse para animales, o adaptarse para uso veterinario o tratamiento de animales.

Preferentemente, el método de fabricación de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores se realiza bajo flujo

laminar y/o carga biológica bacteriana controlada.

Preferentemente, la máquina de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores está ubicada en condiciones de flujo laminar y/o de carga biológica bacteriana controlada.

5 Preferentemente, el blíster está hecho de película APET o PETG. Preferentemente, el sellado se realiza con una película Tyvek.

Los tubos de hematología pueden tener diferentes formas y estar hechos de cristal, plástico o metal. Preferentemente, los tubos están hechos de plástico, preferentemente COP o COC, preferentemente sin ftalatos.

10 Los tubos de hematología tienen, preferentemente, una capacidad de aproximadamente 9 a aproximadamente 10 ml. Preferentemente, los tubos tienen aproximadamente de 11 a 13 cm de longitud y aproximadamente 1,5 cm de ancho. Para dicha capacidad de tubo, se puede añadir de aproximadamente 1 g a aproximadamente 3 g de gel tixotrópico, preferentemente aproximadamente 2 g de gel tixotrópico. Para dicha capacidad de tubo, se puede añadir de aproximadamente 1 g a aproximadamente 3 g de citrato de sodio.

15 En otro aspecto, la divulgación proporciona un tubo de hematología, una jeringa, un kit de PRP, un kit de A-PRP o un dispositivo médico obtenido mediante un método de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores u obtenido por medio de una máquina de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores.

Los tubos de hematología, jeringas, kits y dispositivos de la presente divulgación se pueden usar, pero no se limitan a, trombina, concentrado de plaquetas, composición de PRP, composición de A-PRP, kit de PRP, kit de A-PRP y preparaciones cicatrizantes de heridas.

20 En otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de una máquina de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores para la fabricación de tubos de hematología, jeringas, kits de PRP, kits de A-PRP o dispositivos médicos.

25 Ventajosamente, la estandarización se obtiene mediante los procesos de fabricación de la presente divulgación. Ventajosamente, los tubos de hematología obtenidos por los procesos de fabricación de la presente divulgación son más fiables en términos de diseño (diseño para uso humano), previsibilidad de resultados y replicabilidad. Los tubos de hematología, jeringas, kits de PRP, kits de A-PRP obtenidos por los procesos de fabricación de la presente invención tienen las siguientes ventajas en términos de:

i.) Eficacia como un alto rendimiento de PRP, se obtiene A-PRP, es decir, recuentos de células por tubo (alto rendimiento de células, es decir, plaquetas y leucocitos),

ii.) Viabilidad celular ya que las células están menos sujetas a tensiones traumáticas, los procesos de fabricación de la presente invención están diseñados como procesos no traumáticos,

30 iii.) Funcionalidad celular a medida que se obtiene una alta funcionalidad celular,

iv.) Seguridad, ya que todo el proceso está estandarizado con cumplimiento de las buenas prácticas médicas, se realiza bajo flujo laminar y cumple con diversas normas ISO tales como ISO14644-1, ISO14644-3, ISO12469, ISO11607 (1 y 2). Se implementan altos estándares de calidad para las máquinas y los procesos de fabricación.

35 Ventajosamente, la formación automatizada de dobles blísteres está en conformidad con las normas ISO ISO11607 (1 y 2).

En combinación con los estándares de alta calidad de los procesos de preparación de PRP o PRP autólogo, las composiciones de la presente divulgación están particularmente adaptadas y son útiles en terapia, cosméticos, cirugía y otras aplicaciones descritas en el presente documento.

40 Además, los procesos de fabricación manual actuales de los kits de PRP son exigentes, requieren mucho tiempo y requieren la intervención de diversos recursos humanos.

45 Los procesos de fabricación automatizados para tubos hematológicos, kits de A-PRP y kits de PRP de la presente divulgación pueden proporcionar muy buenos resultados, para aumentar la calidad de las preparaciones de A-PRP o PRP en términos de eficacia, viabilidad celular y funcionalidad celular, y al mismo tiempo para proporcionar tubos hematológicos, kits de A-PRP y kits de PRP de estándares de alta calidad con resultados constantes, predecibles y fiables y que cumplen con altos estándares de seguridad.

La presente divulgación también se refiere a formulaciones de ácido hialurónico y/o quitosano solos o combinados con un concentrado de plaquetas, preferentemente plasma rico en plaquetas (PRP) adecuado para uso humano. Estas composiciones también pueden ser adecuadas para uso veterinario.

50 En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende ácido hialurónico (HA) de aproximadamente 1000 KDa a aproximadamente 2000 KDa a una concentración de aproximadamente el 1,5 % a aproximadamente el 2,5 %. Preferentemente, la divulgación proporciona una composición que comprende ácido

hialurónico de aproximadamente 1400 KDa a aproximadamente 1600 KDa a una concentración de aproximadamente el 1,8 % a aproximadamente el 2,2 %. Más preferentemente, la divulgación proporciona una composición que comprende ácido hialurónico de aproximadamente 1550 KDa a una concentración de aproximadamente el 1,8 % a aproximadamente el 2,2 %, más preferentemente de aproximadamente el 1,7 % a aproximadamente el 2 % de concentración. Dichas composiciones están particularmente adaptadas para inyecciones o infiltraciones, inyecciones intradérmicas, aplicaciones subcutáneas, infiltraciones intraarticulares, fístulas y/o como pegamento biológico.

Dichas composiciones de ácido hialurónico también están particularmente adaptadas para una combinación con un concentrado de plaquetas, preferentemente un plasma rico en plaquetas (PRP), véase los ejemplos. Para una manipulación adecuada de PRP combinada con ácido hialurónico, se requieren formulaciones específicas de HA ya que el ácido hialurónico fuera de un peso molecular y una concentración específicos será demasiado difícil de manipular y no se adaptará para la aplicación industrial. Se ha encontrado que un intervalo molecular de aproximadamente 1400 KDa a aproximadamente 1600 KDa a una concentración de aproximadamente el 1,8 % a aproximadamente el 2,2 % está adaptado para su uso con PRP. Estas propiedades específicas del ácido hialurónico son importantes para mantener una viscosidad adecuada. Se requiere una viscosidad apropiada del ácido hialurónico para su manipulación, por ejemplo en una jeringa. Ventajosamente, la solución de HA es una solución viscosa homogénea adaptada para combinación o mezcla con un concentrado de plaquetas, preferentemente PRP. Por lo tanto, las formulaciones de ácido hialurónico actuales son particularmente adecuadas para aplicación industrial ya que un intervalo específico de peso molecular y concentración de HA permite la combinación con un concentrado de plaquetas, por ejemplo PRP.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende ácido hialurónico de aproximadamente 1400 KDa a aproximadamente 1600 KDa a una concentración de aproximadamente el 1,8 % a aproximadamente el 2,2 % y un concentrado de plaquetas, preferentemente plasma rico en plaquetas.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende ácido hialurónico de aproximadamente al menos 4000 KDa (aproximadamente 4000 KDa o por encima de 4000 KDa) a una concentración de aproximadamente el 1,5 % a aproximadamente el 2,5 %. Preferentemente, la invención proporciona una composición que comprende ácido hialurónico de aproximadamente al menos 4000 KDa (aproximadamente 4000 KDa o por encima de 4000 KDa) a una concentración de aproximadamente el 1,8 % a aproximadamente el 2,2 %, más preferentemente de aproximadamente 4000 KDa a aproximadamente el 2 % de concentración. En una realización, la invención proporciona una composición que comprende ácido hialurónico de aproximadamente 4000 KDa a aproximadamente 6000 KDa a una concentración de aproximadamente el 1,8 % a aproximadamente el 2,2 %. Dichas composiciones están particularmente adaptadas para soporte mecánico, para inyecciones intradérmicas, aplicaciones subcutáneas, correcciones volumétricas y/o viscosuplementación.

En una realización, la presente invención abarca una combinación de al menos dos ácidos hialurónicos que difieren en peso molecular y en concentración. Tener dos HA que solo difieren en peso molecular no es suficiente, una concentración apropiada para cada HA es crucial para poder manipular la combinación de ácido hialurónico, por ejemplo con una jeringa (véanse los ejemplos 1 a 3).

En otro aspecto, la invención proporciona una composición de ácido hialurónico que comprende al menos un ácido hialurónico de bajo peso molecular y al menos un ácido hialurónico de alto peso molecular, caracterizada por que:

- el ácido hialurónico de bajo peso molecular es inferior a 600 KDa o aproximadamente 600 KDa, y
- el ácido hialurónico de alto peso molecular es de aproximadamente 4000 KDa o por encima de 4000 KDa (aproximadamente al menos 4000 KDa).

En otro aspecto, la invención proporciona una composición de ácido hialurónico que comprende un ácido hialurónico de bajo peso molecular y un ácido hialurónico de alto peso molecular, caracterizada por que:

- el ácido hialurónico de bajo peso molecular es inferior a 600 KDa o aproximadamente 600 KDa, y
- el ácido hialurónico de alto peso molecular es de aproximadamente 4000 KDa o por encima de 4000 KDa (aproximadamente al menos 4000 KDa).

Al menos un ácido hialurónico tiene un peso molecular de menos de 600 KDa o un peso molecular de aproximadamente 600 KDa, y al menos un ácido hialurónico tiene un peso molecular de más de 4000 KDa o un peso molecular de aproximadamente 4000 KDa. En una realización, al menos un ácido hialurónico tiene un peso molecular de aproximadamente 400 KDa a aproximadamente 600 KDa, y al menos un ácido hialurónico tiene un peso molecular de aproximadamente 4000 KDa a aproximadamente 6000 KDa.

El HA puede ser reticulado o no reticulado.

Preferentemente, la relación respectiva es de aproximadamente 2:3 (ácido hialurónico de bajo peso molecular a ácido hialurónico de alto peso molecular; es decir, ácido hialurónico de menos de 600 KDa o aproximadamente 600

- KDa respecto a ácido hialurónico de más de 4000 KDa o aproximadamente 4000 KDa) con una concentración total de aproximadamente el 2,2 % a aproximadamente el 2,8 %. Como alternativa, la relación respectiva es de aproximadamente 8:5 con una concentración total de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 3,5 %. Dichas formulaciones están particularmente adaptadas para soporte mecánico, para inyecciones intradérmicas, aplicaciones subcutáneas, correcciones volumétricas y/o viscosuplementación. Ventajosamente, dichas combinaciones de ácido hialurónico proporcionan una viscosidad adecuada para la manipulación (véanse los ejemplos 1 a 3). Ventajosamente, en la combinación de HA que difiere en peso molecular, un HA de alto peso molecular puede aumentar la viscosidad adecuada para soporte mecánico y un HA de bajo peso molecular puede contribuir a la proliferación/regeneración celular al proteger las células y su actividad.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición o un dispositivo, preferentemente un tubo o jeringa, que comprende ácido hialurónico, preferentemente una composición de HA de la presente invención y opcionalmente quitosano.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición o un dispositivo, preferentemente un tubo o jeringa, que comprende ácido hialurónico, preferentemente una composición de HA de la presente invención y un concentrado de plaquetas, preferentemente PRP, más preferentemente un PRP de la presente divulgación.
- En un aspecto, la divulgación proporciona una composición o un dispositivo, preferentemente un tubo o jeringa, que comprende ácido hialurónico, preferentemente una composición de HA de la presente invención, quitosano y un concentrado de plaquetas, preferentemente PRP, más preferentemente un PRP de la presente divulgación.
- En un aspecto, la divulgación proporciona una composición o un dispositivo, preferentemente un tubo o jeringa, que comprende quitosano y un concentrado de plaquetas, preferentemente PRP, más preferentemente un PRP de la presente divulgación. El quitosano puede ser particularmente adecuado en combinación con HA y/o un concentrado de plaquetas por sus propiedades estabilizantes y mantenimiento de la viscosidad. El quitosano puede mejorar aún más la estabilidad y/o eficiencia de una composición de PRP-HA. Además, el quitosano tiene propiedades de coagulación a temperatura fisiológica, es decir, aproximadamente 37 °C. Las propiedades de coagulación están ausentes a temperatura ambiente, lo que hace que el quitosano sea particularmente útil para uso humano. Ventajosamente, no se puede requerir otro activador de la coagulación que el quitosano en una formulación de la presente invención. Por lo tanto, el quitosano no solo puede ser útil por sus propiedades de estabilización y mantenimiento de la viscosidad, sino también como activador de la coagulación. Por lo tanto, el quitosano puede ser particularmente útil para todas las formulaciones que requieren un activador de la coagulación como para la preparación de plasma rico en plaquetas. La presencia de quitosano hace que dicha formulación sea particularmente adecuada para todas las indicaciones o tratamientos que implican cartílago. En una realización de la presente divulgación, un activador de la coagulación de la presente invención puede sustituirse o combinarse con quitosano.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición o un dispositivo, preferentemente un tubo o jeringa, que comprende ácido hialurónico, preferentemente una composición de HA de la presente invención y un anticoagulante.
- En un aspecto, la divulgación proporciona una composición o un dispositivo, preferentemente un tubo o jeringa, que comprende ácido hialurónico, preferentemente una composición de HA de la presente invención, quitosano y un anticoagulante.
- En un aspecto, la divulgación proporciona una composición o un dispositivo, preferentemente un tubo o jeringa, que comprende quitosano y un anticoagulante.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición o un dispositivo, preferentemente un tubo o jeringa, que comprende ácido hialurónico, preferentemente una composición de HA de la presente invención y un gel selector de células.
- En un aspecto, la divulgación proporciona una composición o un dispositivo, preferentemente un tubo o jeringa, que comprende ácido hialurónico, preferentemente una composición de HA de la presente invención, quitosano y un gel selector de células.
- En un aspecto, la divulgación proporciona una composición o un dispositivo, preferentemente un tubo o jeringa, que comprende quitosano y un gel selector de células.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición o un dispositivo, preferentemente un tubo o jeringa, que comprende ácido hialurónico, preferentemente una composición de HA de la presente invención y un anticoagulante, y un gel selector de células.
- En un aspecto, la divulgación proporciona una composición o un dispositivo, preferentemente un tubo o jeringa, que comprende ácido hialurónico, preferentemente una composición de HA de la presente invención, quitosano y un anticoagulante, y un gel selector de células.
- En un aspecto, la divulgación proporciona una composición o un dispositivo, preferentemente un tubo o jeringa, que

comprende quitosano y un anticoagulante, y un gel selector de células.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un dispositivo, preferentemente un tubo o jeringa, que comprende ácido hialurónico y/o quitosano y sangre completa o un concentrado de plaquetas, preferentemente PRP.

5 En otro aspecto, la divulgación proporciona un dispositivo, preferentemente un tubo o jeringa, que comprende ácido hialurónico y/o quitosano, un anticoagulante y sangre completa o un concentrado de plaquetas, preferentemente PRP.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un dispositivo, preferentemente un tubo o jeringa, que comprende ácido hialurónico y/o quitosano, un gel tixotrópico y sangre completa o un concentrado de plaquetas, preferentemente PRP.

10 En otro aspecto, la divulgación proporciona un dispositivo, preferentemente un tubo o jeringa, que comprende ácido hialurónico y/o quitosano, un anticoagulante, un gel selector de células y sangre completa o concentrado de plaquetas, preferentemente PRP.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición de acuerdo con la invención que comprende además sangre completa, un concentrado de plaquetas, plasma rico en plaquetas y/o quitosano.

15 En otro aspecto, la divulgación proporciona un dispositivo, preferentemente un tubo o jeringa, que comprende una composición de acuerdo con la invención y/o quitosano, y que además opcionalmente comprende un anticoagulante y/o un gel selector de células. HA o quitosano pueden sustituirse en el presente documento o combinarse con fibroína y/o proteínas de fibroína de seda.

20 En otro aspecto, la divulgación proporciona un dispositivo médico o kit que comprende un dispositivo, tubo o jeringa de acuerdo con la invención.

El dispositivo puede ser una jeringa, una cubeta o un tubo, incluido cualquier dispositivo que pueda centrifugarse.

Preferentemente, el ácido hialurónico es una composición de HA de la presente invención. Preferentemente, el concentrado de plaquetas o PRP es un concentrado de plaquetas o PRP de la presente divulgación.

25 Preferentemente, el anticoagulante es citrato de sodio. Preferentemente, el gel selector de células es un gel tixotrópico. Preferentemente, el ácido hialurónico se encuentra en el fondo del tubo o jeringa, seguido de un gel tixotrópico y encima de un anticoagulante, preferentemente citrato de sodio.

El anticoagulante de la presente invención puede ser citrato, por ejemplo, una solución tamponada de citrato de sodio a 0,10 M o un citrato de sodio anhidro a 3,5 mg/ml. Preferentemente, el citrato de sodio está a aproximadamente 0,109 M.

30 En un aspecto preferido, la divulgación proporciona un dispositivo, preferentemente un tubo, que comprende aproximadamente 2,0 g de ácido hialurónico de 1550 KDa, aproximadamente 1,9 g de gel de polímero (gel tixotrópico) y aproximadamente 0,7 ml de solución de citrato de sodio a aproximadamente 0,109 M.

35 Preferentemente, el dispositivo, preferentemente un 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 de sodio a 0,109 M.

Ventajosamente, dichas formulaciones están particularmente adaptadas para aplicación industrial y uso humano que tienen (véanse los ejemplos 1 a 3):

- buena estabilidad a temperatura ambiente,
- viscosidad adecuada con buena capacidad de manipulación que es adecuada para su uso con una jeringa y aguja (pruebas de flujo),
- sin adyuvante como manitol requerido como, por ejemplo, con Osteonil,
- la presencia de HA de alto peso molecular proporciona estabilidad y tiene un efecto duradero,
- la presencia de HA de bajo peso molecular puede favorecer el crecimiento celular y se metabolizará más rápidamente, con una acción más rápida en la viscosuplementación (alta penetración).

45 Las formulaciones de HA y/o el quitosano pueden combinarse adicionalmente con un extracto celular. Se pueden usar medios enriquecidos.

Dichas formulaciones resultan útiles cuando se requieren nuevas células, por ejemplo, cuando el músculo necesita fibroblastos.

En un aspecto, una formulación de HA de la presente invención y/o quitosano se puede combinar con un concentrado de plaquetas y T.C.P. (Fosfato tricálcico).

En otros aspectos, la divulgación proporciona un dispositivo, preferentemente un tubo, que puede usarse para la preparación de una composición cicatrizante de heridas o una composición cicatrizante de tejidos, seleccionada entre:

i) un tubo separador de vidrio que comprende ácido hialurónico y/o quitosano, un gel tixotrópico basado en poliéster y una solución tamponada de citrato de sodio a 0,10 M,

ii) un tubo separador de tereftalato de polietileno que comprende ácido hialurónico y/o quitosano, un gel altamente tixotrópico formado por una mezcla de polímeros y un citrato de sodio anhidro a 3,5 mg/m,

iii) un tubo separador de copolímero olefínico cíclico (COC) o polímero olefínico cíclico (COP) que comprende ácido hialurónico y/o quitosano, un gel tixotrópico a base de poliéster y una solución de citrato sódico tamponado a 0,10 M, o

iv) un tubo separador de filtro de copolímero olefínico cíclico (COC) o polímero olefínico cíclico (COP) que contiene ácido hialurónico y/o quitosano, y una solución tamponada de citrato de sodio a 0,10 M o un citrato de sodio anhidro a 3,5 mg/ml.

Preferentemente, la formulación de HA se mezcla o concentra, preferentemente a aproximadamente el 2 %, en tampón fosfato (PBS).

Para aplicaciones industriales, el ácido hialurónico debe someterse a esterilización. Sorprendentemente, se ha descubierto que la irradiación gamma no es adecuada para el ácido hialurónico (véanse los ejemplos). La irradiación gamma hace que el ácido hialurónico sea inactivo desnaturalizando el ácido hialurónico. Las formulaciones de ácido hialurónico de la presente invención tienen que someterse a un procedimiento específico para mantener sus propiedades. Solo se ha determinado que la esterilización con vapor es adecuada para la esterilización de HA manteniendo las propiedades y la actividad del ácido hialurónico (véanse los ejemplos). Se requiere esterilización con vapor para mantener la viscosidad y la funcionalidad de HA como se muestra en los ejemplos.

En otro aspecto, las formulaciones de HA de la presente invención se esterilizan con vapor. En una realización, las formulaciones de HA se esterilizan con vapor desde aproximadamente 105 °C durante aproximadamente 8 minutos, hasta aproximadamente 121 °C durante aproximadamente 20 minutos. Preferentemente, el HA se esteriliza con vapor a aproximadamente 105 °C durante aproximadamente 8 minutos. En una realización preferida, el dispositivo o tubo que comprende la formulación de HA se esteriliza con vapor.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un cicatrizante de heridas o cicatrizante de tejidos que comprende una composición de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición de acuerdo con la invención para su uso en terapia.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método o proceso para la preparación de un cicatrizante de heridas o cicatrizante de tejidos que comprende una composición de concentrado de plaquetas o una composición de plasma rico en plaquetas, que comprende las etapas de:

a) Centrifugar sangre completa en un dispositivo, preferentemente un tubo o jeringa, que comprende una composición de acuerdo con la invención, preferentemente una composición de HA, composición de quitosano o una composición de HA y quitosano, y

b) Recoger el cicatrizante de heridas o el cicatrizante de tejido que comprende una composición de concentrado de plaquetas o una composición de plasma rico en plaquetas.

Preferentemente, la etapa de centrifugación se realiza a una fuerza de aproximadamente 1500 g hasta aproximadamente 2000 g (esta velocidad es con un radio de aproximadamente 20 cm a aproximadamente 2500 a aproximadamente 3000 rpm). 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. Preferentemente, el tiempo de centrifugación es de aproximadamente 3 minutos. En una realización preferida, la velocidad de centrifugación es de aproximadamente 1500 g con un tiempo de centrifugación de aproximadamente 5 minutos. El tiempo y la velocidad de centrifugación dependen de la formulación presente en el dispositivo. El experto en la materia puede determinar el tiempo y la velocidad de centrifugación apropiados de acuerdo con la composición usada.

En un aspecto, el cicatrizante de heridas o el cicatrizante de tejidos se separa del plasma completo eliminando la primera mitad del sobrenadante que contiene el plasma pobre en plaquetas.

Opcionalmente, después de la etapa de centrifugación, el concentrado de plaquetas o el plasma rico en plaquetas se mezcla con el ácido hialurónico y/o el quitosano.

Opcionalmente, después de la etapa de centrifugación, el dispositivo o tubo se homogeneiza invirtiendo suavemente el dispositivo o tubo varias veces, lo que da como resultado la suspensión del depósito celular en el sobrenadante y/o la homogeneización del ácido hialurónico y/o quitosano con PRP. A partir de aproximadamente 5 ml de material de partida (sangre completa) en un tubo, se obtendrán de aproximadamente 4 ml a aproximadamente 5 ml de la mezcla de PRP - Ácido hialurónico/quitosano para cada tubo, de los cuales de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 ml de plasma anticoagulado combinados con aproximadamente 2 ml de solución de ácido hialurónico/quitosano contenida en el dispositivo. El volumen final de la mezcla de PRP-HA es de aproximadamente 4 a aproximadamente 5 ml, con una relación aproximada de PRP respecto a solución de ácido hialurónico/quitosano del 50 %.

Opcionalmente, se puede usar una cánula para iniciar la homogeneización. Para obtener una concentración celular más alta, o una viscosidad más alta de la mezcla, antes de proceder a la resuspensión de plaquetas, se puede eliminar delicadamente aproximadamente 1 ml de la capa superior del sobrenadante de plasma pobre en plaquetas (PPP) con una cánula larga. Posteriormente se puede resuspender el depósito celular en el PRP restante mediante inversiones suaves del tubo (homogeneización).

En otro aspecto, la invención proporciona un proceso o método para la preparación de una composición cicatrizante de heridas o una composición cicatrizante de tejidos que comprende una composición de concentrado de plaquetas o una composición de plasma rico en plaquetas, que comprende las etapas de:

- a) Centrifugar sangre completa en un dispositivo, preferentemente un tubo o jeringa que comprende una composición de acuerdo con la invención, preferentemente una composición de HA, una composición de quitosano o una composición de HA y quitosano,
- b) Opcionalmente eliminar plasma pobre en plaquetas, preferentemente aproximadamente 1 ml de la capa superior del plasma pobre en plaquetas,
- c) Opcionalmente homogeneizar la composición resultante y/o resuspender el depósito celular en el sobrenadante, preferentemente invirtiendo el dispositivo, tubo o jeringa,
- d) Recoger el cicatrizante de heridas o el cicatrizante de tejido que comprende una composición de concentrado de plaquetas o una composición de plasma rico en plaquetas,
- e) Opcionalmente, mezclar más dicho cicatrizante de heridas o cicatrizante de tejido,
- f) Opcionalmente combinar aún más dicho cicatrizante de heridas o cicatrizante de tejido con al menos una sustancia adicional y/o uno o más extractos celulares.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición de cicatrizante de heridas o cicatrizante de tejido preparada de acuerdo con un método de la presente divulgación.

Preferentemente, un dispositivo, preferentemente un tubo o jeringa, de acuerdo con la divulgación se usa en un método o proceso de acuerdo con la divulgación. Preferentemente, el dispositivo, tubo o jeringa no contiene ftalato.

En una realización, el cicatrizante de heridas o cicatrizante de tejido se puede combinar con al menos una sustancia adicional tal como un activador de la coagulación, suero de trombina, fosfato tricálcico (TCP), un sustituto óseo, gluconato de calcio, sacarato de calcio, quitosano, fibroína, proteínas de fibroína de seda, factores de crecimiento, manitol, colágeno, albúmina, ácido ascórbico, crema, células grasas, tejido graso, concentrado de médula ósea, lubricina, cd-gelatina, toxina botulínica y/o uno o más extractos celulares, que no son células madre embrionarias extractos preferentemente un extracto celular autólogo, preferentemente un extracto celular seleccionado de un extracto de queratinocitos, médula ósea, fibroblastos, células del perostio o corneales, melanocitos y células de Langerhans; células grasas, células musculares tales como miofiblastos y células satélite; osteoblastos; condrocitos; células del cordón umbilical; células madre no embrionarias, células madre mesenquimatosas (MSC), preadipocitos, células pre-endorreiales, células de Schwann, células gliales, neuronas o células del tendón de Aquiles.

En una divulgación, se puede añadir gluconato de calcio de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 10 % para la coagulación apropiada del sitio infectado. En una divulgación, se puede usar cloruro de calcio. Más preferentemente, se puede usar gluconato de calcio a aproximadamente el 10 %. Como alternativa, se puede usar sacarato de calcio. En un aspecto, se puede usar una combinación de gluconato de calcio y sacarato de calcio. Por ejemplo, para 100 ml de solución, se pueden usar aproximadamente 9,5 g de gluconato de calcio y aproximadamente 360 mg de sacarato de calcio. Por ejemplo, para una ampolla de dosis única de 2 ml se pueden usar aproximadamente 0,19 g de gluconato de calcio y aproximadamente 7,2 mg de sacarato de calcio para un contenido de calcio de aproximadamente 0,463 mmol por ampolla de 2 ml. Por ejemplo, para una ampolla de dosis única de 5 ml, se pueden usar aproximadamente 0,47 g de gluconato de calcio y aproximadamente 18 mg de sacarato de calcio para un contenido de calcio de aproximadamente 1,148 mmol por ampolla de 5 ml. El experto en

la materia determinará fácilmente el contenido de calcio apropiado de acuerdo con el uso específico.

Las formulaciones de HA de la presente invención proporcionan un efecto de volumen, con un resultado deseable a largo plazo en la piel. Las células se alisan o aplanan. Se estimulan los fibroblastos, se protege la actividad de los fibroblastos. Las formulaciones de HA de la presente invención permiten el mantenimiento de la estructura de los fibroblastos.

Las formulaciones pueden adaptarse a un uso específico. Para inyección y/o infiltración, las formulaciones pueden usarse sin sustancia adicional como una formulación viscosa.

Como otras aplicaciones útiles para experto en la materia/cirujano, se puede obtener un pegamento biológico con PRP, A-PRP o PRP en combinación con HA sin sustancias adicionales. La dispensación requiere el uso de un dispensador doble que permita la formación del pegamento cuando las sustancias PRP más HA se inyectan simultáneamente en el sitio quirúrgico. En una realización, se puede usar un dispensador doble para la inyección de una formulación de la presente invención.

Para obtener un pegamento biológico más fuerte, las formulaciones de HA-PRP de la presente divulgación se pueden combinar con un activador de la coagulación como una sal de calcio, preferentemente CaCl_2 o trombina, preferentemente una trombina autóloga. Como alternativa o además de CaCl_2 o trombina, las formulaciones de HA-PRP de la presente divulgación pueden combinarse con gluconato de calcio y/o sacarato de calcio.

Para otras aplicaciones evidentes para el experto en la materia, una membrana suturable puede ser más adecuada. Para obtener una membrana suturable, las formulaciones de HA-PRP de la presente divulgación se pueden combinar con una concentración más alta de activador de la coagulación como una trombina autóloga u homóloga, una sal de calcio como CaCl_2 , pero preferentemente gluconato de calcio. Como alternativa o además de CaCl_2 o trombina, las formulaciones de HA-PRP de la presente divulgación pueden combinarse con TCP (fosfato tricálcico). Las formulaciones de HA-PRP de la presente divulgación pueden combinarse con TCP para inyección profunda y/o mejora de volumen.

Para la aplicación de las formulaciones de HA-PRP de la presente divulgación, el experto en la materia puede usar varios medios. Por ejemplo, se puede usar un aplicador doble. El ácido hialurónico puede estar presente en un dispositivo, por ejemplo, un tubo o jeringa, y el PRP puede estar presente en otro dispositivo, por ejemplo, un tubo o jeringa. Como alternativa, las formulaciones de HA-PRP pueden prepararse en un solo dispositivo, por ejemplo, un tubo o una jeringa.

El HA solo o una combinación de HA pueden combinarse adicionalmente con al menos un extracto celular, siempre que la célula no sea una célula madre embrionaria. El HA solo o una combinación de HA pueden combinarse adicionalmente con quitosano, colágeno o albúmina. El quitosano puede ser de origen animal, por ejemplo, crustáceos, o de origen vegetal, por ejemplo, champiñón de París.

Las composiciones de la presente divulgación pueden usarse como colirio oftálmico (gotas oculares), en articulaciones (por ejemplo, rodilla), medicina deportiva, lesiones musculares o manguito rotador.

Las composiciones de la presente divulgación pueden usarse en estética, mesoterapia, relleno de arrugas (superficiales y profundas), como una máscara post-láser, post-peeling o monoterapia (por ejemplo, purpurina, brillo, luminosidad o resplandor) o disfunción eréctil.

Las composiciones de la presente divulgación pueden usarse en el cuidado de heridas, heridas diabéticas o en heridas vasculares grandes.

Las composiciones de la presente divulgación pueden usarse en oftalmología.

Los métodos de la presente divulgación permiten la preparación de una composición, cicatrizante de heridas o de tejidos, lista para usar en aproximadamente 5 minutos.

Las composiciones de la presente divulgación se han probado para determinar su biocompatibilidad, toxicidad y tolerancia a las implantaciones (datos no mostrados). Ventajosamente, las composiciones de la presente invención son adecuadas para aplicación industrial ya que todos los estudios de biocompatibilidad y pruebas de toxicidad tienen un resultado favorable. Las composiciones, por ejemplo, no tienen efectos adversos en conejos y los implantes se reabsorben en 30 días en la mayoría de los sitios. Las composiciones de HA también se han probado para determinar el peso molecular, la viscosidad y la concentración después del envejecimiento acelerado a 50 °C (datos no mostrados). No se ha identificado ningún compuesto de degradación notable. Otras pruebas realizadas incluyen pruebas de citotoxicidad, irritación, sensibilidad, mutaciones inversas, hemólisis y tromboplastina.

En otro aspecto, la presente divulgación abarca tubos y/o jeringas que comprenden las formulaciones de la presente invención.

Las formulaciones de la presente divulgación pueden combinarse, almacenarse o administrarse en tubos y/o

jeringas.

En otro aspecto, la presente divulgación abarca un kit o dispositivo médico para la preparación de una formulación de acuerdo con la presente invención.

Las composiciones de HA y/o quitosano se pueden combinar y/o administrar de varias maneras. En un aspecto de la divulgación, una composición de acuerdo con la invención se puede combinar o mezclar con PRP en un procedimiento como se describe en el documento WO2011/10948. En un aspecto, la formulación de HA y/o quitosano está presente en un tubo y el concentrado de plaquetas o PRP se prepara usando el mismo tubo. El PRP y el HA/quitosano se pueden mezclar entre sí después de la centrifugación. Como alternativa, la formulación de PRP y HA/quitosano se combina o mezcla en otro dispositivo, por ejemplo, una jeringa. El HA/quitosano, en lugar de estar presente en un tubo, se inserta en una jeringa que posteriormente se usará también para la preparación de PRP. La divulgación abarca, por lo tanto, todos los dispositivos en los que se puede insertar un HA/quitosano y en los que se usa el mismo dispositivo para la preparación de un concentrado de plaquetas. Preferentemente, el HA/quitosano y PRP se preparan y se mezclan entre sí usando solo un dispositivo. En una divulgación, el HA/quitosano y el PRP se preparan, mezclan y aplican al paciente (por ejemplo, mediante inyección) usando solo un dispositivo. HA/quitosano significa una composición de HA solo, una composición de quitosano solo o una combinación de HA y quitosano. Por ejemplo, en otra divulgación, se añade o mezcla quitosano a la composición de HA-PRP.

Como alternativa, la formulación de HA/quitosano y el concentrado de plaquetas (por ejemplo, PRP) se preparan en dos dispositivos separados o más, ya sean tubos, jeringas u otros. Una vez preparado, el HA/quitosano y PRP pueden mezclarse con el uso de un conector u otro dispositivo, o transferirse a otro dispositivo.

Las formulaciones que comprenden HA y PRP o PRP solo se probaron por sus propiedades y rendimiento usando dos dispositivos en paralelo llamados tubo RegenBCT para la preparación de PRP solo y tubo RegenBCT-HA para una preparación que combina PRP y ácido hialurónico (ejemplo 3). Como alternativa a los tubos RegenBCT, se pueden usar tubos A-CP en la presente invención, por ejemplo para combinarlos con HA para obtener tubos A-CP-HA. Los tubos A-CP, como los tubos RegenBCT, por lo tanto, se puede llenar previamente con HA, quitosano y/o fibroína o proteínas de fibroína de seda. Ventajosamente, las formulaciones que comprenden HA y PRP en comparación con PRP solo mostraron:

- pH idéntico,
- resultados equivalentes en la eliminación de glóbulos rojos con una recuperación inferior al 0,5 %,
- reducción equivalente del contenido de glóbulos blancos en PRP, en comparación con sangre completa con aproximadamente el 85 % de los leucocitos eliminados y con la misma distribución en los subconjuntos de glóbulos blancos con una baja contaminación de granulocitos, que se sabe que son proinflamatorios,
- una concentración de plaquetas más alta que la concentración de plaquetas en sangre,
- un patrón de respuesta similar en los dos tipos de preparaciones de plaquetas para expresión de selectina, con un aumento de la expresión de selectina P en respuesta a la activación específica con ADP,
- una respuesta al estrés hipotónico que fue de la misma amplitud en ambos tipos de preparaciones de plaquetas y permaneció sin cambios durante el período de 4 horas, y
- capacidad de agregarse en respuesta a la activación con colágeno y esta capacidad se mantuvo al mismo nivel a tiempo T = 4 horas.

Más específicamente, el PRP obtenido con el tubo RegenBCT-HA tiene una alta recuperación de plaquetas (60-70 %), una recuperación parcial de glóbulos blancos (aproximadamente el 15 %), con un agotamiento selectivo (95 %) de granulocitos y casi sin contaminación de glóbulos rojos (<0,5 %).

Sorprendentemente, se encontró un mayor número de plaquetas en el RegenBCT-HA PRP después de cuatro horas, lo que puede deberse a la liberación en el plasma de algunas plaquetas de la fracción de ácido hialurónico durante la duración del experimento. Por lo tanto, las formulaciones de HA-PRP de la presente divulgación pueden tener un efecto duradero ya que las plaquetas se liberan con el tiempo. De importancia, una concentración demasiado alta de plaquetas puede tener un efecto inhibitorio. La liberación progresiva de plaquetas usando las composiciones, dispositivos y métodos de la presente divulgación representa una ventaja importante.

Ventajosamente, la formulación de HA-PRP resultante es una suspensión de plaquetas en un armazón tridimensional (HA) con una concentración cercana al valor sanguíneo fisiológico, en el que las plaquetas han mantenido su integridad y funcionalidad.

En otro aspecto, la divulgación proporciona formulaciones de HA-PRP caracterizadas por que:

- concentración de glóbulos rojos de menos de $0,5 \times 10^6/\text{mm}^3$, preferentemente menos de $0,3 \times 10^6/\text{mm}^3$, más

preferentemente menos de $0,1 \times 10^6/\text{mm}^3$

- casi sin contaminación de glóbulos rojos con una recuperación de glóbulos rojos de aproximadamente $0,49 \pm 0,25 \%$

- recuperación de glóbulos blancos de aproximadamente $14,56 \pm 10,66 \%$

5 - la distribución de granulocitos a tiempo $T = 0$ es aproximadamente el 18% , a tiempo 4 horas es aproximadamente el 23% , la distribución de células mononucleares a tiempo $T = 0$ es aproximadamente el 82% y a tiempo 4 horas es aproximadamente el 77%

- agotamiento selectivo de aproximadamente el 95% de granulocitos

- la recuperación de células mononucleares es aproximadamente $37,87 \pm 25,17 \%$

10 - la recuperación de granulocitos es aproximadamente $5,48 \pm 4,92 \%$,

- los factores de concentración final de plaquetas en las mezclas de PRP-HA fueron aproximadamente $0,71 \pm 0,14$ y aproximadamente $0,85 \pm 0,17$ respectivamente a tiempo $T = 0$ y cuatro horas más tarde

- los factores de concentración final de plaquetas con RegenBCT-HA PRP fueron aproximadamente $1,53 \pm 0,36$ y aproximadamente $1,86 \pm 0,45$ respectivamente a tiempo $T = 0$ y cuatro horas tarde

15 - la recuperación de plaquetas es de aproximadamente $59,43 \pm 14,48 \%$ a tiempo $T = 0$ y aproximadamente $71,70 \pm 15,14 \%$ cuatro horas más tarde,

- volumen de partida de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 5,5 ml de sangre completa, aproximadamente 2,4 volúmenes de PRP, aproximadamente 2,7 volúmenes eliminados y aproximadamente 5,2 ml de PRP-HA

20 - valor de pH de aproximadamente 7,7

La eficacia de las formulaciones de HA-PRP se ha evaluado en pacientes que comparan formulaciones de PRP usando el tubo REGENBCT y las formulaciones de HA-PRP usando los tubos REGENBCT-HA (véase el ejemplo 4). Como se muestra en la figura 19, se demuestra evidencia de afinidad por HA y factores de crecimiento (GF) para PDGF y EGF. Se observa una liberación de GF mucho más fuerte en una combinación de HA con PRP que PRP solo.

25 Sorprendentemente, la entrega de GF en fase temprana (PDGF-AA, PDGF-BB y EGF) es distinta entre una preparación de PRP solo (BCT) frente a una combinación de PRP y HA (BCT HA), véase las figuras 20 y 21.

Una combinación de PRP y HA es muy efectiva en la fase temprana con una liberación de GF mucho mayor, particularmente para PDGF-BB hasta aproximadamente el día 3 o el día 4 y para EGF hasta aproximadamente el día 1 o el día 2. Esto es particularmente importante en todos los casos en los que se requiere una liberación rápida y fuerte de GF, por ejemplo, en el cuidado de heridas. Ventajosamente, dicha liberación de GF en fase temprana mejora el tiempo de cicatrización de la herida y disminuye rápidamente el dolor. Por ejemplo, una formulación de HA-PRP de acuerdo con la invención es útil en el dolor agudo. Por lo tanto, las presentes formulaciones de HA también pueden tener un efecto de fase temprana.

30 En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición cicatrizante de heridas, composición cicatrizante de tejidos, composición celular, composición de A-PRP, composición de PRP, suero de trombina o agente hemostático obtenido usando un tubo de hematología, una jeringa, un kit de A-PRP, un kit de PRP o dispositivo médico de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, obtenido mediante el uso de una máquina de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores u obtenido mediante un método de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, en el que la composición cicatrizante de heridas, la composición cicatrizante de tejidos, la composición celular, la composición de plasma rico en plaquetas, la composición de A-PRP o el agente hemostático se combinan con un activador de la coagulación, suero de trombina, fosfato tricálcico (TCP), un sustituto óseo, gluconato de calcio, sacarato de calcio, quitosano, fibroína, proteínas de fibroína de seda, factores de crecimiento, manitol, colágeno, albúmina, ácido ascórbico, crema, células grasas, tejido graso, concentrado de médula ósea, lubricina, cd-gelatina, toxina botulínica y/o uno o más extractos celulares, que no son extractos de células madre embrionarias, preferentemente un extracto de células autólogas, preferentemente un extracto de células seleccionado de un extracto de queratinocitos, médula ósea, fibroblastos, células del periostio o corneales, melanocitos y células de Langerhans; células grasas, células musculares tales como mioblastos y células satélite; osteoblastos; condrocitos; células del cordón umbilical; células madre no embrionarias, células madre mesenquimatosas (MSC), preadipocitos, células preendoteliales, células de Schwann, células gliales, neuronas o células del tendón de Aquiles.

50 En un aspecto, un aparato adicional permite la combinación automática de una composición de PRP o una composición de A-PRP con un activador de la coagulación, suero de trombina, fosfato tricálcico (TCP), un sustituto

óseo, composición de ácido hialurónico, gluconato de calcio, sacarato de calcio, quitosano, fibroína, proteínas de fibroína de seda, factores de crecimiento, manitol, colágeno, albúmina, ácido ascórbico, crema, células grasas, tejido adiposo, concentrado de médula ósea, lubricina, cd-gelatina, toxina botulínica y/o uno o más extractos celulares, que son no extractos de células madre embrionarias.

En un aspecto, un activador de la coagulación, suero de trombina, gel selector de células, fosfato tricálcico (TCP), un sustituto óseo, composición de ácido hialurónico, gluconato de calcio, sacarato de calcio, quitosano, fibroína, proteínas de fibroína de seda, factores de crecimiento, manitol, colágeno, albúmina, ácido ascórbico, crema, células grasas, tejido graso, concentrado de médula ósea, lubricina, cd-gelatina, toxina botulínica y/o uno o más extractos celulares, que no son extractos de células madre embrionarias, se precargan, inyectan o insertan en los tubos de hematología.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición cicatrizante de heridas, composición cicatrizante de tejidos, composición celular, composición, composición de concentrado de plaquetas, composición de HA, composición de quitosano, composición de PRP, composición de A-PRP, suero de trombina o agente hemostático obtenido mediante el uso de un tubo de hematología, jeringa, kit de A-PRP, kit de PRP o dispositivo médico de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, obtenido mediante el uso de una máquina de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores u obtenido mediante un método de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores para su uso en odontología, ortopedia, medicina deportiva, cosmética, estética, cirugía, oftalmología y/o mesoterapia.

En otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de una composición cicatrizante de heridas, composición cicatrizante de tejidos, composición celular, composición de concentrado de plaquetas, composición de HA, composición de quitosano, composición de PRP, composición de A-PRP, suero de trombina o agente hemostático obtenido mediante el uso de un tubo de hematología, jeringa, kit de A-PRP, kit de PRP o dispositivo médico de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, obtenido mediante el uso de una máquina de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores u obtenido mediante un método de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores para la regeneración celular, para la adhesión de tejidos, para promover la cicatrización de heridas o la cicatrización de tejidos y/o el sellado y/o la regeneración de un tejido y/o un cartílago y/o un hueso y/o un nervio en una herida o tejido de un ser humano o animal, o para inducir la regeneración periodontal en una herida o un defecto periodontal de un mamífero con enfermedad periodontal u otra afección que requiera la regeneración periodontal, o para la reconstrucción de ligamentos y/o cartílagos, o para promover la regeneración cutánea en una cicatriz o una arruga, o para aumentar el volumen del tejido adiposo en un mamífero con un injerto de grasa dérmica u otra afección que requiera la regeneración del tejido adiposo, o para inducir la regeneración del miocardio en un mamífero con deficiencia miocárdica u otra afección que requiera la regeneración del tejido miocárdico, o para inducir la regeneración corneal en un mamífero con deficiencia corneal u otra afección que requiera regeneración corneal, o para inducir la regeneración articular o cartilaginosa en un mamífero con deficiencia articular o cartilaginosa u otra afección que requiera la regeneración del tejido articular o cartilaginoso, o para promover la regeneración cutánea en una cicatriz, una arruga o una deficiencia de grasa de seres humanos o animales inferiores, o para inducir la regeneración del nervio periférico en un mamífero con daño al nervio periférico, sutura nerviosa o lesión de la médula espinal u otra afección que requiera la regeneración del nervio periférico, o para inducir la regeneración ósea en un mamífero con daño óseo, deficiencia ósea u otra afección que requiera regeneración ósea, o para inyecciones para ortopedia e inyecciones para estética, o para regeneración y/o rejuvenecimiento de los tejidos de la piel, particularmente para promover y/o iniciar la regeneración de la piel, tal como reducir las arrugas de la piel, arrugas profundas, acné, quemaduras, cicatrices de rubéola o viruela, vitíligo y lipoatrofia, mejora de las líneas nasolabiales y tratamiento de daños o trastornos de la piel, tales como quemaduras en la piel, sarcoma de Kaposi, queloides de la piel o fibromatosis palmar de Dupuytren y en la reducción del dolor asociado con la regeneración de la piel y los tejidos, o para tratamientos de cicatrización o regeneración de heridas o de tejidos, especialmente el tratamiento de heridas traumáticas o quirúrgicas tales como la colocación y/o retención y/o sellado de injertos nativos o protésicos; tratamiento de vasculitis; úlceras tales como úlceras neuropáticas diabéticas o úlceras por decúbito, úlcera diabética, úlcera perforante o úlcera diabética perforante, artritis, artrosis, pseudoartritis, radiodermatitis y fístulas de cierre, o para trastornos cardíacos, regeneración cardíaca tal como en el tratamiento de insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca isquémica y no isquémica y cardiomiopatía, o para trastornos óseos, cartilaginosos y articulares tales como daño condral, lesión cartilaginosa y/o ósea tal como daño y/o erosión profunda del cartílago y/o artroscopia, rotura de tendones y del manguito rotador en el hombro o para trastornos corneales tales como el síndrome del ojo seco; opacidad corneal tal como las causadas por quemaduras químicas, aflicción por el síndrome de Steven Johnson; formación de tejido cicatricial en la córnea y úlceras corneales, o por daño al nervio periférico, sutura nerviosa y lesión de la médula espinal.

En otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de una composición cicatrizante de heridas, composición cicatrizante de tejidos, composición, composición celular, composición de concentrado de plaquetas, composición de HA, composición de quitosano, composición de PRP, composición de A-PRP, suero de trombina o agente hemostático obtenido mediante el uso de un tubo de hematología, una jeringa, un kit de A-PRP, un kit de PRP o un dispositivo médico de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, obtenido mediante el uso de una máquina de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores u obtenido mediante un método de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores en una herida, un tejido dañado, hueso dañado o defecto o cavidad periodontal.

- En otro aspecto, la divulgación proporciona un uso de una composición cicatrizante de heridas, composición cicatrizante de tejidos, composición, composición celular, composición de concentrado de plaquetas, composición de HA, composición de quitosano, composición de PRP, composición de A-PRP, suero de trombina o agente hemostático obtenido mediante el uso de un tubo de hematología, una jeringa, un kit de A-PRP, un kit de PRP o un dispositivo médico de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, obtenido mediante el uso de una máquina de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores u obtenido mediante un método de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores para la fabricación de un medicamento para la cicatrización de heridas o tejidos o para promover el crecimiento óseo o periodontal y/o la regeneración ósea y/o tisular, tal como regeneración de piel, cartílago, músculo, tendón, ligamento, tejido adiposo, córnea, nervios periféricos, médula espinal u ósea.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de una composición cicatrizante de heridas, composición cicatrizante de tejidos, composición, composición celular, composición de concentrado de plaquetas, composición de HA, composición de quitosano, composición de PRP, composición de A-PRP, suero de trombina o agente hemostático obtenido mediante el uso de un tubo de hematología, una jeringa, un kit de A-PRP, un kit de PRP o un dispositivo médico de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, obtenido mediante el uso de una máquina de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores u obtenido mediante un método de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores para la fabricación de una preparación cosmética para su uso como agente antienviejimiento o agente reparador de la piel, tal como un agente reparador de cicatrices, un agente reparador de lipoatrofias, un agente de relleno y/o reparación de arrugas, para preparación estética, control del envejecimiento, corrector de volumen y/o estimulador capilar.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de una composición cicatrizante de heridas, composición cicatrizante de tejidos, composición, composición celular, composición de concentrado de plaquetas, composición de HA, composición de quitosano, composición de PRP, composición de A-PRP, suero de trombina o agente hemostático obtenido mediante el uso de un tubo de hematología, una jeringa, un kit de A-PRP, un kit de PRP o un dispositivo médico de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, obtenido mediante el uso de una máquina de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores u obtenido mediante un método de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores para la fabricación de una preparación cosmética para su uso en odontología, ortopedia, artritis, artrosis, pseudoartritis u otros. En una realización, la composición cicatrizante de heridas o la composición cicatrizante de tejidos se aplica en una cavidad dental, en una úlcera diabética, úlcera perforante, úlcera diabética perforante u otras.
- En un aspecto, la composición cicatrizante de heridas, composición cicatrizante de tejidos, composición, composición celular, composición de concentrado de plaquetas, composición de HA, composición de quitosano, composición de PRP, composición de A-PRP, suero de trombina o agente hemostático se puede combinar con fosfato tricálcico (TCP), con cualquier sustituto óseo y/o ácido hialurónico/quitosano preferentemente antes de la formación del coágulo. La composición puede usarse como corrector de volumen (TCP a 10-30 micras), en odontología, ortopedia (TCP a 50 micras).
- Las combinaciones incluyen TCP, ácido hialurónico/quitosano y una composición de PRP. Una combinación preferida incluye TCP, ácido hialurónico/quitosano y una composición de A-PRP. Las combinaciones incluyen TCP, ácido hialurónico, gelosina, quitosano, albúmina, manitol, factores de crecimiento, ácido ascórbico, colágeno y/o seda con una composición de A-PRP o composición de PRP.
- La formación de un coágulo es un proceso de múltiples etapas o en cascada y varias de estas etapas requieren la presencia de iones de calcio. Al eliminar los iones de calcio presentes en la sangre completa, como es el efecto cuando la sangre se recoge en citrato, se puede evitar que la sangre se coagule. Un agente quelante de calcio (también denominado en el presente documento anticoagulante) es un compuesto químico que reacciona con el calcio, presente en la sangre, de modo que el calcio ya no puede funcionar en la coagulación de la sangre. El agente quelante más común es una sal de ácido cítrico (citrato), ya que tiene la menor cantidad de efectos secundarios en los componentes del sistema de coagulación. Al recoger sangre en un medio que contiene un agente quelante de calcio tal como citrato, la recogida de muestras y otras preparaciones de la muestra citrada se pueden realizar durante un período de tiempo de hasta varias horas. El agente quelante de calcio preferido es el citrato de sodio.
- Se puede usar una solución tamponada de citrato de sodio a aproximadamente 0,10 M o un citrato de sodio anhidro a aproximadamente 3,5 mg/ml.
- Como alternativa, se pueden usar hirudina, bencilsulfonil-d-Arg-Pro-4-amidinobencilamida (BAPA), heparina, citrato, ácido cítrico-citrato-dextrosa (ACD), citrato-teofilina-adenosina-dipiridamol (CTAD) o potasio-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulantes. La combinación de anticoagulantes se puede usar e inyectar en los tubos de hematología a través de diversos o los mismos inyectores, secuencial o simultáneamente.
- En una divulgación, en lugar de suero de trombina, se puede usar un activador de la coagulación alternativo tal como cloruro de calcio o sacarato de calcio, preferentemente gluconato de calcio.
- En una divulgación, se pueden usar múltiples activadores de la coagulación en combinación, preferentemente suero de trombina con gluconato de calcio y opcionalmente sacarato de calcio.

Ventajosamente, los métodos de la presente divulgación permiten la manipulación de la sangre en un circuito completamente cerrado durante todo el proceso, desde el proceso de fabricación, recogida de sangre, manipulación hasta la aplicación o inyección al paciente. Por lo tanto, todos los dispositivos y kits están adaptados para una manipulación de circuito completamente cerrado con el fin de evitar el contacto directo de la sangre y los tubos de hematología con el aire.

Ventajosamente, los métodos de la presente divulgación reducen el estrés oxidativo y reducen el tiempo de manipulación ex vivo.

Además, la presente divulgación proporciona nuevas formulaciones de A-PRP y/o células frescas que comprenden ácido hialurónico y/o quitosano y que son adecuadas para procesos de fabricación automatizados.

Además del A-PRP o la preparación autóloga de células frescas, existe una necesidad de un soporte mecánico y biológico para la migración y expansión, y eventualmente diferenciación, de las células. Las células y los factores de crecimiento necesitan una matriz provisional para mejorar su expansión biológica.

En un aspecto de la divulgación, una composición de la presente divulgación es útil como matriz, soporte semisólido, medio celular o útil para cualquier cultivo celular. En un aspecto, la invención proporciona una matriz, soporte semisólido o un medio celular que comprende una composición de acuerdo con la invención. En una realización, la matriz, el soporte semisólido o el medio celular comprende ácido hialurónico y/o quitosano, preferentemente una composición de HA y/o quitosano de la presente divulgación. En una realización, la matriz, el soporte semisólido o los medios celulares pueden comprender además un concentrado de plasma, preferentemente PRP. En una divulgación, la matriz, el soporte semisólido o los medios de comunicación celular pueden comprender además factores de crecimiento. En una divulgación, la matriz, el soporte semisólido o los medios celulares pueden comprender además al menos un extracto celular, preferentemente extracto celular fresco o células frescas. Dicho extracto celular puede ser cualquier extracto celular como se desvela en el presente documento, siempre que los extractos celulares no sean extractos de células madre embrionarias. Por ejemplo, se pueden usar células madre adiposas, fibroblastos o células de páncreas. En una realización preferida, la matriz, el soporte semisólido o el medio celular que comprende una composición desvelada en el presente documento se expande in vivo.

Ventajosamente, dicho medio celular es un medio enriquecido favorable para la expansión celular y/o el crecimiento celular. Dichos medios celulares también pueden representar un medio adecuado para el transporte, medios adecuados para la conservación de células, tejidos u órganos. Dichos medios pueden ser útiles para los injertos y pueden preservar las células hasta que se realice el injerto. Una vez aplicada en el paciente, dicha matriz, soporte semisólido o medio celular puede combinarse con un concentrado de plaquetas o PRP. Dichos medios celulares pueden ser adecuados para aplicación clínica, como implantes, para inyección, para aplicación solos o como sustituto óseo, pero también para fines de investigación, por ejemplo para el desarrollo de líneas celulares.

En una divulgación, la concentración total de la composición de HA y PRP, preferentemente una composición de HA y PRP de la presente invención, en un medio celular está entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 60 %, preferentemente el 40 %. Por ejemplo, en un medio celular de HA y PRP, el PRP puede estar presente a una concentración de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 40 %, preferentemente a una concentración de aproximadamente el 20 %, y el HA a una concentración de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 20 %. Una concentración superior al 60 % de HA y PRP parece inhibidora para las células. Dicha composición de HA y PRP se ha probado con células madre adiposas. Ventajosamente, dicha composición puede reemplazar a BSA (albúmina de suero bovino) o una sustancia similar presente en un medio. La composición de HA y PRP puede comprender preferentemente además una solución salina, DMEM, RPMI y/o cualquier otra solución o medio de cultivo adecuado, preferentemente a una concentración de aproximadamente el 60 %.

Preferentemente, la divulgación proporciona una composición que comprende células frescas y factores de crecimiento, en un soporte semisólido de ácido hialurónico o quitosano, preferentemente una composición de HA y/o quitosano de la presente invención, preferentemente expandida in vivo, en el propio paciente.

Por lo tanto, la divulgación también proporciona un nuevo modelo o composición de ingeniería tisular compuesta solo de células frescas y factores de crecimiento, en un soporte semisólido de ácido hialurónico o quitosano, expandido in vivo, en el propio paciente en lugar de un laboratorio remoto.

Otros usos pueden incluir la cicatrización de heridas o para promover el crecimiento óseo o periodontal y/o la regeneración ósea y/o tisular.

Otros usos pueden incluir la fabricación de una preparación cosmética para su uso como agente antienviejecimiento o agente reparador de la piel, como un agente reparador de cicatrices, un agente de relleno y/o reparación de arrugas.

Otros usos pueden incluir la fabricación de una preparación cosmética para su uso como preparación estética, control del envejecimiento, corrector de volumen, sensación de arrugas, reducción de manchas marrones y/o estimulador capilar. Las composiciones se pueden aplicar 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. En una realización, la preparación cosmética y/o preparación estética se combina con un agente cosmético, crema cosmética o máscara cosmética. Otros usos incluyen en estética, por ejemplo, como relleno.

Las presentes formulaciones pueden aplicarse sobre una máscara.

- 5 Otros usos pueden incluir la reconstitución de ligamentos y/o cartílagos. Ventajosamente, el tiempo de reconstitución de ligamentos y/o cartílagos usando una composición de la presente invención se divide por un factor 2 o 3 en comparación con los métodos conocidos.

10 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición cicatrizante de heridas, composición cicatrizante de tejidos, composición celular, composición de concentrado de plaquetas, composición de HA, composición de quitosano, composición de PRP, composición de A-PRP, suero de trombina o agente hemostático de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéutica o cosméticamente aceptable.

15 Otros usos pueden incluir la fabricación de un medicamento para la cicatrización de heridas o tejidos, mesoterapia, intramuscular, o para promover el crecimiento óseo o periodontal y/o la regeneración ósea y/o tisular, tal como regeneración de piel, cartílago, músculo, tendón, tejido adiposo, córnea, nervios periféricos, columna vertebral u ósea.

Otros usos pueden incluir la fabricación de una preparación cosmética para su uso como agente antienvjecimiento o agente reparador de la piel, tal como agente reparador de cicatrices, agente reparador de lipoatrofias o agente de relleno y/o reparación de arrugas.

20 Otros usos pueden incluir la regeneración y/o el rejuvenecimiento de tejidos, huesos y/o cartílagos. Otros usos pueden incluir el tratamiento de úlceras neuropáticas diabéticas o úlceras por decúbito; daños en huesos y cartílagos tales como cartílago articular profundo o daños condrales tales como reparación quirúrgica de tendones desgarrados; artritis en las articulaciones causada por traumas o por envejecimiento; trastornos del manguito rotador; heridas que no cicatrizan tales como heridas que no cicatrizan tales como heridas inducidas por vasculitis, por ejemplo en extremidades equinas inferiores; enfermedades periodontales; cirugía de implantes; cirugía cardiovascular, torácica, de trasplante, de cabeza y cuello, oral, gastrointestinal, ortopédica, neuroquirúrgica y plástica; mesoterapia y/o inyecciones de mesoterapia; daños musculares cardíacos tales como insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca, trastornos isquémicos y no isquémicos, cardiomiopatía; enfermedad por reflujo gastroesofágico; incontinencia anal o urinaria; cirugía facial tal como alopecia inducida por cirugía facial (alopecia debido a la pérdida del folículo piloso en las áreas de quemaduras laterales), pérdida de cabello, alopecia, cirugía de estiramiento facial (ritidectomía), rinoplastia, injertos de grasa dérmica (en el tratamiento del aumento facial, hemiatrofia congénita de la cara, tal como atrofia nasal congénita del cartílago y lipoatrofia, tal como en pacientes que padecen VIH/SIDA, disfunción genital, erosión y artroscopia); complicaciones de cicatrización de heridas tales como después de una blefaroplastia de párpados; trastornos corneales tales como opacidad corneal tal como las causadas por quemaduras químicas, aflicción por el síndrome de Steven Johnson y úlceras corneales; formación de tejido cicatricial en la córnea; síndrome del ojo seco; enfermedades hematológicas tales como talasemia; daño al nervio periférico, sutura nerviosa y lesión de la médula espinal; defectos o trastornos óseos tales como injerto óseo o fractura ósea, daños en la piel o trastornos tales como el acné (especialmente después del tratamiento de dermoabrasión), quemaduras, cicatrices de rubéola o viruela, vitíligo, lipoatrofia, sarcoma de Kaposi, queloides de la piel o fibromatosis palmar de Dupuytren.

40 Otros usos pueden incluir la cicatrización de tejidos, incluida la regeneración y reparación ósea, mitogénesis, angiogénesis y/o activación de macrófagos.

45 Las ventajas adicionales y las características novedosas de esta invención se expondrán en parte en la descripción que sigue, y en parte serán evidentes para los expertos en la materia al examinar la siguiente memoria descriptiva o pueden ser aprendidas por la puesta en práctica de la invención. Los objetos y ventajas de la invención pueden realizarse y alcanzarse por los medios indicados en las reivindicaciones adjuntas.

Otros usos pueden incluir particularmente la hemostasia, la regeneración, revitalización, hidratación y/o estimulación de tejidos, como pegamento biológico, sellador bioadhesivo o relleno biológico.

Otros usos pueden incluir particularmente el cuidado de heridas, cirugía, inyecciones para ortopedia e inyecciones para correcciones estéticas, cosméticas o de volumen.

50 Otros usos pueden incluir la regeneración y/o el rejuvenecimiento de los tejidos de la piel, particularmente para promover y/o iniciar la regeneración de la piel, tal como reducir las arrugas de la piel, arrugas profundas, acné (especialmente después del tratamiento de dermoabrasión), quemaduras, cicatrices de rubéola o viruela, vitíligo y lipoatrofia (por ejemplo, composiciones antienvjecimiento y composiciones de regeneración de la piel), mejora de las líneas nasolabiales y tratamiento de daños o trastornos de la piel, tales como quemaduras cutáneas, sarcoma de Kaposi, queloides de la piel o fibromatosis palmar de Dupuytren, en la reducción del dolor asociado con la regeneración de la piel y los tejidos, para almohadillas hemorroidales, disfunción eréctil, caverna, fibrosis de cuerpos

cavernosos, enfermedad de La Peyronie, vagina y/o labios.

Otros usos pueden incluir la cicatrización de heridas o tejidos, tratamientos de regeneración o medicina deportiva para la rodilla, el codo, los músculos (desgarrados), la médula espinal, un disco vertebral, tendón, ligamento, el tratamiento de heridas traumáticas o quirúrgicas, tal como el ajuste y/o la retención y/o el sellado de injertos nativos o protésicos (especialmente piel, injertos óseos y/o prótesis dentales o implantes o similares, incluido también el sitio donante de injerto); tratamiento de artritis, artrosis, gonartritis, tendinitis, manguito rotador, tratamiento de vasculitis; úlceras tales como úlceras neuropáticas diabéticas o úlceras por decúbito; radiodermatitis (por ejemplo, después de la irradiación sobre un carcinoma epidermoidal de piel) y fístulas de cierre (tales como para ciclistas).

Otros usos pueden incluir el tratamiento de trastornos cardíacos, regeneración cardíaca tal como en el tratamiento de insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca isquémica y no isquémica y cardiomiopatía.

Otros usos pueden incluir el tratamiento de la incontinencia urinaria y/o anal.

Otros usos pueden incluir el tratamiento de la esofagitis por reflujo y/o el trastorno por reflujo gastroesofágico.

Otros usos pueden incluir el tratamiento de daños en la piel, tal como en pieles dañadas por radiaciones (radiodermatitis o piel dañada por el sol), pieles envejecidas o quemadas y/o en la mejora de arrugas faciales, rítid, acné (especialmente después del tratamiento de dermoabrasión), quemaduras, cicatrices de rubéola o viruela, vitíligo, lipoatrofia o lipodistrofia, sarcoma de Kaposi, queloides de la piel o fibromatosis palmar de Dupuytren y/o en tratamientos de rejuvenecimiento de la piel.

Otros usos pueden incluir el tratamiento de la lipoatrofia, como en pacientes con VIH/SIDA y en otras hemiatrofias congénitas de la cara, tales como la atrofia nasal congénita del cartílago. Otros usos pueden incluir el tratamiento de huesos, cartílagos y trastornos articulares tales como daño condral, artritis, artrosis, cartílago y/o lesiones óseas como daño y/o erosión de cartílago profundo y/o artroscopia, rotura de tendones y manguito rotador en el hombro.

Otros usos pueden incluir el tratamiento de enfermedades hematológicas tales como la talasemia.

Otros usos pueden incluir el tratamiento de trastornos corneales como el síndrome del ojo seco; opacidad corneal tal como las causadas por quemaduras químicas, aflicción por el síndrome de Steven Johnson; formación de tejido cicatricial en la córnea y úlceras corneales.

Otros usos pueden incluir particularmente el tratamiento del daño a los nervios periféricos, daño a las células de Schwann, daño a las células gliales, daño a las neuronas, sutura nerviosa y lesión de la médula espinal.

Otros usos pueden incluir particularmente el tratamiento de la diabetes tipo I, diabetes dependiente de insulina y/o hiperglucemia.

Otros usos pueden incluir el tratamiento de defectos óseos o trastornos tales como el injerto óseo o la fractura ósea.

El uso de la composición resultante de la invención puede modificarse adicionalmente antes de la aplicación y de acuerdo con el objetivo terapéutico.

Las composiciones de la invención pueden usarse junto con materiales de relleno óseo, especialmente materiales de relleno reabsorbibles tales como hidroxiapatita (cerámica de fosfato de calcio usada como biomaterial) o hueso desmineralizado, o utilizarse como una mezcla con extractos óseos en un proceso para el recrecimiento óseo por ejemplo en procedimientos craneofaciales y ortopédicos.

Otros usos pueden incluir ortopedia, por ejemplo, como viscosuplementación o para reconstrucción ósea usando una combinación de las presentes formulaciones con células madre, extracto celular y/o TCP, siempre que las células o extractos celulares no sean células o extractos de células madre embrionarias.

Otros usos pueden incluir como sellador de heridas en cirugía plástica incluyendo injerto de quemaduras y otras aplicaciones de injerto de piel libre, por ejemplo en oncología para favorecer la regeneración de tejidos, incluida para acelerar la (neo)vascularización. Otros usos pueden incluir tratamientos de cicatrización de heridas en el sitio donante de injerto de piel.

Otros usos pueden incluir el cuidado de heridas como pegamento biológico, por ejemplo para quemaduras o úlceras diabéticas.

Otros usos pueden incluir particularmente el tratamiento de heridas crónicas que pueden carecer de circulación sanguínea suficiente para facilitar la cascada de cicatrización de heridas.

Otros usos pueden incluir el tratamiento de la enfermedad periodontal donde se observa una pérdida y/o daño de los tejidos periodontales, comprendiendo dicho tratamiento, por ejemplo, colocar en el sitio o la cavidad periodontal en un ser humano o un animal inferior que necesita regeneración de tejido periodontal una composición de acuerdo con

la divulgación. Otros usos pueden incluir eliminar o reducir en gran medida el sangrado postoperatorio y la extravasación o pérdida de fluido seroso u otro en estas aplicaciones, reduciendo el riesgo de infección causado por la mayoría de las bacterias y/o mejorando la formación de tejido conectivo en comparación con la cicatrización natural (es decir, sin agentes exógenos añadidos) o mejorar la cicatrización obtenida mediante el uso de otros concentrados de plaquetas, composiciones de PRP preparadas con métodos conocidos.

Otros usos pueden incluir particularmente promover y/o iniciar la cicatrización de heridas y/o la regeneración de tejidos o para la preparación de composiciones cosméticas para la regeneración de la piel, tal como la reducción de arrugas de la piel, acné (especialmente después del tratamiento de dermoabrasión), cicatrices de rubéola o viruela, vitíligo y lipoatrofia (por ejemplo, composiciones antienvjecimiento y composiciones de regeneración de la piel).

Las composiciones obtenidas mediante los procesos de fabricación de la presente divulgación pueden administrarse localmente o inyectarse en la herida o en el órgano injertado o cerca de este, o inyectarse por vía subcutánea. La administración local puede ser por inyección en el sitio de la lesión o defecto o por inserción o unión de un vehículo sólido en el sitio, o por mezcla con una crema o emulsión, o por inclusión en un tejido o papel o vehículo de hidrogel, o por aplicación tópica directa de la composición de la invención, tal como en forma de gotas para los ojos. Preferentemente, las composiciones son composiciones fácilmente inyectables con jeringa. La vía de administración, la dosis administrada, como dosis únicas o múltiples, a un individuo variará dependiendo de una variedad de factores, incluidas las propiedades farmacocinéticas, las condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), alcance de los síntomas, tratamientos concurrentes, frecuencia de tratamiento y el efecto deseado.

Las composiciones de la divulgación o las composiciones obtenidas mediante los procesos de fabricación de la presente divulgación pueden administrarse en combinación con un coagente útil en el tratamiento de la regeneración de tejidos, tal como un agente de cicatrización, un relleno de arrugas, un agente antienvjecimiento tal como un complejo vitamínico antienvjecimiento, un agente antibacteriano, un agente antibiótico, un agente corticosteroide, un agente analgésico y antálgico, o un agente anestésico como la adrenalina, etc. Las composiciones obtenidas por los procesos de fabricación de la presente divulgación pueden combinarse con un coagente útil en el tratamiento de la regeneración de tejidos para uso simultáneo, separado o secuencial en la terapia de regeneración de tejidos, tal como cicatrización de heridas, reparación de crecimiento de hueso y periodonto.

Otros usos pueden incluir el uso terapéutico, particularmente como pegamento biológico autógeno en un sistema hemostático destinado a acelerar el proceso fisiológico de regeneración de tejidos, por ejemplo en implantología dental, cirugía de piel y huesos, cirugía de cartílago y tendón, ortopedia, regeneración de nervios corneales y periféricos y cirugía cardíaca. Otros usos pueden incluir particularmente el uso cosmético, particularmente como material de rejuvenecimiento autógeno destinado a usarse, por ejemplo, como relleno de arrugas, cicatrices o deficiencia de grasa, solo en combinación con al menos un agente antienvjecimiento. Otros usos pueden incluir particularmente la aceleración y/o promoción del proceso de cicatrización de heridas, incluso heridas crónicas que no cicatrizan, que conducen a cierres exitosos donde semanas de terapias convencionales han fallado y logran una disminución en los riesgos de infección, una mejora en la recuperación y la comodidad del paciente, una reducción de los costes de atención médica y un mejor resultado final estético.

Las composiciones, los tubos de hematología o las jeringas también pueden usar plasma derivado de varios donantes identificados. La divulgación no se limita a materiales biológicos autólogos, tales como la recogida de plaquetas concentradas a partir del propio material biológico herido. La divulgación abarca el uso de materiales biológicos obtenidos de uno o más terceros, que no necesitan ser de la misma especie que el paciente cuya herida está siendo tratada con las composiciones descritas en el presente documento, a menos que se produzca una biocompatibilidad del uso de dichos materiales biológicos de un tercero.

Otros usos pueden incluir sellar una herida quirúrgica aplicando a la herida una cantidad adecuada de concentrado de plaquetas, composición de PRP, composición de A-PRP una vez que ha comenzado a gelificarse. Además, debido a los altos estándares de calidad establecidos para el proceso de fabricación y al hecho de que las composiciones para la cicatrización de heridas o tejidos pueden prepararse únicamente a partir de componentes sanguíneos derivados del paciente que va a recibir las composiciones para la cicatrización de heridas o tejidos, la probabilidad de transmitir una nueva enfermedad de transmisión sanguínea al paciente es nula.

Se puede añadir una amplia variedad de fármacos o proteínas con otras actividades biológicas a las composiciones descritas en el presente documento. Los ejemplos de los agentes a añadir a las composiciones (por ejemplo, antes de la adición del suero) incluyen, pero no se limitan a, compuestos analgésicos, compuestos antibacterianos, incluidos compuestos bactericidas y bacteriostáticos, antibióticos (por ejemplo, adriamicina, eritromicina, gentamicina, penicilina, tobramicina), compuestos antifúngicos, antiinflamatorios, compuestos antiparasitarios, compuestos antivirales, enzimas, inhibidores enzimáticos, glucoproteínas, factores de crecimiento, recombinados (por ejemplo, linfocinas, citocinas), hormonas, esteroides, glucocorticoides, inmunomoduladores, inmunoglobulinas, minerales, neurolépticos, proteínas, péptidos, lipoproteínas, compuestos tumorocidas, compuestos tumoristáticos, toxinas y vitaminas (por ejemplo, vitamina A, vitamina E, vitamina B, vitamina C, vitamina D o derivados de las mismas).

En una realización, las composiciones descritas en el presente documento pueden mezclarse con un activador de la

coagulación, suero de trombina, fosfato tricálcico (TCP), un sustituto óseo, composición de ácido hialurónico, gluconato de calcio, sacarato de calcio, quitosano, fibroínas, proteínas de fibroína de seda, factores de crecimiento, manitol, colágeno, albúmina, ácido ascórbico, crema, células grasas, tejido adiposo, concentrado de médula ósea, lubricina, cd-gelatina, toxina botulínica y/o uno o más extractos celulares, que no son extractos de células madre embrionarias. Dichas sustancias pueden combinarse durante la preparación de los tubos o jeringas de hematología (a través de, por ejemplo, un inyector) o después de la preparación de los tubos o jeringas de hematología como se describe en el presente documento.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se han probado diferentes ácidos hialurónicos para la esterilización de acuerdo con la tabla 1.

Tabla 1

Nombre	Lote	Viscosidad intrínseca (m ³ /kg)	Peso molecular promedio (KDa)
HA1	H1909S01	1,08	720
HA2	H1289S01	1,91	1550
HA3	H2046	2,52	2480
HA4	H2143	3,19	3480
HA 500 KDa	PHI2168S02	0,81	500
HA 4100KDa	PHI2374	3,57	4100

Las diferentes soluciones de HA HA1, HA2, HA3 y HA4 se han probado en condiciones normales (control), después de la esterilización con vapor (8 minutos a 105 °C) o irradiación Gamma (ciclo normal de producción).

Las texturas y la apariencia de las diferentes soluciones originales HA1, HA2, HA3 y HA4 se muestran en la tabla 2.

Tabla 2

	Textura/apariencia		
	2 %	3 %	4 %
HA1	Líquida (gelificada), incolora	Líquida (gelificada), incolora	Líquida (gelificada), incolora
HA2	Líquida (gelificada), incolora	Líquida (gelificada), incolora	Líquida (gelificada), incolora
HA3	Líquida (gelificada), incolora	Líquida (gelificada), incolora	Líquida (gelificada), incolora
HA4	Líquida (gelificada), incolora	Líquida (gelificada), incolora	Líquida (gelificada), incolora

Las soluciones se consideran "sólidas" cuando no fluyen y pueden mantener su forma original. El estado de gel se refiere a una viscosidad persistente particular.

Las diferentes soluciones de HA HA1, HA2, HA3 y HA4 después de la irradiación gamma se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

	Textura/apariencia		
	2 %	3 %	4 %

HA1	Líquida, marrón	Líquida, marrón	Líquida, marrón
HA2	Líquida, marrón	Líquida, marrón	Líquida, marrón
HA3	Líquida, marrón	Líquida, marrón	Líquida, marrón
HA4	Líquida, marrón	Líquida, marrón	Líquida, marrón

El color marrón de todas las diferentes soluciones de HA significa una probable desnaturalización o alteración del HA después de la irradiación gamma.

5 La solución HA2 se ha probado en diversas concentraciones después de la esterilización con vapor como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4

	Textura/apariencia		
	2 %	3 %	4 %
HA2	Gelificada, incolora	Gelificada, incolora	Gelificada, incolora

La esterilización por radiación gamma es inadecuada. Solo la esterilización con vapor permite la conservación de la apariencia original del HA y el mantenimiento de la función del HA, por ejemplo, en la viscosuplementación.

10 Ejemplo 2

Se han realizado medidas de viscosidad en diferentes soluciones de ácido hialurónico y mezclas de ácido hialurónico y PRP.

La viscosidad medida de las diferentes soluciones de HA HA1, HA2, HA3, HA4 se muestra en la tabla 5.

Tabla 5

	Viscosidad inicial promedio (mPa.s)	Viscosidad después de irradiación gamma (mPa.s)	Viscosidad después de esterilización con vapor (8' a 105 °C)
HA1 - 2 %	2700	300	N/A
HA1 - 3 %	8400	0	N/A
HA1 - 4 %	18700	300	N/A
HA2 - 2 %	8070	100	6280
HA2 - 3 %	19000	100	(*) (8' a 105 °C)
HA2 - 4 %	22250	0	(*) (8' a 105 °C)
HA3 - 2 %	9800	0	N/A
HA3 - 3 %	15200	0	N/A
HA3 - 4 %	31200	0	N/A
HA4 - 2 %	9100	0	N/A
HA4 - 3 %	20300	0	N/A
HA4 - 4 %	31000	100	N/A
500 KDa - 1 %	0	-	-
500 KDa - 2 %	300	-	-

500 KDa - 3 %	5700	-	-
500 KDa - 4 %	10100	-	-
4000 KDa - 1 %	3200	-	-
4000 KDa - 2 %	11400	-	10340
4000 KDa - 3 %	22000	-	-

La viscosidad se ha medido para varios HA (véase la figura 17). La viscosidad aumenta con el peso molecular y/o la concentración de HA, véase también la figura 18.

5 La esterilización por radiación gamma reduce en un 95 %-100 % la viscosidad de HA, confirmando la desnaturalización y/o los enlaces escindidos implicados en la viscosidad.

La esterilización con vapor permite la conservación o incluso la mejora de la viscosidad de la solución de HA.

10 En la tabla 7 se muestran medidas de viscosidad en mezclas de ácido hialurónico y PRP en un total de 18 pacientes. El HA2 se probó a una concentración del 2 %. Los tubos han sido esterilizados con vapor antes de su uso. Se han probado 4 ml de mezcla PRP-HA, en igual cantidad. El control se realiza sobre una mezcla de HA y suero fisiológico en igual cantidad y se muestra en la tabla 6.

Tabla 6

Control	(mPa.S)
1	400
2	300
3	300
Promedio	333
SEM	44

Tabla 7

Paciente	Viscosidad (mPa.S)	Viscosidad (mPa.S)
Paciente 6	200	250
Paciente 7	400	500
Paciente 8	400	500
Paciente 9	350	500
Paciente 10	200	300
Paciente 11	200	400
Paciente 12	400	600
Paciente 13	500	350
Paciente 14	200	250
Paciente 15	400	450
Paciente 16	500	550
Paciente 17	400	300

Paciente 18	300	300
Paciente 19	600	450
Paciente 20	300	300
Paciente 21	200	450
Paciente 22	200	400
Paciente 23	200	300
Media	331	397
SEM	108	92

La tabla 8 muestra las diferentes soluciones probadas, las mezclas de HA difieren en peso molecular y concentración (soluciones F a I).

Tabla 8

	500 KDa (%)	4000 KDa (%)
F	1	1,5
G	1,5	1,5
H	2	1,5
I	2	1,25

5

Las viscosidades de las mezclas de PRP-HA (F a I) son comparables a los controles Ostenil (véase la tabla 9). La viscosidad permanece estable *in vitro*, lo que indica una buena estabilidad de la mezcla a temperatura ambiente. Al tener el PRP una viscosidad similar al agua (0 mPa.s), la adición de HA es un medio fiable para aumentar la viscosidad de PRP.

10 Tabla 9

	Textura	Viscosidad (mPa.S)	Viscosidad después del vapor (mPa.S)
F	gelificada	12700	11133
G	gelificada	13200	-
H	gelificada	14200	-
I	Gelificada, menos viscosa que H	9400	-
Ostenil 1 %*	Líquida, no fluida, no pegajosa	-	2000
Ostenil 2 %*	Líquida, no fluida, escasamente pegajosa	-	12100

Se probó el flujo con jeringa y aguja 25G para las diversas soluciones (tabla 10). Las soluciones F e I pueden fluir y son adecuadas para aplicación industrial.

Tabla 10

	Flujo
F	+
G	-

H	-
I	+
Ostenil 1 %*	+++++
Ostenil 2 %*	++

La textura de la solución F garantiza la mejor viscosidad con buena capacidad de manipulación. Ventajosamente, procura una mayor concentración de HA (aproximadamente 2,5 %) al tiempo que garantiza una reabsorción lenta. La solución I también es aceptable, proporcionando una mayor concentración de HA de aproximadamente 3,25 %.

- 5 Ventajosamente, las formulaciones de HA de la presente invención no requieren la presencia de un adyuvante como Ostenil. Se añade manitol al Ostenil al 2 % para estabilizar el ácido hialurónico. Ostenil es un HA de peso molecular único. La presencia de un HA de alto peso molecular en las soluciones de la presente invención procura estabilidad. Además, ventajosamente, el HA de alto peso molecular tiene un efecto duradero porque se metaboliza más lentamente que un HA de menor peso molecular como Ostenil.
- 10 Por el contrario, la presencia de HA de bajo peso molecular en las soluciones de la presente invención puede favorecer el crecimiento celular. Ventajosamente, se metabolizará más rápidamente, con una acción más rápida sobre la viscosuplementación, porque un HA de bajo peso molecular es más penetrante que un HA de mayor peso molecular como Ostenil.

Ejemplo 3

15 Material y métodos

A) DISEÑO DEL ESTUDIO

- La sangre completa recogida de 23 donantes se procesó usando dos dispositivos en paralelo llamados tubo RegenBCT para la preparación de PRP solo y tubo RegenBCT-HA para una preparación que combina PRP y ácido hialurónico. Con el fin de establecer el rendimiento con respecto a la separación de los componentes sanguíneos, se
- 20 llevaron a cabo las siguientes medidas usando la sangre completa y el PRP correspondiente a tiempo 0 (T = 0) y 4 horas después de la extracción de sangre (T = 4 h):

- valores de pH
- Recuentos de células sanguíneas y plaquetas
- Evaluación de la recuperación de plaquetas y células, y factor de concentración de plaquetas

- 25 Además, para establecer la integridad y la funcionalidad de las plaquetas, se llevaron a cabo los siguientes experimentos usando el PRP obtenido con los dos dispositivos a las 0 y 4 horas después de la recogida de sangre:

- expresión de selectina P en reposo y plaquetas activadas por ADP
- Respuesta al estrés hipotónico de las plaquetas
- Agregación plaquetaria en presencia de colágeno

- 30 BCT en el presente documento significa terapia de células sanguíneas o tubos de recogida de sangre.

B) SISTEMAS DE SEPARACIÓN DE PLAQUETAS

Tubo RegenBCT

- El tubo RegenBCT es un tubo de vacío en el que se recogen automáticamente de 8 a 9 ml de sangre. Usa un gel tixotrópico para la separación celular y citrato de sodio como agente anticoagulante. Después de la centrifugación,
- 35 los componentes sanguíneos se separan. Los glóbulos rojos están secuestrados debajo del gel, mientras que las plaquetas y el plasma están sobre el gel. Durante la centrifugación, las plaquetas y las células sanguíneas restantes se han asentado en la superficie superior del gel, por lo tanto, deben volver a suspenderse en el plasma antes de recogerlo. Esto se hace mediante una suave inversión de los tubos. El plasma rico en plaquetas se puede recoger fácilmente del tubo directamente en la jeringa que se usará para inyección.

40 Tubo RegenBCT-HA

El tubo RegenBCT-HA es una variante del tubo RegenBCT. Usa la misma tecnología de gel para producir PRP, sin embargo, a partir de aproximadamente de 5 ml de sangre. Además, este tubo también contiene ácido hialurónico

que se combinará con el PRP. Antes de la extracción de sangre, el ácido hialurónico está en el fondo del tubo, cubierto por el gel de separación y el anticoagulante. Durante la centrifugación, los glóbulos rojos migrarán al fondo del tubo mientras que el ácido hialurónico se moverá en la parte superior o en el tubo. Al final de la centrifugación, los glóbulos rojos son secuestrados debajo del gel, el plasma con las plaquetas está sobre el gel, cubierto por la capa de ácido hialurónico. Al igual que en los tubos RegenBCT, los elementos celulares y las plaquetas se depositarán en la superficie del gel y se deben volver a suspender agitando suavemente el tubo. El ácido hialurónico se mezcla con el PRP y se recoge con la jeringa que se usará para inyección.

C) RECOGIDA DE SANGRE

Se recogió sangre de 23 voluntarios durante un período de dos semanas. Cada donante fue informado del procedimiento y dio un consentimiento informado por escrito.

Se extrajeron aproximadamente 24 ml de sangre de la vena cubital medial de cada donante usando un conjunto de recogida de sangre BD Vacutainer®Safety-Lok™ conectado a un soporte de recogida BD (Becton Dickinson AG, Suiza) en el que se insertan los tubos de vacío para recogida automática de sangre. Para cada donante, se extrajo sangre en un tubo RegenBCT y tres tubos RegenBCT-HA para las preparaciones PRP y PRP + HA, y se recogieron cuatro ml de sangre en un pequeño tubo de citrato BD Vacutainer® (Becton Dickinson AG, Suiza) para la determinación de valores de sangre completa.

El volumen de sangre en cada dispositivo se determinó mediante pesaje.

D) ANÁLISIS DE LA PREPARACIÓN DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP)

Preparación de PRP

Los PRP se obtuvieron por centrifugación de los dos tipos de dispositivos de acuerdo con su protocolo respectivo. Los tubos se centrifugaron, usando un RegenPRP Centri (Regen Lab SA; Suiza), 5 min. a 3400 rpm, velocidad correspondiente a una fuerza centrífuga relativa de 1500 g. Todas las centrifugaciones se realizaron a temperatura ambiente ($\approx 22^\circ\text{C}$).

Después de la centrifugación, el tubo RegenBCT se agitó suavemente por inversión de 5 a 10 veces para resuspender las plaquetas y las células, que se habían asentado en la superficie superior del gel de separación, en el plasma. El volumen de PRP obtenido se midió usando una jeringa Luer-Lok™ de 5 ml conectada a una aguja BD Blunt Fill 18G.

En los tubos RegenBCT-HA, los componentes de la sangre fueron separados por el gel de separación como en el tubo RegenBCT, pero el plasma estaba cubierto por la capa de ácido hialurónico.

Desafortunadamente, debido a la viscosidad del producto, la mezcla de PRP con ácido hialurónico no puede usarse en el contador celular hematológico automatizado y para la prueba de agregación plaquetaria. Para sortear este problema, se extrajo sangre en tres tubos RegenBCT-HA para cada donante. Se usó un tubo para preparar la mezcla de PRP con ácido hialurónico, mientras que los otros dos tubos se usaron para evaluar el PRP solo, uno para tiempo $T = 0$ y el otro para las medidas después de cuatro horas.

En el primer tubo RegenBCT-HA (grupo A), las plaquetas y las células, que se habían asentado en la superficie del gel de separación, se resuspendieron en el plasma mediante inversión suave. Posteriormente se mezcló el PRP resultante con el ácido hialurónico y se midió el volumen de la mezcla de PRP-HA usando una jeringa Luer-Lok™ de 5 ml conectada a una aguja BD Blunt Fill 18G. La mezcla de PRP-HA se usó para medir el pH y la funcionalidad e integridad de las plaquetas en la mezcla se probaron por su capacidad para expresar selectina P en respuesta a la estimulación de ADP y para resistir un estrés hipotónico.

En el segundo tubo RegenBCT-HA (grupo B), directamente después de la etapa de centrifugación, la capa superior de ácido hialurónico se retiró suavemente por aspiración en una jeringa Luer-Lok™ de 5 ml conectada a una aguja de BD Blunt Fill 18G. Mientras hacía esto, también se recogió parte de la parte superior del plasma. Este plasma se consideró libre de elementos celulares, ya que las plaquetas y las células todavía se sedimentaban en la superficie del gel de separación. El volumen de ácido hialurónico y plasma extraído se evaluó mediante ponderación. Las plaquetas y las células se resuspendieron en el plasma restante mediante una suave inversión del tubo. El volumen de PRP obtenido se midió usando una jeringa Luer-Lok™ de 5 ml conectada a una aguja BD Blunt Fill 18G. Este PRP se usó para evaluación de los recuentos de plaquetas y células y la agregación de plaquetas en respuesta al colágeno a tiempo $T = 0$.

El tercer tubo RegenBCT-HA (grupo C) se dejó intacto después de la centrifugación en posición vertical durante cuatro horas. A tiempo $T = 4$ h, la capa superior de ácido hialurónico se retiró suavemente por aspiración, siguiendo el mismo procedimiento que se realizó a tiempo $T = 0$ para el tubo RegenBCT-HA del grupo B. El PRP obtenido se usó para evaluar los recuentos de plaquetas y células y la agregación plaquetaria en respuesta al colágeno a tiempo $T = 4$ h.

Como el ácido hialurónico y el volumen plasmático libre de células que se retiró se evaluaron para cada tubo RegenBCT-HA de los grupos B y C, se pudo estimar mediante cálculo la concentración final de los diferentes elementos sanguíneos en esos tubos.

Determinación de pH

- 5 El pH de las preparaciones de sangre completa, PRP y PRP-HA se midió usando un medidor de pH MP 230 conectado a un electrodo Inlab® Semi-Micro (Mettler Toledo, Suiza). El medidor de pH se calibró diariamente usando soluciones tamponadas estandarizadas Fluka de pH 7 y pH 4 (Sigma Aldrich Chemie, Suiza).

Recuentos de células sanguíneas y plaquetas

- 10 El recuento de células sanguíneas y plaquetas en sangre completa y preparaciones de PRP se llevaron a cabo usando un analizador de hematología automatizado Micros 60 (Horiba ABX, Montpellier, Francia). Las pruebas de control de calidad del analizador se realizaron cada día de mediciones con sangre de control (Minotrol 16-2N, Horiba ABX, Montpellier, Francia).

Recuperación de plaquetas y células

- 15 Los porcentajes de recuperación de plaquetas y células, obtenidos usando los tubos RegenBCT y RegenBCT-HA, así como los factores de concentración de plaquetas, se determinaron usando las siguientes fórmulas:

$$\text{Recuperación \%} = \frac{(\text{volumen de PRP}) \times (\text{concentración en PRP}) \times 100}{(\text{volumen de sangre completa}) \times (\text{concentración en sangre completa})}$$

$$\text{Factor de concentración} = \frac{(\text{concentración en PRP})}{(\text{concentración en sangre completa})}$$

E) EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE PLAQUETAS

- 20 Con el fin de verificar su integridad y funcionalidad, las plaquetas obtenidas con tubos RegenBCT y RegenBCT-HA se analizaron para la expresión de selectina P, la respuesta al estrés hipotónico y la agregación a tiempo 0 y 4 horas después de la recogida de sangre.

Evaluación de selectina P por tinción de inmunofluorescencia directa

Se cuantificaron dos marcadores de plaquetas, CD62P (selectina P) para plaquetas activadas y CD61 (Integrina β3), que es un marcador de plaquetas independiente de la activación.

- 25 Las mezclas de PRP-HA se diluyeron cuatro veces, y PRP a una concentración de 40×10^6 plaquetas/ml, con una solución salina fisiológica. Se activaron diez µl de suspensión de plaquetas diluidas con 10 µl de difosfato de adenosina (ADP) (Applichem, AxonLab, Suiza) a una concentración final de 20 µM, mientras que 10 µl de solución salina tamponada con fosfato de Dubelcco (PBS) (Gibco, Invitrogen, Reino Unido) se añadieron en controles. Las diferentes partes alícuotas de las suspensiones de plaquetas se incubaron con 15 µl de CD61 antihumano FITC (BioLegend, EE. UU.) y 15 µl de CD62P antihumano PE (BioLegend, EE. UU.) Durante 20 min. a temperatura ambiente. Se bloquearon las reacciones y se fijaron las plaquetas mediante la adición de 450 µl de una solución fría (4 °C) de formaldehído al 1 % (Fluka, Sigma Aldrich Chemie, Suiza) en PBS.

- 35 Las preparaciones de PRP teñidas se analizaron para determinar su contenido de inmunofluorescencia usando un C6 Flow Cytometer® (Accuri Cytometers Ltd., Reino Unido) disponible en el centro de citometría de flujo de la Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Suiza. Los datos sin procesar se analizaron usando el software CFlow® (Accuri Cytometers Ltd., Reino Unido). El control de calidad del instrumento fue realizado diariamente por el jefe de la instalación central. La población de plaquetas se identificó por sus características de dispersión de luz y su identidad se confirmó con la tinción de CD61. La expresión de CD62P en plaquetas se midió en la población acotada positiva para CD61.

- 40 Respuesta al estrés hipotónico

- La respuesta plaquetaria al estrés hipotónico se evaluó usando el método descrito por Farrugia et al (J Clin Pathol 1989; 42: 1298-1301). Se colocaron 450 µl de las diferentes suspensiones de plaquetas, previamente diluidas con una solución salina fisiológica a una concentración de 40×10^6 plaquetas/ml para RegenBCT PRP y cuatro veces para la mezcla de PRP-HA, en una microcelda de un solo uso en el portaceldas del espectrofotómetro de un Photometer 4010 (Clinicon, Alemania). El estrés hipotónico se indujo mediante la adición de 450 µl de agua destilada y la

variación en la absorbancia de la luz a 405 nm se controló durante un período de 5 min. La diferencia entre las lecturas de absorbancia a los 5 minutos y a los 30 segundos (absorbancia mínima) se definió como la respuesta al estrés hipotónico (HSR) de la preparación de plaquetas.

Agregación plaquetaria

5 La agregación plaquetaria en respuesta al colágeno se realizó por medición turbidimétrica de la suspensión celular en un agregómetro APACT 4 (LABiTec Labor BioMedical Technologies GmbH, Alemania). Esta prueba no se pudo realizar en mezclas de PRP-HA debido a la viscosidad de las preparaciones, por lo tanto, esta prueba se realizó solo en preparaciones de PRP.

10 El plasma rico en plaquetas no es muy permeable a la luz de longitud de onda larga, pero el plasma libre de plaquetas, por otro lado, es más permeable. El aumento de la capacidad de transmisión de luz del plasma, que ocurre durante la agregación plaquetaria, puede usarse para la cuantificación de la agregación. Las medidas se realizan a 37 °C en microcubetas (Cuvettes Dispo System, Endotell AG, Suiza) que contienen un pequeño agitador magnético para agitar constantemente la preparación. Para ajustar las diferencias de transmisión, que ocurren para diversos plasmas ricos en plaquetas, PRP se establece en un valor del 0 % de transmisión y plasma pobre en plaquetas (PPP), que ocurre después de la agregación completa, a un valor del 100 % de transmisión.

15 Se obtuvieron 200 µl de PPP para cada muestra por centrifugación a 1500 g durante 3 minutos de 250 µl del PRP correspondiente y se recogió el sobrenadante libre de plaquetas.

20 La agregación plaquetaria se indujo en PRP mediante la adición de colágeno (Kollagenreagens Horm, Nycomed Austria GmbH, Alemania) a una concentración final de 10 µg/ml. La modificación de la turbidimetría se registró durante 5 minutos y la medida al final de este período correspondió al porcentaje de agregación.

F) ANÁLISIS ESTADÍSTICO

25 Para todos los parámetros probados, los datos medidos se expresaron como la media $\pm$ desviación estándar (SD). El análisis estadístico se realizó con GraphPad InStat versión 3.10 (GraphPad Software, EE. UU.). Se aplicaron el análisis de medidas repetidas de varianza y la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni (datos emparejados) para analizar si los valores obtenidos en sangre y con los dos dispositivos eran estadísticamente diferentes o no y si eran estables durante cuatro horas. Se utilizaron pruebas de la T para datos emparejados cuando solo se compararon dos grupos de datos.

Resultados

A. ANÁLISIS DE PREPARACIONES DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS

1. Datos de los donantes

Se recogieron muestras de sangre de 23 voluntarios sanos, 15 hombres (M) y 8 mujeres (F), de 23 a 62 años. La edad media fue de 40 ± 11 años.

2. Volúmenes de sangre y PRP

Véase la figura 4

Tabla 11

	Volumen de sangre	Volumen de PRP	Volumen retirado	Mezcla de PRP-HA
RegenBCT PRP	$9,38 \pm 0,54$	$5,13 \pm 0,30$		
RegenBCT-HA A	$5,52 \pm 0,22$			$5,19 \pm 0,31$
RegenBCT-HA B	$5,51 \pm 0,21$	$2,45 \pm 0,44$	$2,69 \pm 0,33$	$5,14 \pm 0,38$
RegenBCT-HA C	$5,47 \pm 0,22$	$2,43 \pm 0,47$	$2,78 \pm 0,38$	$5,21 \pm 0,29$
valor p entre BCT-HA A, B y C	ns $p > 0,05$	ns $p > 0,05$	ns $p > 0,05$	ns $p > 0,05$
Valores medios obtenidos de 23 donantes; (ns: no significativo)				

En los tubos RegenBCT, el volumen medio de PRP obtenido fue $5,13 \pm 0,30$ ml a partir de $9,38 \pm 0,54$ ml de sangre.

Las tres series de tubos RegenBCT-HA dieron resultados similares ($p > 0,05$) con respecto a la recogida de sangre (aproximadamente 5,5 ml) y el volumen de Mezcla de PRP-HA obtenido (aproximadamente 5,2 ml).

El volumen medio de PRP obtenido en tubos RegenBCT-HA del grupo B a tiempo $T = 0$ fue similar al recogido en el grupo C a tiempo $T = 4$ h. En consecuencia, el volumen medio de ácido hialurónico y plasma eliminado en las dos series de tubos también fue equivalente. Los volúmenes finales calculados fueron iguales al volumen final de Mezcla de PRP-HA obtenido en el grupo A.

3. Valores de pH

Véase la figura 5

Tabla 12

	pH a $T = 0$	pH a $T = 4$ h	valor p a $T = 0$ frente a $T = 4$ h
Sangre completa	$7,43 \pm 0,09$	$7,38 \pm 0,08$	ns $p > 0,05$
RegenBCT PRP	$7,67 \pm 0,06$	$7,79 \pm 0,07$	*** $p < 0,001$
RegenBCT-Mezcla de HA	$7,59 \pm 0,09$	$7,67 \pm 0,06$	** $p < 0,01$
Valor p de WB frente a PRP	*** $p < 0,001$	*** $p < 0,001$	
Valor p de WB frente a Mezcla de HA	*** $p < 0,001$	*** $p < 0,001$	
Valor p de PRP frente a mezcla de PRP HA	** $p < 0,01$	*** $p < 0,001$	
Valores medios obtenidos de 23 donantes; (WB: sangre completa; ns: no significativo; **: muy significativo; ***: altamente significativo)			

El pH se evaluó en sangre completa, en PRP obtenido con tubos RegenBCT y en Mezcla de PRP-HA obtenida con los tubos RegenBCT-HA del grupo A.

Todos los valores de pH superaron el límite estándar solicitado por la FDA de 6,2. Los pH del PRP y de la Mezcla de PRP-HA fueron ligeramente más altos que el pH de la sangre, los valores más altos se observaron en el PRP.

Se observó un pequeño aumento del valor de pH de las dos preparaciones de PRP durante las 4 horas del experimento, al contrario del pH de la sangre completa que no varió.

4. Concentración de glóbulos rojos (RBC) en sangre completa y en preparaciones de PRP

Véase la figura 6.

Tabla 13

	RBC $10^6/\text{mm}^3$ a $T = 0$	RBC $10^6/\text{mm}^3$ a $T = 4$ h	valor p a $T = 0$ frente a $T = 4$ h
Sangre completa	$4,51 \pm 0,34$	$4,48 \pm 0,35$	ns $p > 0,05$
RegenBCT PRP	$0,04 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,03$	ns $p > 0,05$
RegenBCT-HA PRP	$0,06 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,14$	ns $p > 0,05$
RegenBCT-Mezcla de HA	$0,03 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,03$	ns $p > 0,05$
Valor p de PRP frente a PRP-HA	ns $p > 0,05$	ns $p > 0,05$	
Valores medios obtenidos de 23 donantes; (ns: no significativo)			

Como se mencionó anteriormente, las células y las plaquetas en la Mezcla de PRP-HA no se pudieron contar con un contador celular hematológico automatizado. Por lo tanto, todas las numeraciones de células y plaquetas se realizaron solo en sangre y preparaciones de PRP. Para RegenBCT-HA, se realizaron numeraciones a tiempo $T = 0$ en PRP obtenido después de la eliminación del ácido hialurónico en tubos RegenBCT-HA del grupo B, mientras que

los resultados a tiempo T = 4 h se midieron en PRP de tubos RegenBCT-HA del grupo C, donde el ácido hialurónico se eliminó solamente después de cuatro horas.

Los tubos RegenBCT-HA presentaron un rendimiento equivalente ($p > 0,05$) en la extracción de glóbulos rojos (recuperación de RBC en la mezcla PRP-HA: $0,49 \pm 0,25$ %) como el tubo RegenBCT (recuperación de RBC en PRP: $0,47 \pm 0,30$ %). Las concentraciones de glóbulos rojos fueron estables durante las 4 horas de la prueba ($p > 0,05$) en sangre y en RegenBCT PRP. No hubo diferencia entre las preparaciones de PRP aisladas de los tubos RegenBCT-HA del grupo B a tiempo $t = 0$ y de los tubos RegenBCT-HA del grupo C a tiempo $t = 4$ h ($p > 0,05$).

Los glóbulos rojos son los componentes sanguíneos más densos, si algunos de ellos todavía están en el plasma al final de la centrifugación, estarán en la superficie superior del gel de separación.

Por lo tanto, se puede suponer que la cantidad de glóbulos rojos fue insignificante en el volumen eliminado de ácido hialurónico y plasma.

La concentración final calculada de glóbulos rojos en las mezclas de PRP-HA fue de $0,03 \times 10^6/\text{mm}^3$.

5. Concentración de glóbulos blancos (WBC) en sangre completa y en preparaciones de PRP

Véase la figura 7

Tabla 14

	WBC $10^3/\text{mm}^3$ a T = 0	WBC $10^3/\text{mm}^3$ a T = 4 h	valor p a T = 0 frente a T = 4 h
Sangre completa	$6,18 \pm 1,89$	$6,09 \pm 1,81$	ns $p > 0,05$
RegenBCT PRP	$1,59 \pm 0,53$	$2,02 \pm 0,71$	ns $p > 0,05$
RegenBCT-HA PRP	$2,50 \pm 1,52$	$2,23 \pm 1,82$	ns $p > 0,05$
RegenBCT-Mezcla de HA	$1,18 \pm 0,72$	$0,99 \pm 0,77$	ns $p > 0,05$
Valor p de PRP frente a PRP-HA	ns $p > 0,05$	ns $p > 0,05$	
Valores medios obtenidos de 23 donantes; (ns: no significativo)			

Ambos tipos de tubos permitieron una reducción de la concentración de glóbulos blancos en PRP en comparación con la sangre completa (WB) ($p < 0,001$, no se muestra en la tabla).

Las diferencias entre los dos tipos de preparaciones de PRP se consideraron estadísticamente no significativas ($p > 0,05$). No se observaron variaciones para la concentración de WBC, en la sangre completa y en las preparaciones de PRP, durante el período de 4 horas ($p > 0,05$ para todos).

En cuanto a la contaminación de glóbulos rojos, los glóbulos blancos recogidos en el plasma están en la superficie superior del gel de separación al final de la centrifugación, por lo tanto, creemos que es poco probable que se pierda una cantidad significativa de ellos cuando se eliminó la capa de ácido hialurónico.

La concentración final estimada de glóbulos blancos en las mezclas de PRP-HA fue de aproximadamente $1 \times 10^3/\text{mm}^3$.

6. Recuperación de glóbulos blancos (WBC) en preparaciones de PRP

Véase la figura 8.

Tabla 15

	% de recuperación de WBC a T = 0	% de recuperación de WBC a T = 4 h	valor p a T = 0 frente a T = 4 h
RegenBCT PRP	$13,63 \pm 5,28$ %	$17,09 \pm 6,10$ %	ns $p > 0,05$
RegenBCT-HA PRP	$17,06 \pm 12,44$ %	$14,56 \pm 10,66$ %	ns $p > 0,05$
Valor p de PRP frente a PRP-HA	ns $p > 0,05$	ns $p > 0,05$	

Valores medios obtenidos de 23 donantes; (ns: no significativo)

No hubo diferencia entre los dos tipos de preparaciones de PRP en el porcentaje de WBC recuperado y los valores fueron estables en el tiempo ($p > 0,05$).

Estos resultados similares respaldaron la hipótesis de los inventores de que la cantidad de glóbulos blancos que podrían haberse eliminado con el ácido hialurónico en RegenBCT-HA fue insignificante.

7. Distribución de glóbulos blancos (WBC) en sangre completa y en preparaciones de PRP

Véase la figura 9.

Tabla 16

	Granulocitos a T = 0	Granulocitos a T = 4 h	Células mononucleares a T = 0	Células mononucleares a T = 4 h
Sangre completa	65 %	64 %	35 %	34 %
RegenBCT PRP	21 %	22 %	79 %	78 %
RegenBCT-HA PRP	18 %	23 %	82 %	77 %
Valores medios obtenidos de 23 donantes				

La distribución en subconjuntos de glóbulos blancos se evaluó en sangre y en preparaciones de PRP.

En sangre completa, la mayoría de los glóbulos blancos (65 %) son granulocitos. Las células restantes (35 %) son las células mononucleares, que son los linfocitos y los monocitos.

El gel de separación en los tubos RegenBCT y RegenBCT-HA permite una reducción de los glóbulos blancos en el PRP con la eliminación preferencial de granulocitos. Esto da como resultado una distribución diferente de los glóbulos blancos en RegenBCT PRP y RegenBCT-HA PRP, con aproximadamente el 20 % de granulocitos y el 80 % de células mononucleares.

No hubo diferencias significativas entre los dos tipos de preparaciones de PRP y los valores fueron estables en el tiempo ($p > 0,05$).

8. Recuperación de subconjuntos de glóbulos blancos en preparaciones de PRP

Véase la figura 10.

Tabla 17

	RegenBCT PRP	RegenBCT-HA PRP	Valores p
Recuperación de células mononucleares	29,77 ± 9,17 %	37,87 ± 25,17 %	ns $p > 0,05$
Recuperación de granulocitos	4,62 ± 2,45 %	5,48 ± 4,92 %	ns $p > 0,05$
Valores medios obtenidos de 23 donantes			

La eliminación preferencial de los granulocitos dio como resultado una recuperación de granulocitos de aproximadamente el 5 %, mientras que se recuperaron aproximadamente el 30 % de las células mononucleares. No hubo diferencias significativas entre los dos tipos de preparaciones de PRP ($p > 0,05$). Los valores fueron estables en el tiempo (datos no mostrados).

9. Concentración de plaquetas (PLT) en sangre completa y en preparaciones de PRP

Véase la figura 11.

Tabla 18

	PLT $10^3/\text{mm}^3$ a T = 0	PLT $10^3/\text{mm}^3$ a T = 4 h	valor p a T = 0 frente a T = 4 h
Sangre completa	251,43 $\pm$ 53,87	244,30 $\pm$ 54,40	ns p> 0,05
RegenBCT PRP	431,87 $\pm$ 106,87	459,26 $\pm$ 93,64	ns p> 0,05
RegenBCT-HA PRP	381,91 $\pm$ 100,15	460,52 $\pm$ 111,75	***p <0,001
RegenBCT-Mezcla de HA	179,24 $\pm$ 48,93	213,12 $\pm$ 63,47	ns p> 0,05
Valor p de WB frente a PRP	***p <0,001	***p <0,001	
Valor p de WB frente a PRP-HA	***p <0,001	***p <0,001	
Valor p de PRP frente a PRP-HA	*p <0,05	ns p> 0,05	
Valores medios obtenidos de 23 donantes; (WB: sangre completa, ns: no significativo; *: significativo, ***: altamente significativo)			

Ambos tipos de tubos permitieron un aumento de la concentración de plaquetas en PRP en comparación con la sangre completa (p <0,001, para ambos tubos).

5 En el tiempo t = 0, la concentración de plaquetas fue mayor en RegenBCT PRP que en PRP de tubos RegenBCT-HA (p <0,05), sin embargo, estos valores fueron equivalentes después de cuatro horas (p> 0,05). El aumento en la concentración de plaquetas a tiempo T = 4 h, observado en el PRP obtenido de los tubos RegenBCT-HA, probablemente se deba a una subestimación de este valor a tiempo T = 0, ya que la concentración de plaquetas fue estable en el tiempo tanto para la sangre como para RegenBCT PRP.

10 La concentración final de plaquetas estimada en las mezclas de PRP-HA fue de $179 \times 10^3/\text{mm}^3$ a T = 0 y $213 \times 10^3/\text{mm}^3$ después de cuatro horas.

10. Factor de concentración de plaquetas en preparaciones de PRP

Véase la figura 12.

Tabla 19

	Factor de concentración de PLT a T = 0	Factor de concentración de PLT a T = 4 h	valor p a T = 0 frente a T = 4 h
RegenBCT PRP	1,71 $\pm$ 0,20	1,85 $\pm$ 0,24	ns p> 0,05
RegenBCT-HA PRP	1,53 $\pm$ 0,36	1,86 $\pm$ 0,45	***p <0,001
RegenBCT-Mezcla de HA	0,71 $\pm$ 0,14	0,85 $\pm$ 0,17	*p <0,05
Valor p de PRP frente a PRP-HA	ns p> 0,05	ns p> 0,05	
Valores medios obtenidos de 23 donantes; (ns: no significativo, *: significativo, ***: altamente significativo)			

15 El factor de concentración de plaquetas fue equivalente para ambos tipos de PRP a T = 0 y cuatro horas después (p> 0,05 en ambos casos). Aunque este valor fue estable en el tiempo para RegenBCT-PRP (p> 0,05), se observó un aumento significativo (p <0,001) de este factor en RegenBCT-HA PRP después de cuatro horas. Esto está en correlación con el aumento observado en la concentración de plaquetas en estos dispositivos a T = 4 horas, probablemente debido a una subestimación del recuento de plaquetas en T = 0.

20 Los factores de concentración final estimados en las mezclas PRP-HA fueron 0,71x y 0,85x respectivamente a tiempo T = 0 y cuatro horas más tarde.

11. Porcentaje de recuperación de plaquetas en las preparaciones de PRP

Véase la figura 13.

Tabla 20

	% de recuperación de PLT a T = 0	% de recuperación de PLT a T = 4 h	valor p a T = 0 frente a T = 4 h
RegenBCT PRP	84,80 ± 9,87	91,78 ± 16,25	ns p > 0,05
RegenBCT-HA PRP	59,43 ± 14,48	71,70 ± 15,14	**p < 0,01
Valor p de PRP frente PRP-HA	***p < 0,001	***p < 0,001	
Valores medios obtenidos de 23 donantes; (ns: no significativo; **: muy significativo, ***: altamente significativo)			

La recuperación de plaquetas con tubos RegenBCT fue significativamente mayor que la recuperación de plaquetas obtenida con tubos RegenBCT-HA ($p < 0,001$). Los resultados de RegenBCT PRP fueron estables durante las cuatro horas del experimento ($p > 0,05$), mientras que el aumento observado en los tubos BCT-HA fue significativo ($p < 0,01$). Este aumento en el tiempo se correlaciona con el aumento en la concentración de plaquetas observada a T = 4 horas en esos tubos.

El porcentaje de recuperación de plaquetas obtenido en los tubos RegenBCT-HA está por encima del límite solicitado por la FDA del 50 %.

B. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE PLAQUETAS

Con el objetivo de abordar la funcionalidad e integridad de las plaquetas, se evaluó la expresión de selectina P (CD62P) en respuesta al ADP, la respuesta al estrés hipotónico, así como la capacidad de las plaquetas para agregarse en respuesta al colágeno en las preparaciones de plaquetas.

1. Expresión de selectina P (CD62P) en plaquetas

Véase la figura 14.

Tabla 21

	CD62P a T = 0			CD62P a T = 4 h		
	-ADP	+ADP	Valor p de -ADP frente a +ADP	-ADP	+ADP	Valor p de -ADP frente a +ADP
RegenBCT PRP	6348,88 ± 4202,51	9271,71 ± 4381,84	** p < 0,01	2569,94 ± 1417,00	5408,44 ± 1639,89	** p < 0,01
RegenBCT-Mezcla de HA	21872,13 ± 15467,92	28'680,78 ± 14'760,51	* p < 0,05	11837,87 ± 5627,73	14422,91 ± 4805,49	ns p > 0,05
Valores medios obtenidos de 23 donantes; (ns: no significativo; **: muy significativo, ***: altamente significativo)						

El valor medio de fluorescencia para CD62P (selectina P) se midió en plaquetas acotadas positivas para CD61 en el RegenBCT PRP y en la mezcla RegenBCT-HA, sin estimulación (-ADP) o con estimulación con ADP (+ADP), a tiempo T = 0 y 4 horas después de la extracción de sangre.

Se pudieron tefir las plaquetas en las mezclas de PRP-HA, sin embargo, en esas preparaciones se observó un alto fondo para ambos tipos de fluorescencia (en FL1 para CD61-FITC y en FL2 para CD62P-PE) probablemente debido a la presencia de ácido hialurónico. Por tanto, los valores obtenidos para los dos tipos de dispositivos no se pudieron comparar directamente. Además, se observó una gran variación entre individuos, lo que dio como resultado en valores de desviación estándar altos.

Sin embargo, se observó el mismo patrón de respuesta a la estimulación específica con ADP en los dos tipos de preparaciones de plaquetas. Las plaquetas en estado de reposo en el momento 0 (-ADP T = 0, columnas de color azul claro en el gráfico) expresaron un nivel basal de selectina P. Este nivel basal fue significativamente más bajo ($p < 0,001$, no se muestra en la tabla) después de cuatro horas (-ADP T = 4 h, columnas rosadas en el gráfico).

Después de la activación específica con ADP a tiempo T = 0 (+ADP T = 0, columnas azul oscuro en el gráfico), se observó un aumento significativo ($p < 0,01$) de la expresión de selectina P para los dos tipos de suspensiones de plaquetas cuando se comparó con los controles de estado de reposo (-ADP T = 0).

También se observó un aumento de la fluorescencia para CD62P en respuesta a ADP a T = 4 h (+ADP T = 4 h, columnas rojas en el gráfico). Sin embargo, esta respuesta fue significativa ($p < 0,05$) solo para las plaquetas en RegenBCT PRP.

2. Respuesta al estrés hipotónico de las plaquetas

Véase la figura 15.

Tabla 22

	HSR a T = 0	HSR a T = 4 h	valor p a T = 0 frente a T = 4 h
RegenBCT PRP	0,031 $\pm$ 0,009	0,034 $\pm$ 0,007	ns $p > 0,05$
RegenBCT-Mezcla de HA	0,030 $\pm$ 0,010	0,032 $\pm$ 0,010	ns $p > 0,05$
Valor p de PRP frente a Mezcla de PRP HA	ns $p > 0,05$	ns $p > 0,05$	
Valores medios obtenidos de 23 donantes; (ns: no significativo)			

La tabla anterior y el gráfico asociado representan la variación de la absorbancia media $\pm$ SD en la absorbancia de la luz a 405 nm observada durante un estrés hipotónico inducido por la adición de agua destilada en suspensiones de plaquetas aisladas con los dos dispositivos.

La diferencia entre las lecturas de absorbancia a los 5 min (absorbancia máxima) y a los 30 segundos (absorbancia mínima) se definió como la respuesta al estrés hipotónico (HSR) de la preparación de plaquetas.

A tiempo T = 0, las plaquetas en el RegenBCT PRP y en la mezcla RegenBCT-HA pudieron responder al estrés hipotónico con la misma amplitud ($p > 0,05$). Esta capacidad de resistir al estrés hipotónico se mantuvo al mismo nivel ($p > 0,05$) durante las cuatro horas del experimento.

3. Agregación plaquetaria

Figura 16

Tabla 23

	Agregación a T = 0	Agregación a T = 4 h	valor p a T = 0 frente a T = 4 h
RegenBCT PRP	65,08 $\pm$ 15,82	58,50 $\pm$ 17,14	ns $p > 0,05$
RegenBCT-HA PRP	23,60 $\pm$ 8,39	25,30 $\pm$ 9,88	ns $p > 0,05$
Valor p de PRP frente a PRP-HA	*** $p < 0,001$	*** $p < 0,001$	
Valores medios obtenidos de 20 donantes; (ns: no significativo; ***: altamente significativo)			

La agregación plaquetaria no se pudo medir por turbidimetría en la mezcla de PRP-HA, debido a la viscosidad del producto. Por lo tanto, solo se pudo probar la agregación en las fracciones de PRP obtenidas después de la eliminación del ácido hialurónico en los tubos RegenBCT-HA. Al igual que para los recuentos hematológicos, la agregación plaquetaria a tiempo T = 0 se cuantificó en PRP en tubos RegenBCT-HA del grupo B, mientras que los resultados a tiempo T = 4 h se midieron en PRP obtenido de tubos RegenBCT-HA del grupo C.

Además, debido a un problema técnico, no se pudieron dar resultados para tres donantes.

Ambas preparaciones de plaquetas pudieron agregarse en respuesta a la activación con colágeno. Sin embargo, el nivel de respuesta fue menor para las plaquetas preparadas con tubos RegenBCT-HA ($p < 0,001$). El nivel de respuesta permaneció sin cambios ($p > 0,05$) cuando se midió después de cuatro horas en ambas preparaciones de

PRP.

Análisis

El ácido hialurónico es un componente principal de la matriz extracelular. No solo tiene un papel estructural, formando un armazón tridimensional, sino que también contribuye a la adhesión de célula a sustrato, al contacto de célula a célula, a la migración y proliferación celular. El tubo RegenBCT-HA es un nuevo dispositivo que permite la preparación, en una sola etapa, de plasma rico en plaquetas combinado directamente con una solución de ácido hialurónico.

En este estudio, se evaluó el rendimiento de los tubos RegenBCT-HA con respecto a la separación de los componentes sanguíneos, en comparación con el rendimiento del tubo RegenBCT, dispositivo para la preparación estándar de PRP. Esto se evaluó usando los parámetros recomendados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU. (FDA de los EE. UU.), Que son volúmenes de concentrado de plaquetas, recuento de plaquetas y células, y el pH de los productos. Además, también se investigó la viabilidad y funcionalidad de las plaquetas obtenidas.

La sangre de 23 donantes sanos se trató en paralelo con los dos dispositivos y el PRP obtenido se analizó a las 0 y 4 horas después de la recogida de sangre.

El tubo RegenBCT está diseñado para la preparación de 4 a 5 ml de PRP a partir de 8 a 9 ml de sangre. En el tubo RegenBCT-HA, el vacío y el volumen anticoagulante se han adaptado para la recogida de 4 a 5 ml de sangre, para obtener de 2 a 3 ml de plasma anticoagulado que se combinará con los 2 ml de solución de ácido hialurónico contenidos en el dispositivo. El volumen final de la mezcla de PRP-HA es de aproximadamente 5 ml, con una proporción aproximada de PRP a solución de ácido hialurónico del 50 %.

En ambos dispositivos, la separación de los componentes sanguíneos se realiza mediante una centrifugación de una sola etapa. En los tubos RegenBCT-HA, el ácido hialurónico flota sobre el plasma al final de la centrifugación y debe mezclarse mecánicamente con el PRP para obtener el producto final. Como el recuento celular no se pudo realizar en la mezcla PRP-HA, debido a la viscosidad del producto final, se evaluaron las concentraciones de células y plaquetas solo en la parte de PRP, eliminando el ácido hialurónico flotante. En consecuencia, se tuvo que extraer sangre en tres tubos RegenBCT-HA, para cada donante, para tener una mezcla de PRP-HA y dos PRP para la medida a tiempo 0 y a tiempo T = 4 horas. Para la evaluación a T = 4 h, los tubos RegenBCT-HA se dejaron sin tocar en posición vertical después de la centrifugación, y el ácido hialurónico flotante se eliminó solo después de cuatro horas justo antes del recuento de células sanguíneas.

Se cuantificaron los volúmenes de PRP resultantes, así como la cantidad de ácido hialurónico eliminado. No hubo diferencia estadística entre el volumen obtenido a T = 0 y cuatro horas después, lo que permitió comparar los datos obtenidos en los dos puntos temporales.

El pH de la mezcla de PRP-HA era similar al pH de RegenBCT PRP sobre el límite estándar solicitado por la FDA de 6,2 para la preparación de plaquetas. Los pH de PRP y de Mezcla de PRP-HA fueron ligeramente más altos que el pH de la sangre, los valores más altos se observaron en el PRP. Aunque mínimas, las diferencias de pH entre los diferentes productos fueron significativas. Se observó un pequeño aumento del valor de pH de las dos preparaciones de plaquetas durante las 4 horas del experimento, al contrario del pH de la sangre completa que no varió, sin embargo, este aumento no fue clínicamente significativo.

Con respecto a la separación de glóbulos rojos, ambos sistemas mostraron resultados equivalentes en la eliminación de glóbulos rojos con una recuperación inferior al 0,5 %. Se obtuvo una reducción equivalente del contenido de glóbulos blancos en PRP, en comparación con la sangre completa, en los dos tipos de dispositivos. Aproximadamente el 85 % de los leucocitos fueron eliminados. Además, se encontró la misma distribución en los subconjuntos de glóbulos blancos en los dos tipos de PRP, lo que demuestra la equivalencia de los dos dispositivos para la preparación de PRP con una baja contaminación de granulocitos, conocidos por ser proinflamatorios.

Aunque no significativas, las concentraciones en los glóbulos rojos y blancos en el PRP obtenido con los tubos RegenBCT-HA fueron ligeramente más altas que en el RegenBCT PRP. Esto se debe al hecho de que parte del plasma se eliminó con el ácido hialurónico, reduciendo así el volumen en el que se resuspendieron las células. Como la recuperación celular fue equivalente en los dos dispositivos, es poco probable que haya una cantidad significativa de glóbulos rojos y blancos en el volumen eliminado. Por lo tanto, se podría estimar mediante cálculo la concentración final de esas células en la mezcla de PRP-HA obtenida con los tubos RegenBCT-HA.

Ambos dispositivos permitieron la preparación de PRP con una concentración de plaquetas mayor que la concentración de plaquetas en sangre. A diferencia de las otras concentraciones que fueron estables en el tiempo, la concentración de plaquetas en PRP de los tubos RegenBCT-HA aumentó en el tiempo, y fue equivalente a la obtenida en los tubos RegenBCT solamente a T = 4 h. Por correlación se observó el mismo aumento para el factor de concentración de plaquetas. Como se ha demostrado, con glóbulos rojos y blancos, que la presencia de ácido hialurónico no modificó el rendimiento del gel tixotrópico para la separación de componentes sanguíneos, se puede

suponer que la capacidad de aislamiento de plaquetas del gel tampoco se modifica en tubos RegenBCT-HA. Por lo tanto, es probable que algunas plaquetas interactuaran con el ácido hialurónico durante el acondicionamiento de la sangre en este dispositivo. Esas plaquetas probablemente fueron arrastradas con el ácido hialurónico eliminado a tiempo $T = 0$. El aumento en el número de plaquetas encontradas en el RegenBCT-HA PRP después de cuatro horas podría deberse a la liberación en el plasma de algunas plaquetas de la fracción de ácido hialurónico durante la duración del experimento. Esta interacción de plaquetas-ácido hialurónico también explicaría los valores más bajos obtenidos en este dispositivo para la recuperación de plaquetas, aproximadamente el 60 y el 70 %, respectivamente, a tiempo $T = 0$ y tiempo $T = 4$ h, mientras que la recuperación en el tubo RegenBCT fue de entre el 85 % y el 92 %. Sin embargo, los porcentajes medidos de recuperación de plaquetas, aunque probablemente se subestiman, están muy por encima del límite solicitado por la FDA del 50 %. La concentración final estimada en la mezcla PRP-HA es cercana a la concentración de plaquetas en la sangre completa, con un factor de concentración en el producto diluido de aproximadamente 0,8.

Además del rendimiento del dispositivo RegenBCT-HA para la separación de células sanguíneas, también se probó la funcionalidad e integridad de las plaquetas obtenidas.

In vivo, las plaquetas responden a la estimulación específica con ADP aumentando el número de moléculas de selectina P (CD62P) expresadas en su membrana externa. Se probó esta capacidad en las plaquetas obtenidas en la mezcla PRP-HA. Los fondos de alta fluorescencia, vistos en las muestras que contienen ácido hialurónico, impidieron una comparación directa con los resultados obtenidos en RegenBCT PRP. Además, se observó una gran variación entre individuos, lo que dio como resultado valores de desviación estándar altos. Sin embargo, se observó un patrón de respuesta similar en los dos tipos de preparaciones de plaquetas, con un aumento de la expresión de selectina P en respuesta a la activación específica con ADP, aunque no significativo a $T = 4$ para la mezcla de PRP-HA.

Cuando se añade agua destilada en las preparaciones de PRP, las plaquetas se hinchan y posteriormente se contraen a su forma normal. Esta capacidad de resistencia al estrés hipotónico depende de la integridad de las funciones bioquímicas de las plaquetas y, por lo tanto, es un indicador de la viabilidad de las plaquetas. Las plaquetas de ambos dispositivos pudieron resistir dicho estrés hipotónico. La respuesta fue de la misma amplitud en ambos tipos de preparaciones de plaquetas y se mantuvo sin cambios durante el período de 4 horas.

Otra funcionalidad de las plaquetas es su capacidad de agregarse en respuesta al contacto con moléculas de la matriz extracelular, tales como el colágeno. El método turbidimétrico usado para evaluar esta funcionalidad no se pudo realizar en muestras de plaquetas mezcladas con ácido hialurónico, debido a la viscosidad del producto. Por lo tanto, al igual que para los recuentos hematológicos, solo se pudo probar la agregación en las fracciones de PRP obtenidas después de la eliminación del ácido hialurónico en los tubos RegenBCT-HA. Las preparaciones de plaquetas obtenidas con los dos dispositivos pudieron agregarse en respuesta a la activación con colágeno y esta capacidad se mantuvo al mismo nivel a tiempo $T = 4$ horas. Sin embargo, la respuesta de agregación se redujo para las plaquetas preparadas con tubos RegenBCT-HA. Esto es coherente con los resultados publicados sobre el efecto del ácido hialurónico en la agregación de plaquetas humanas en respuesta al colágeno (Aras C., et al., Eur J Ophthalmol. Marzo-abril de 2006; 16 (2): 306-10; Bracey AW., Y col., Am J Hematol. Marzo de 1987; 24 (3): 247-57).

Tomados en conjunto, estos últimos tres experimentos permitieron demostrar que las plaquetas obtenidas con el tubo RegenBCT-HA, aunque sesgadas por la presencia de ácido hialurónico, habían mantenido su integridad y funcionalidad.

Conclusiones

El tubo RegenBCT-HA es un dispositivo médico innovador que permite la preparación de PRP combinado con una solución de ácido hialurónico, mediante un procedimiento de una sola etapa en un sistema de circuito cerrado. El PRP obtenido con este dispositivo tiene una alta recuperación de plaquetas (60-70 %), una recuperación parcial de glóbulos blancos (aproximadamente el 15 %), con un agotamiento selectivo (95 %) de granulocitos y casi ninguna contaminación de glóbulos rojos ($< 0,5$ %). Estos resultados son comparables a los resultados obtenidos con otro dispositivo para el aislamiento de PRP, el tubo RegenBCT, como era de esperar, ya que los dos dispositivos usan la misma tecnología de gel para la separación celular. La única discrepancia se observó para la recuperación de plaquetas, que fue mayor en RegenBCT PRP, sin embargo, como no se pudo evaluar la cantidad de plaquetas unidas al ácido hialurónico, este parámetro probablemente fue subestimado. Sin embargo, el valor medido está muy por encima del límite solicitado por la FDA del 50 % para la recuperación de plaquetas en el dispositivo PRP. El PRP obtenido se mezcla con la solución de ácido hialurónico, contenida en el dispositivo, en una relación de aproximadamente el 50 %. El producto diluido resultante es una suspensión de plaquetas en un armazón tridimensional con una concentración cercana al valor sanguíneo fisiológico, en el que las plaquetas han mantenido su integridad y funcionalidad.

Ejemplo 4

La eficacia de las formulaciones de HA-PRP se ha evaluado en pacientes que usan los tubos REGENBCT y REGENBCT-HA como se describe en el ejemplo 3. Como se muestra en la figura 19, se demuestra evidencia de

afinidad por HA y factores de crecimiento (GF) para PDGF y EGF. Se observa una liberación de GF mucho más fuerte en una combinación de HA con PRP que en PRP solo. La liberación en pg/ml de PDGF-AA, PDGF-BB y EGF en el día 0 (T0) para una preparación de PRP solo (BCT T0) frente a una combinación de PRP y HA (BCT + IALUR T0) se muestra en la figura 19.

- 5 Sorprendentemente, el suministro de GF en la fase temprana es distinto entre una preparación de PRP solo (BCT) frente a una combinación de PRP y HA (BCT HA), véase la figura 20. La liberación en pg/ml de PDGF-BB en dos casos el día 0 (T0), el día 3 (T3) y el día 5 (T5) para una preparación de PRP solo (BCT) frente a una combinación de PRP y HA (BCT HA) se muestra en la figura 20.
- 10 La liberación en pg/ml de EGF en tres pacientes diferentes (pacientes 1, 2 o 3) en el día 0 (T0), día 3 (T3), día 5 (T5), día 7 (T7) y día 10 (T10) para una preparación de PRP solo (BCT) se muestra en la figura 21-A frente a una combinación de PRP y HA (BCT HA) en la figura 21-B. La mediana de liberación en pg/ml de EGF en el día 0 (T0), día 3 (T3), día 5 (T5), día 7 (T7) y día 10 (T10) para una preparación de PRP sola (BCT) frente a una combinación de PRP y HA (BCT HA) se muestra en la figura 21-C.
- 15 Una combinación de PRP y HA es muy efectiva en la fase temprana con una liberación de GF mucho mayor, particularmente para PDGF-BB hasta aproximadamente el día 3 o el día 4 y para EGF hasta aproximadamente el día 1 o el día 2. Esto es particularmente importante en todos los casos en los que se requiere una liberación rápida y fuerte de GF, por ejemplo, en el cuidado de heridas. Dicha liberación temprana de la fase GF mejora el tiempo de cicatrización de la herida y disminuye rápidamente el dolor. Por ejemplo, una formulación de HA-PRP de acuerdo con la divulgación es útil en el dolor agudo.

20

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende al menos un ácido hialurónico de bajo peso molecular y al menos un ácido hialurónico de alto peso molecular **caracterizada por que:**

- 5 - dicho ácido hialurónico de bajo peso molecular es de 600 kDa o menos de 600 KDa, y
- dicho ácido hialurónico de alto peso molecular es de 4000 KDa o por encima de 4000 KDa,
- en la que:
- la relación de ácido hialurónico de bajo peso molecular respecto a ácido hialurónico de alto peso molecular es 2:3 y en la que la concentración total es del 2,2 % al 2,8 %, y que comprende además:
- 10 i) un anticoagulante y/o un gel tixotrópico.

2. La composición de la reivindicación 1, en la que el anticoagulante es citrato o citrato de sodio.

3. Composición de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además:

- 15 i) un activador de la coagulación, suero de trombina, fosfato tricálcico (TCP), un sustituto óseo, gluconato de calcio, sacarato de calcio, quitosano, fibroínas, proteínas de fibroína de seda, factores de crecimiento, manitol, colágeno, albúmina, ácido ascórbico, crema, células grasas, tejido adiposo, concentrado de médula ósea, lubricina, cd-gelatina, toxina botulínica y/o uno o más extractos celulares que no son extractos de células madre embrionarias, y/o
- 20 ii) compuestos analgésicos, compuestos antibacterianos, incluidos compuestos bactericidas y bacteriostáticos, antibióticos tales como adriamicina, eritromicina, gentamicina, penicilina, tobramicina, compuestos antifúngicos, antiinflamatorios, compuestos antiparasitarios, compuestos antivirales, enzimas, inhibidores enzimáticos, glucoproteínas, factores de crecimiento, linfocinas, citocinas, hormonas, esteroides, glucocorticoides,
- 25 inmunomoduladores, inmunoglobulinas, minerales, neurolépticos, proteínas, péptidos, lipoproteínas, compuestos tumorocidas, compuestos tumoristáticos, toxinas y vitaminas tales como vitamina A, vitamina E, vitamina B, vitamina C, vitamina D.

4. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha composición se esteriliza con vapor.

30

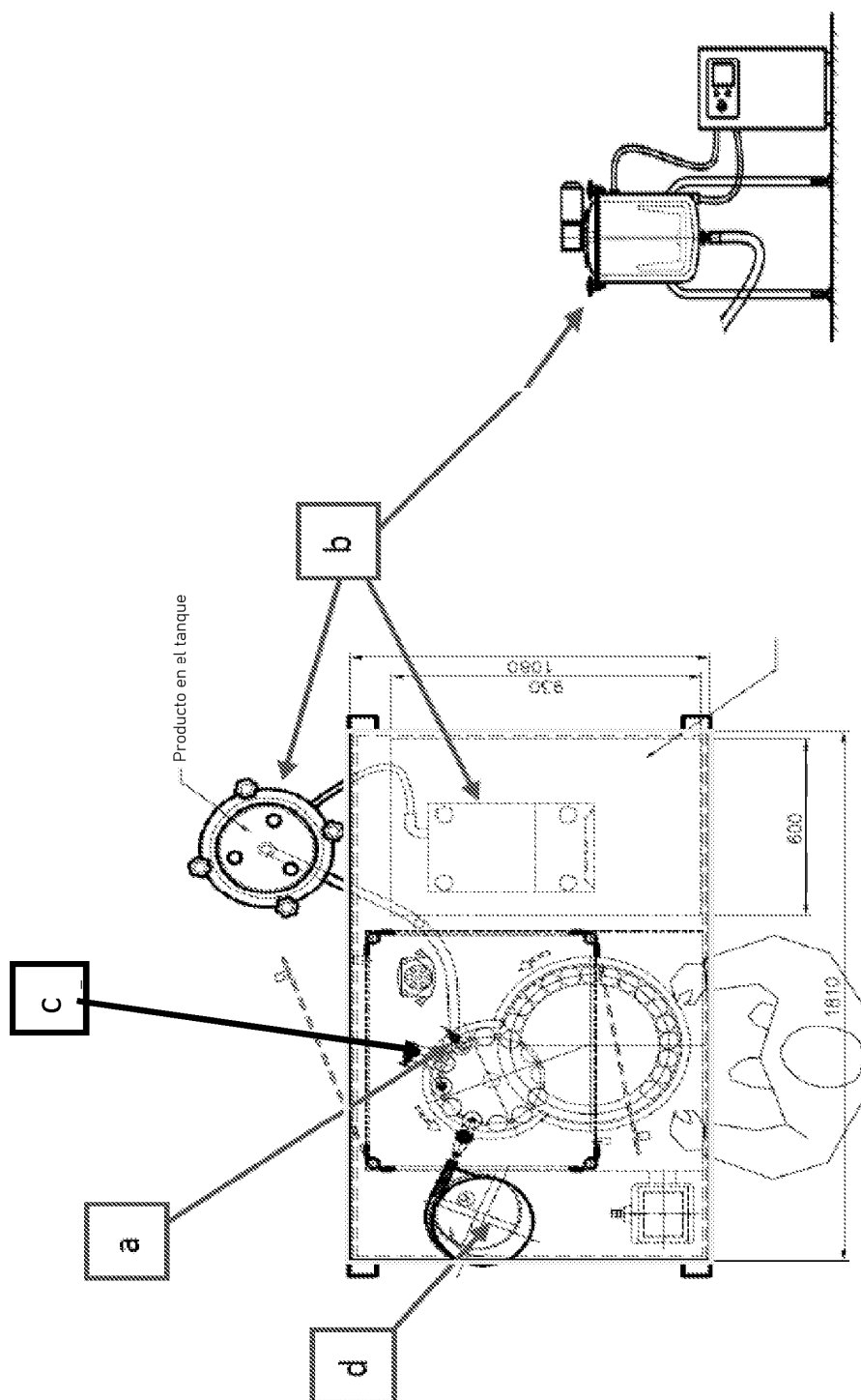


Figura 1

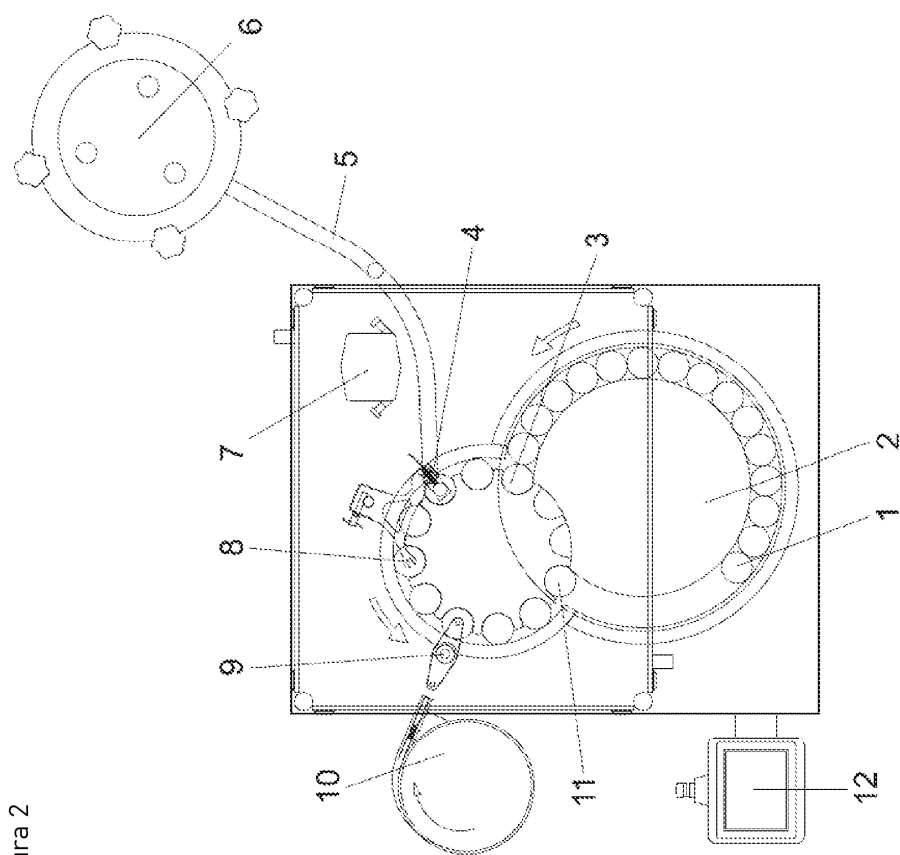


Figura 2

Figura 3

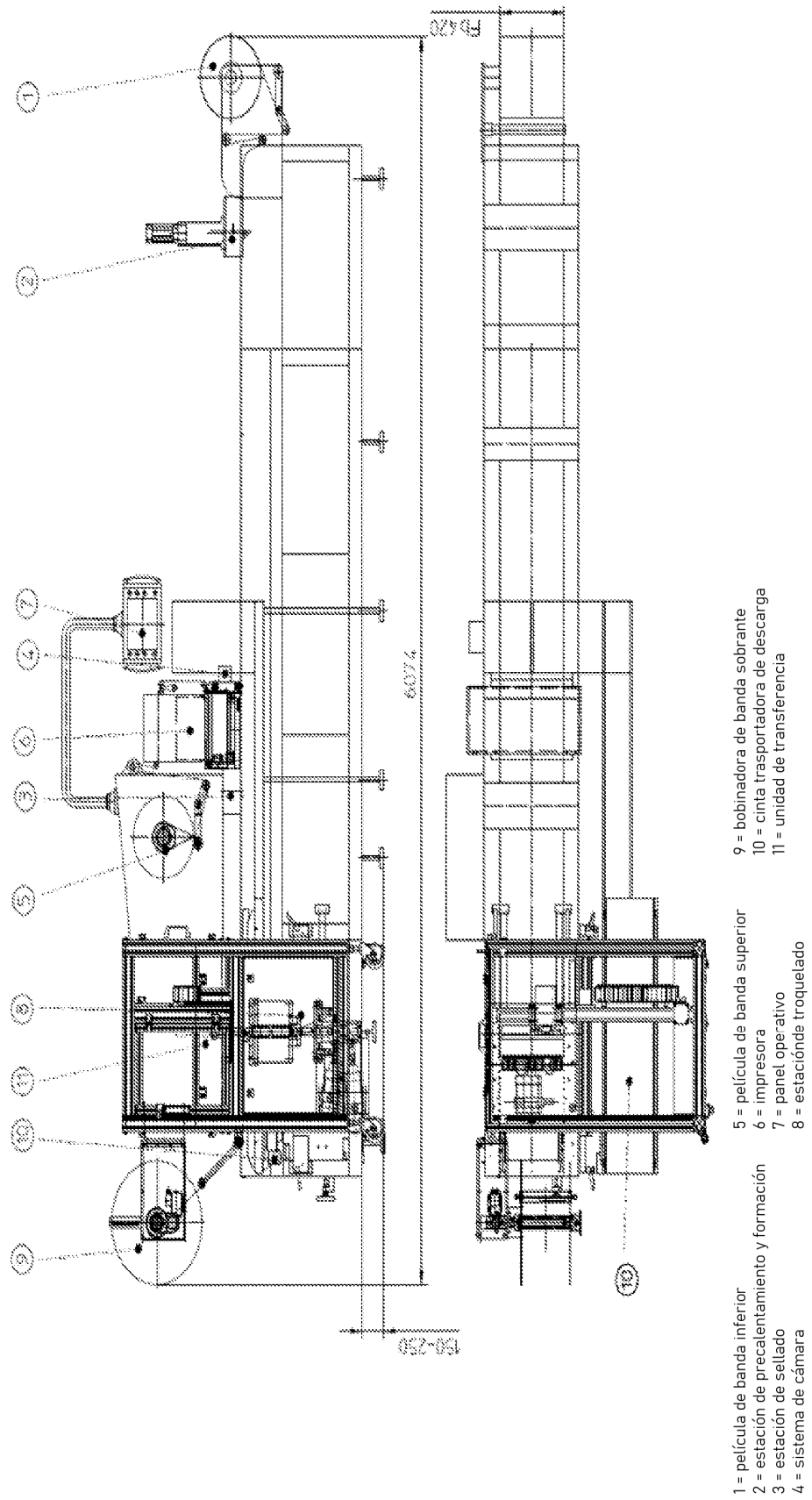


Figura 4

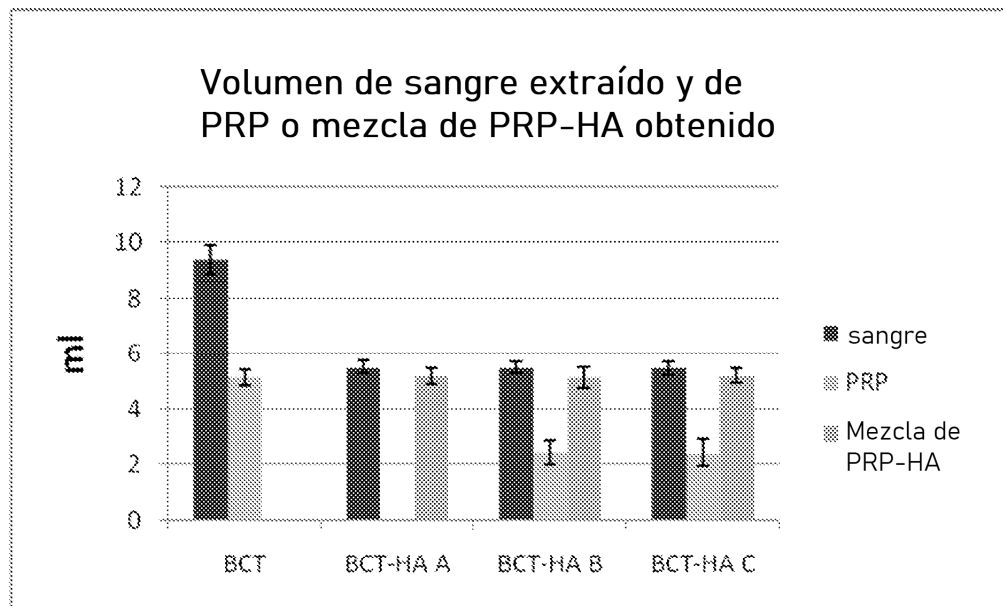


Figura 5

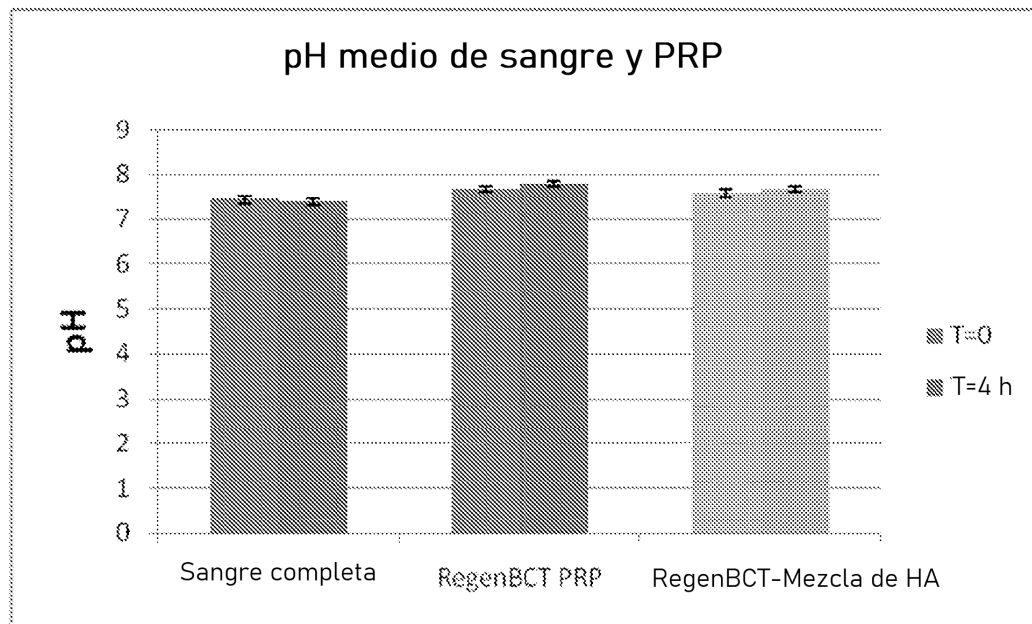


Figura 6

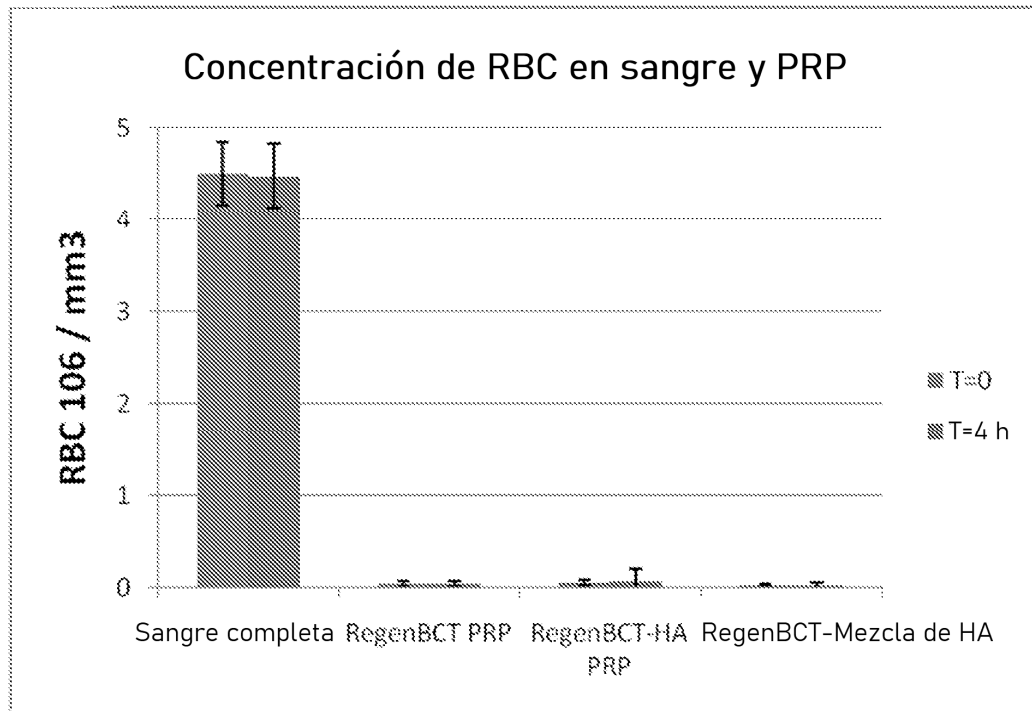


Figura 7

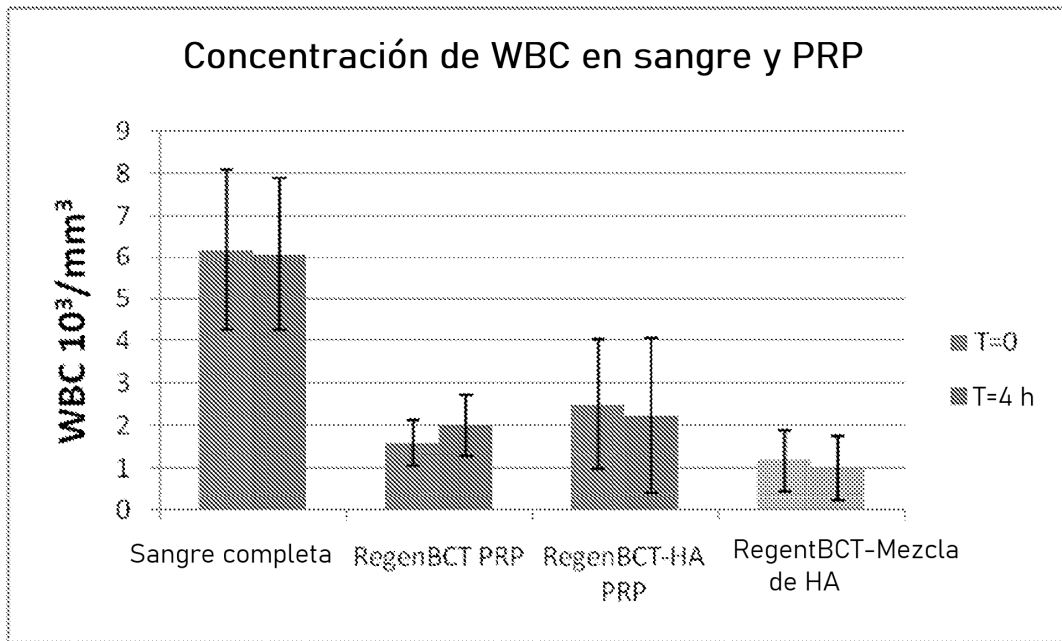


Figura 8

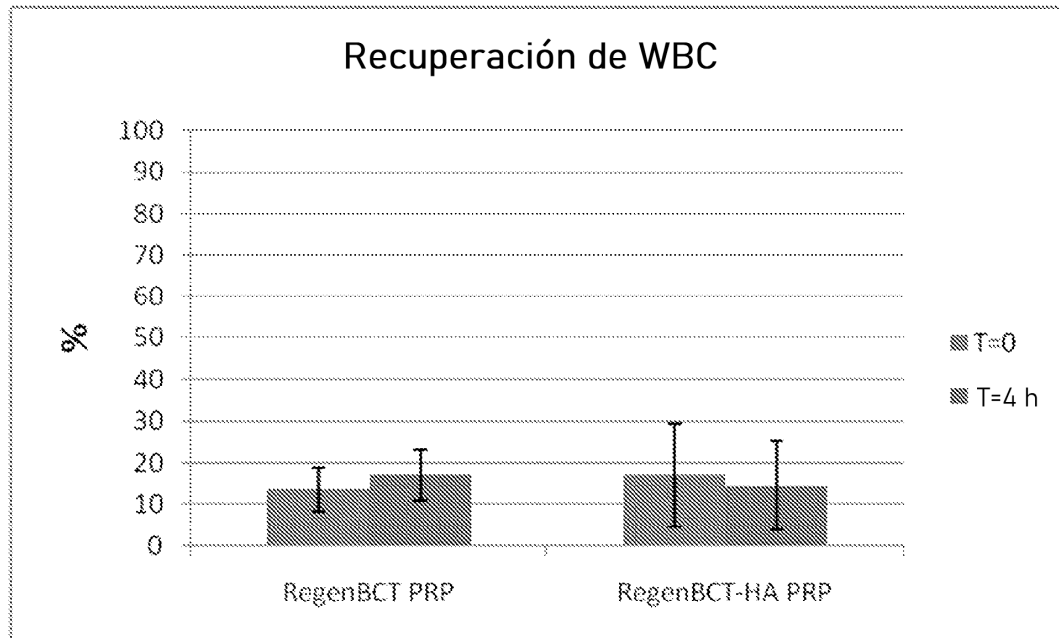


Figura 9

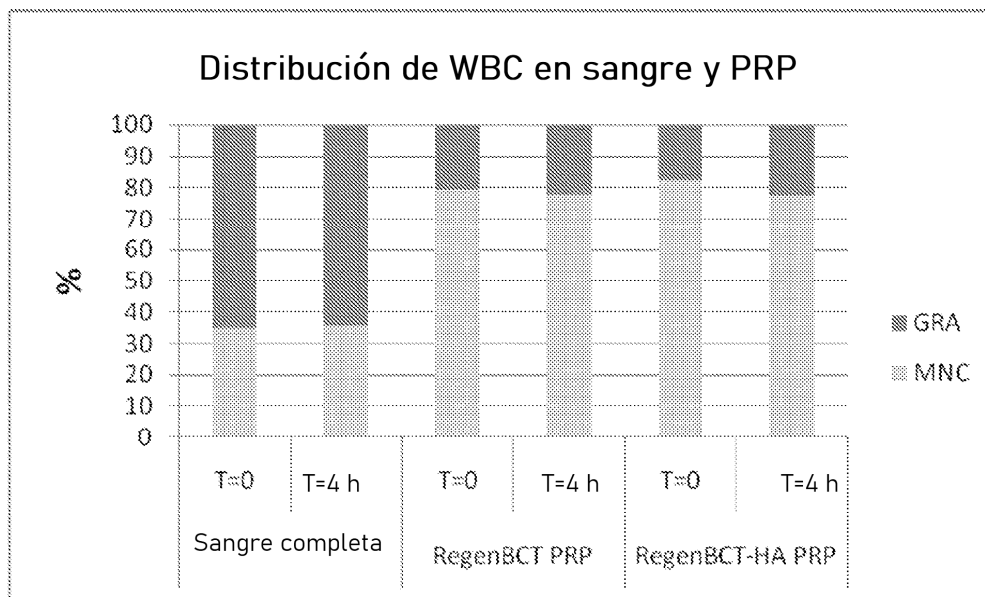


Figura 10

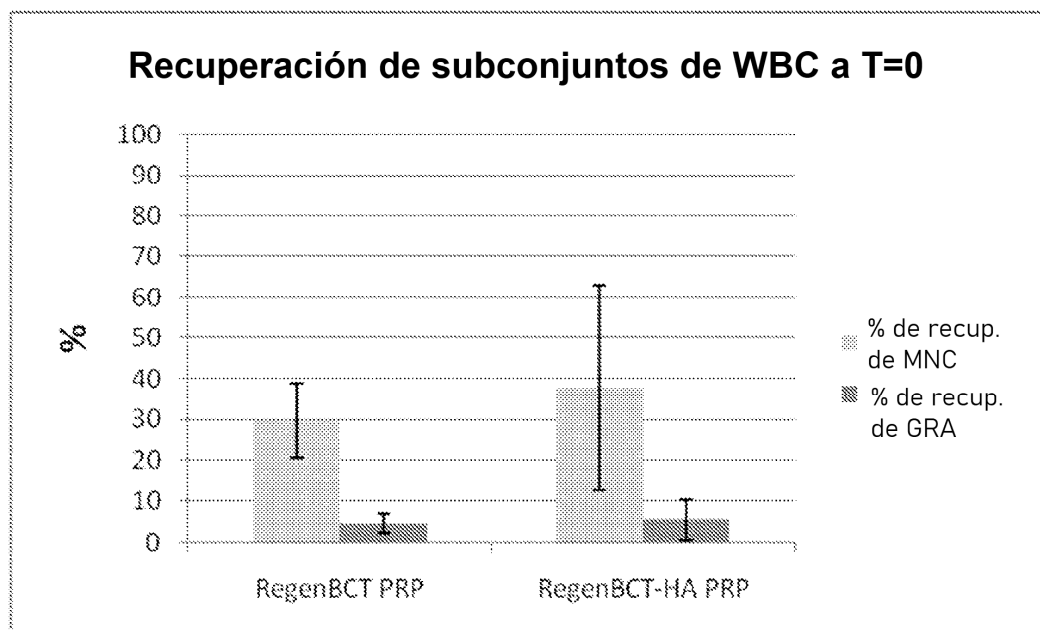


Figura 11

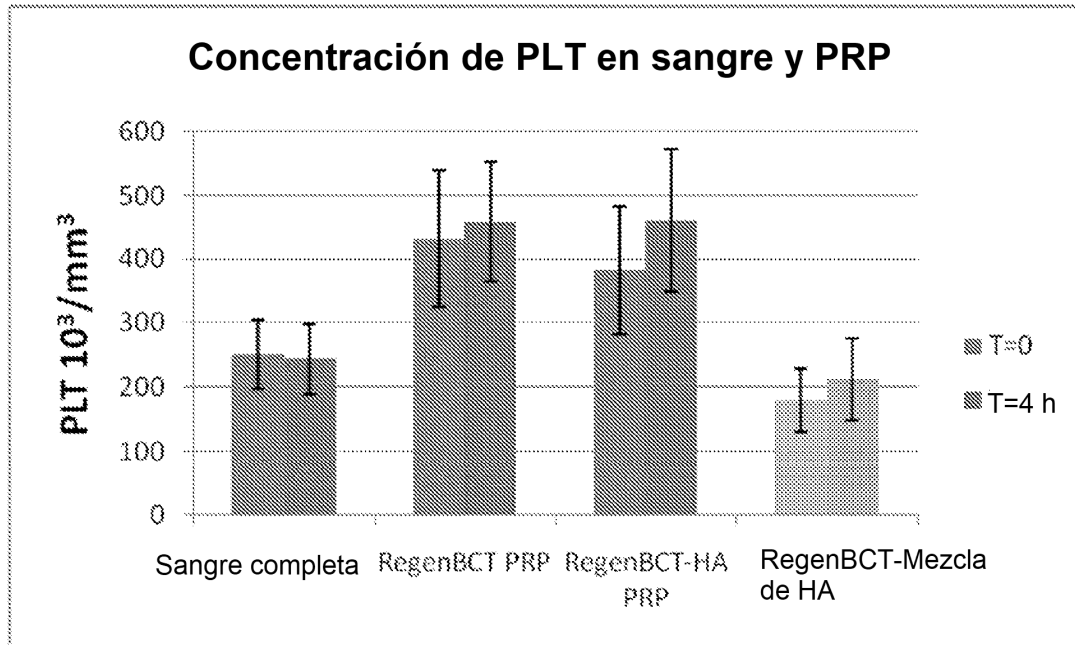


Figura 12

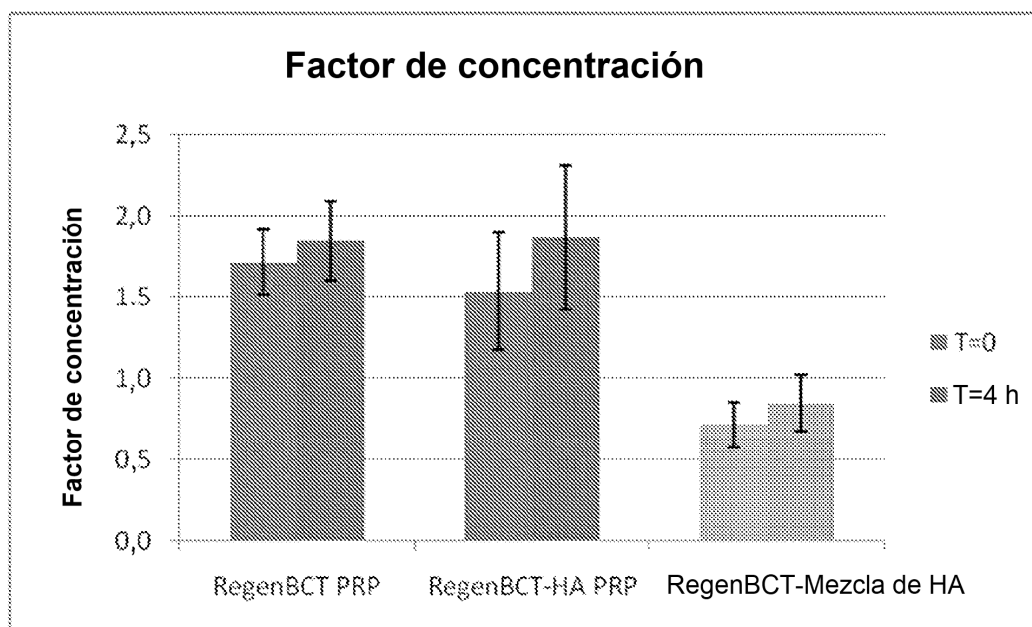


Figura 13

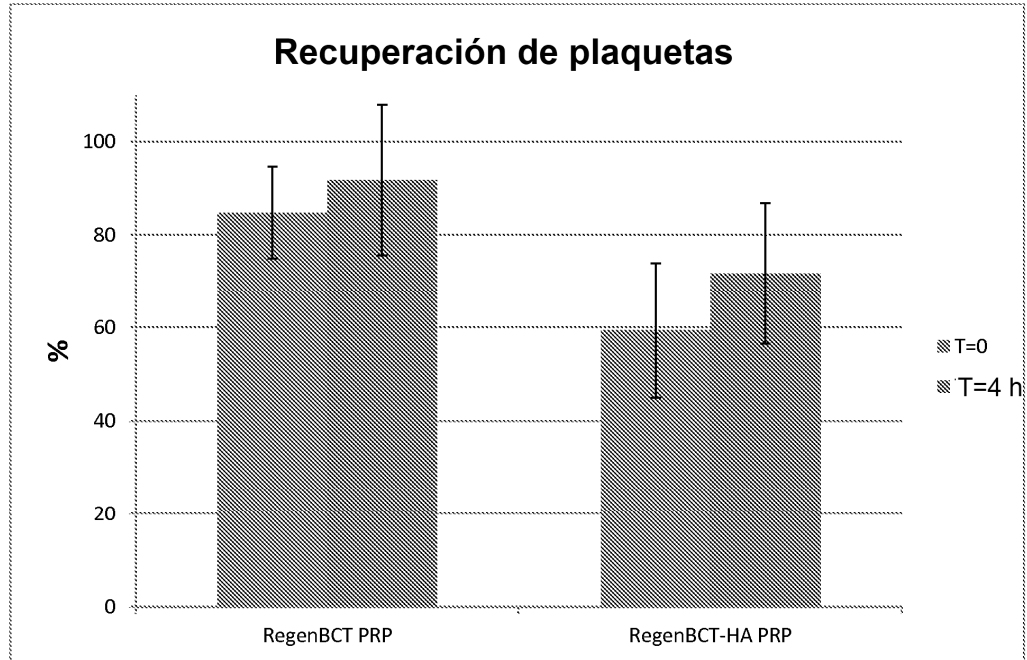


Figura 14

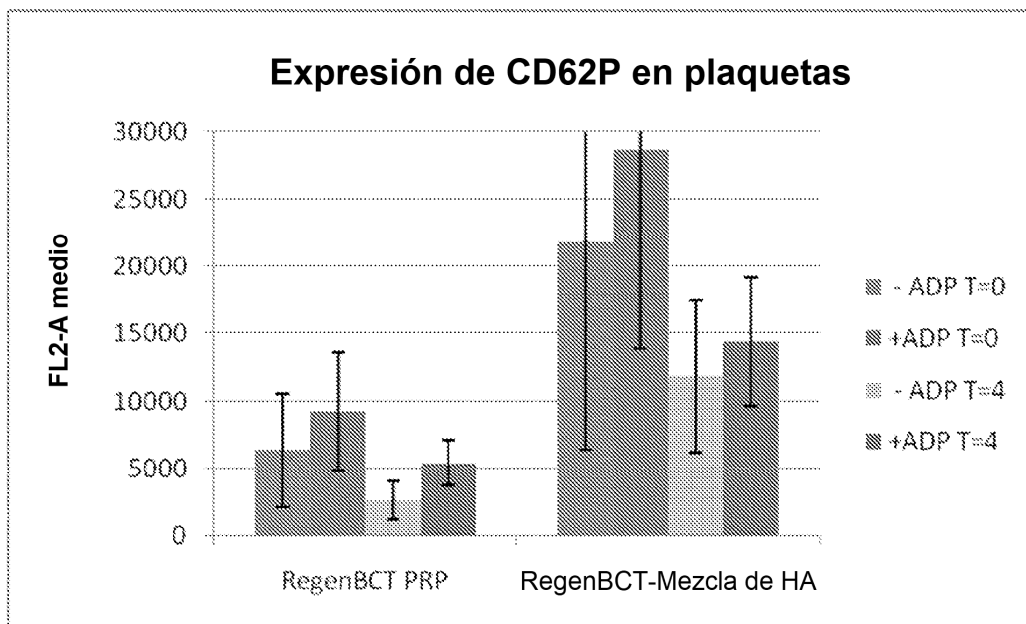


Figura 15

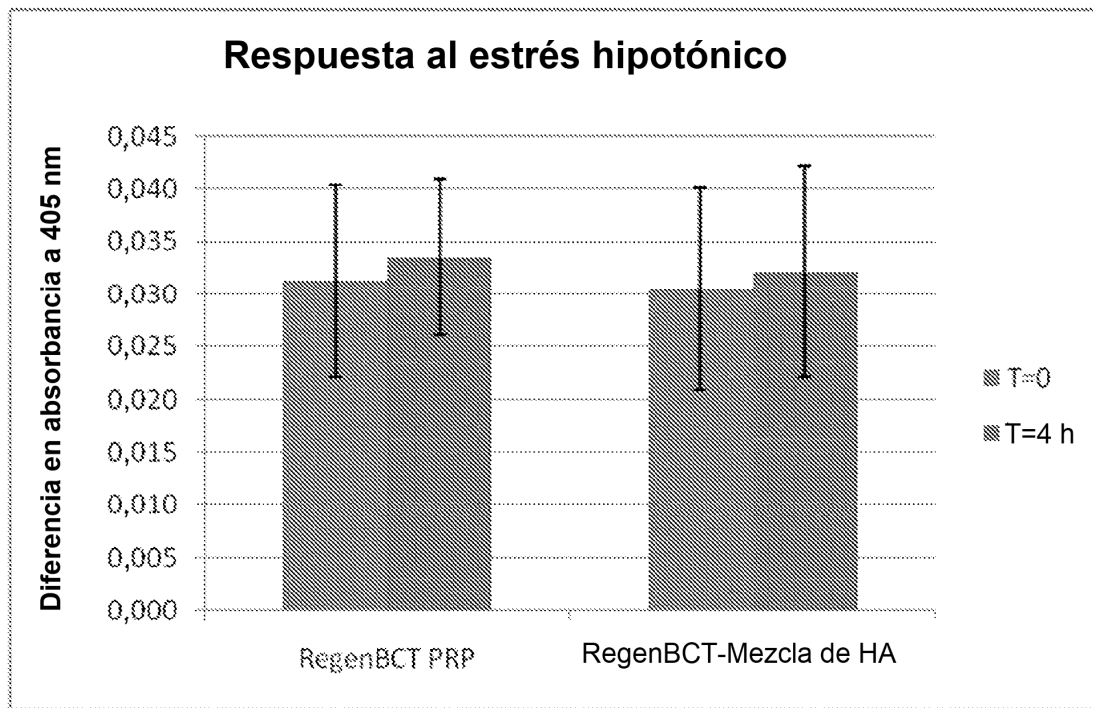


Figura 16

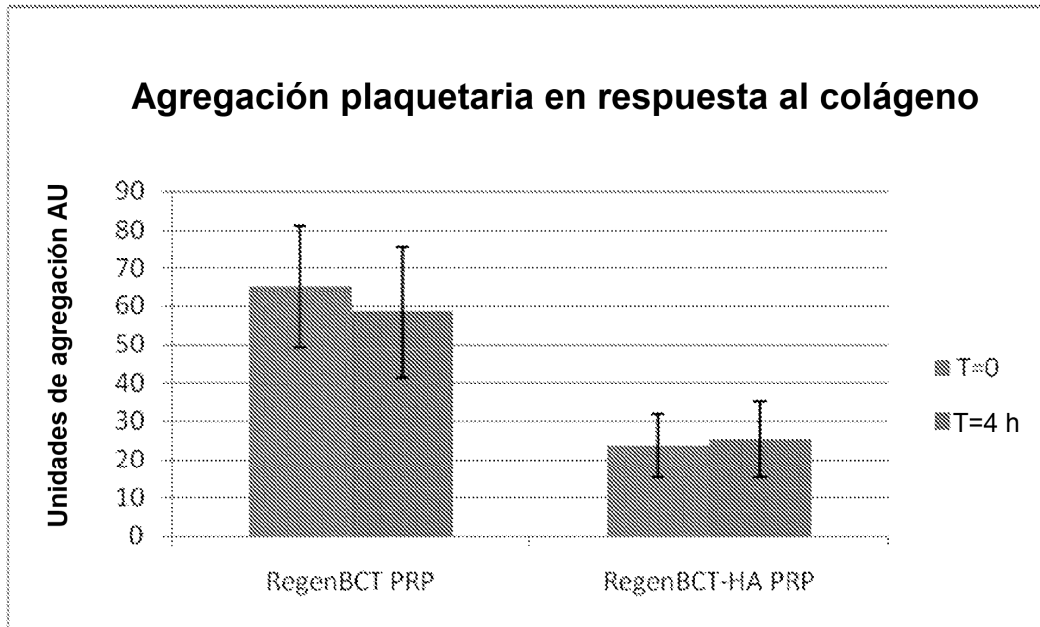


Figura 17

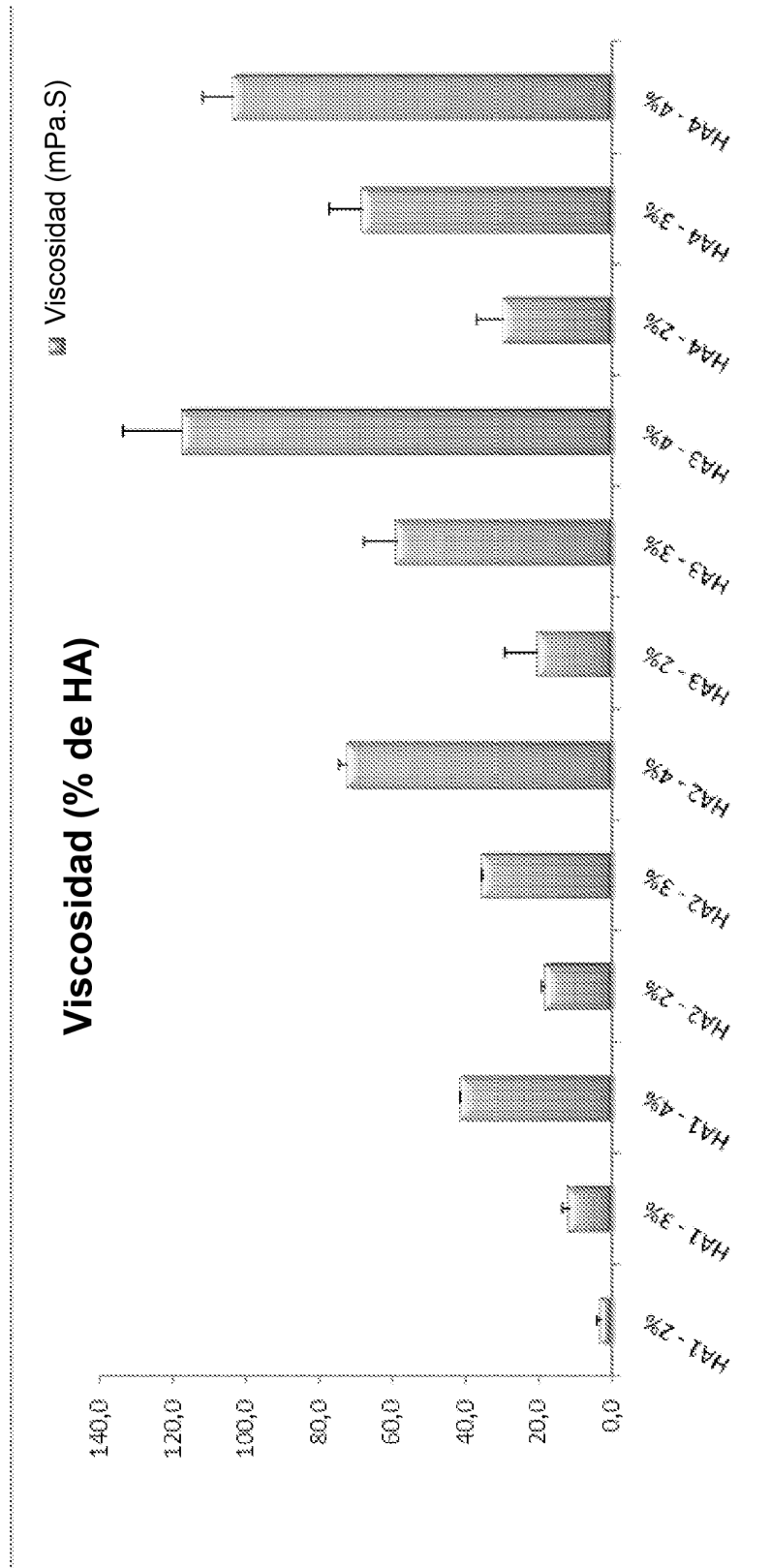


Figura 18

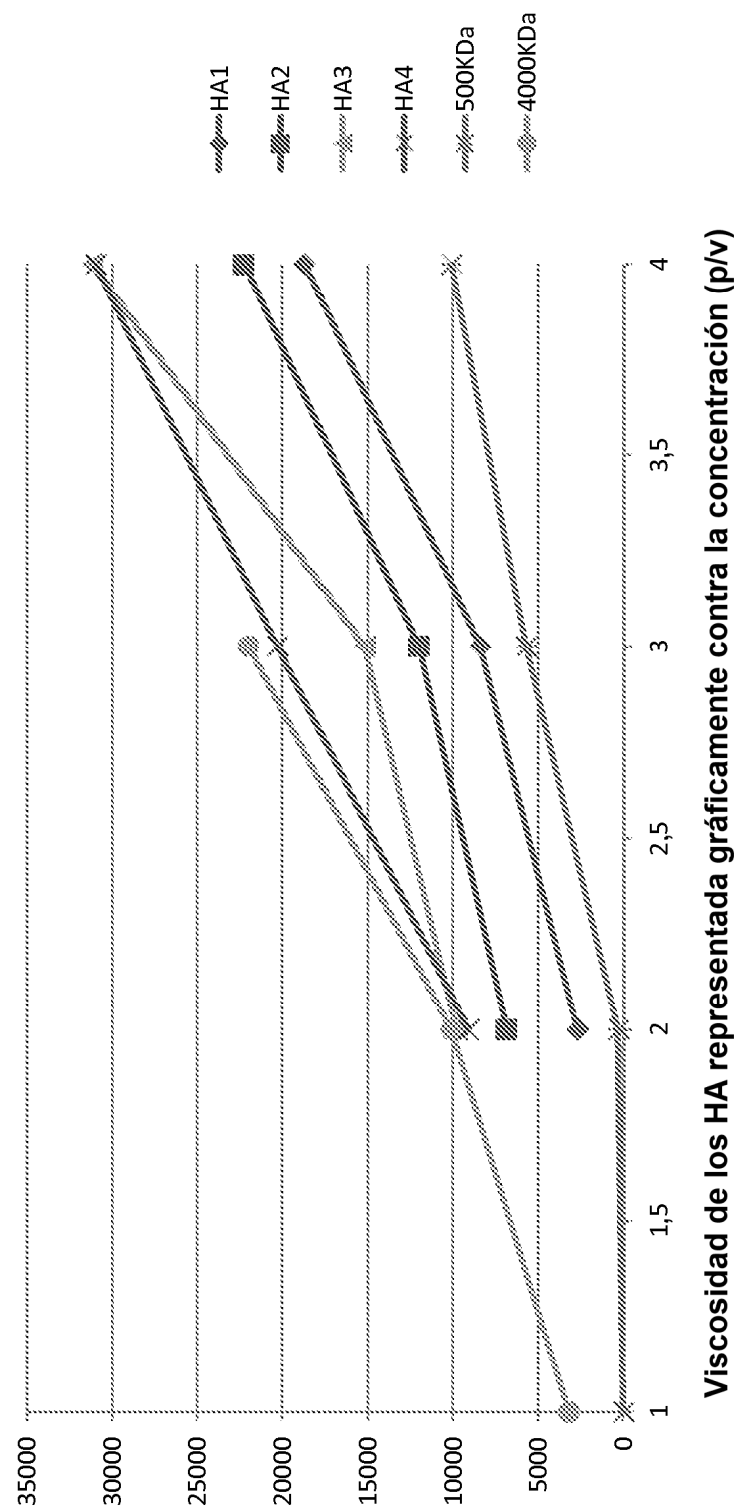


Figura 19

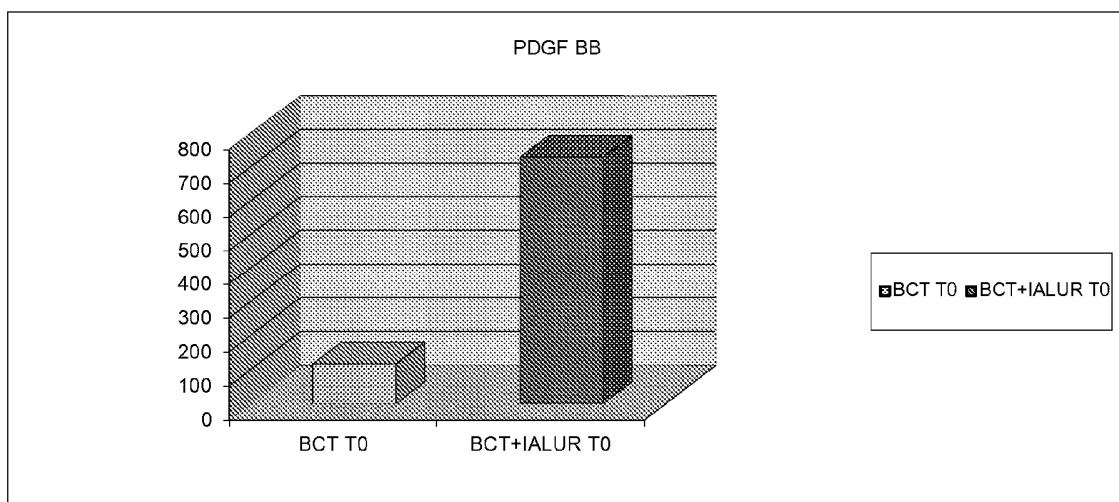
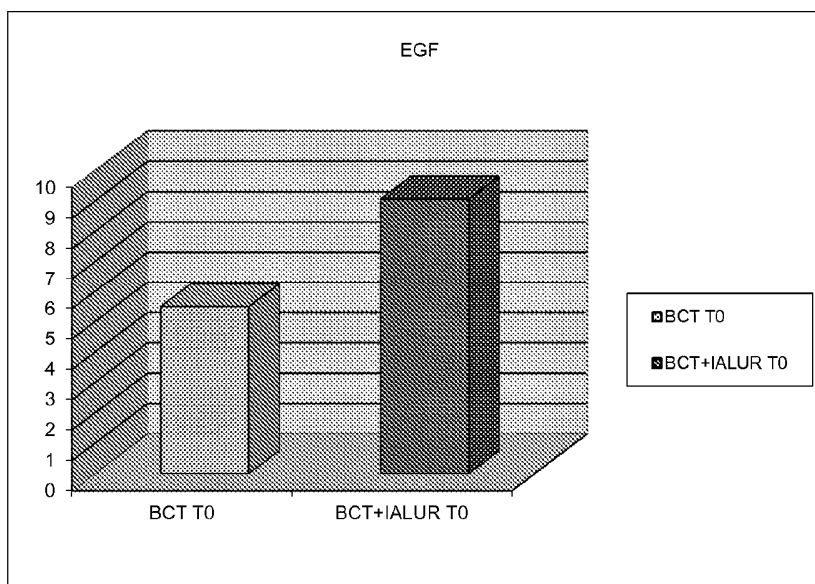
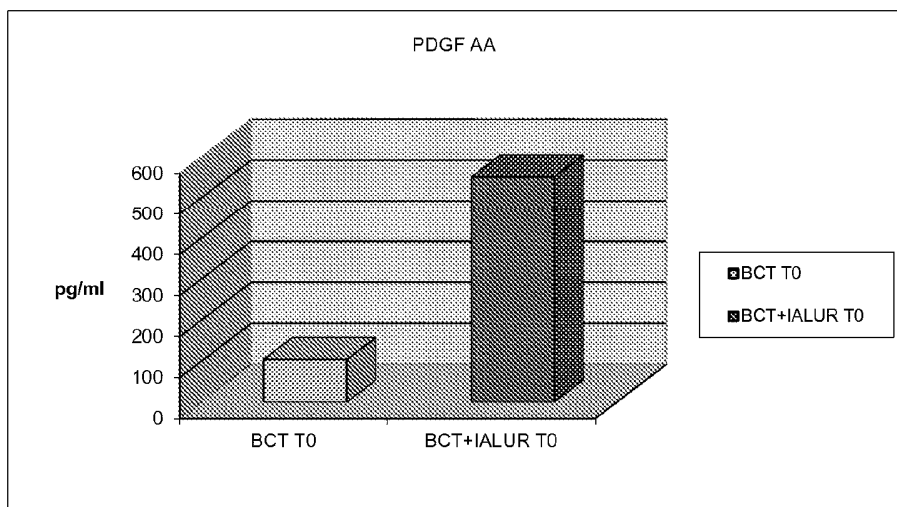


Figura 20

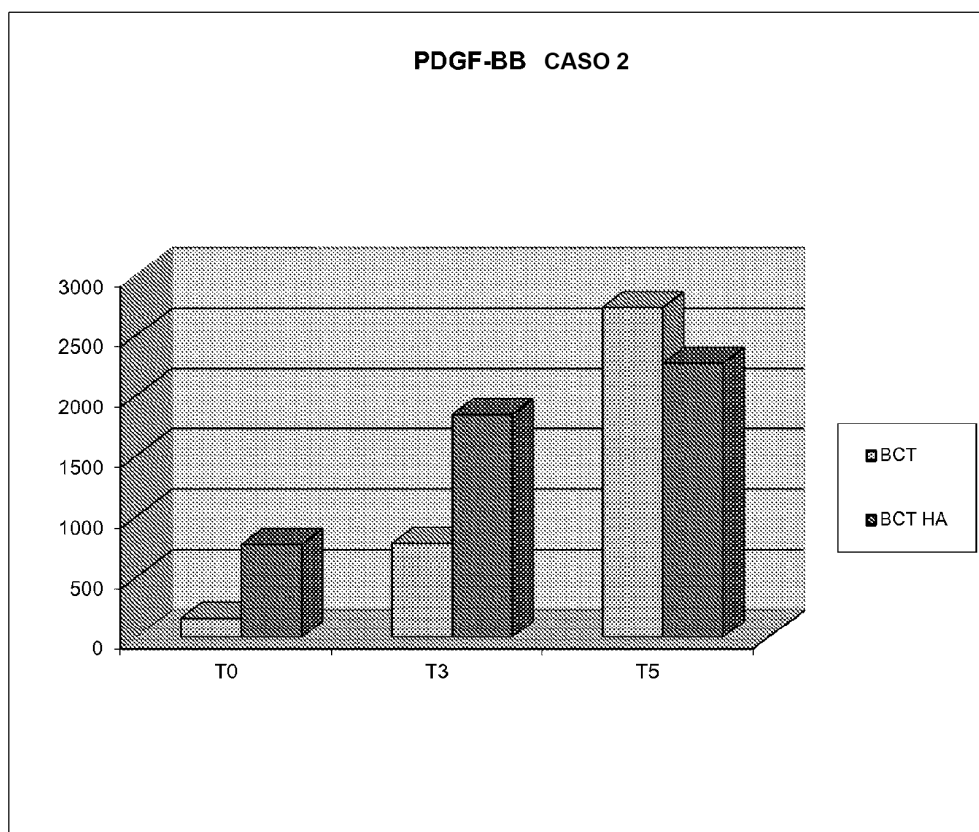
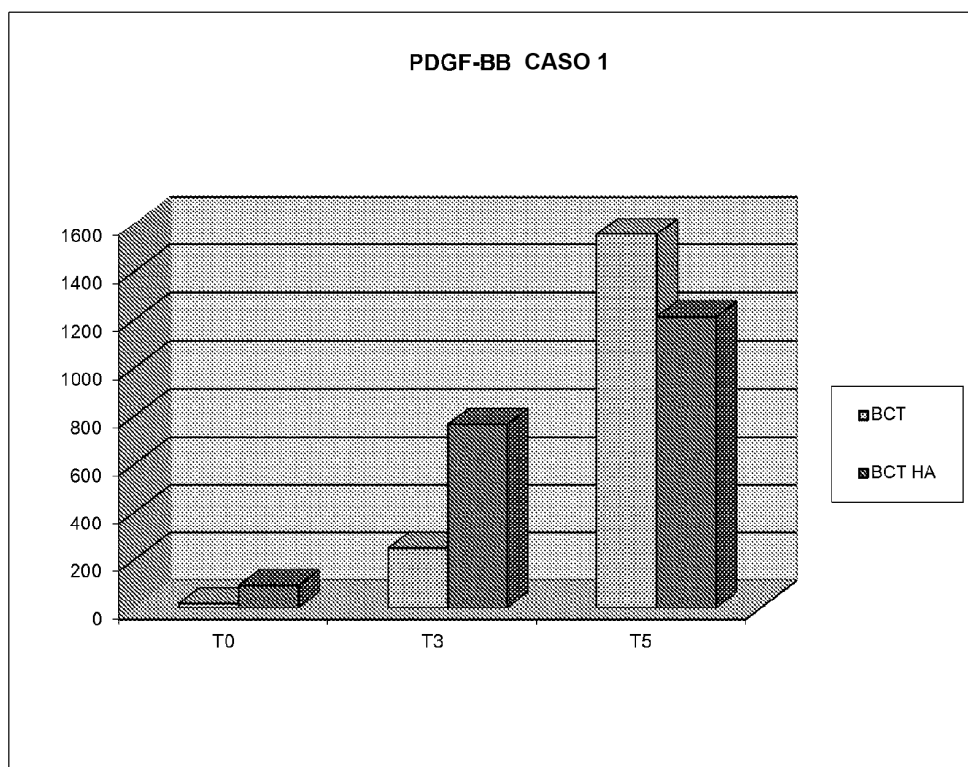


Figura 21

