

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 831 708**

51 Int. Cl.:

A61M 1/36 (2006.01)

B01L 3/14 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

A61L 24/00 (2006.01)

A61L 24/10 (2006.01)

A61L 26/00 (2006.01)

A61K 35/14 (2015.01)

A61K 35/16 (2015.01)

A61K 35/19 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2007** **E 16172748 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2020** **EP 3111974**

54 Título: **Preparaciones de células para uso extemporáneo, útiles para cicatrización y rejuvenecimiento in vivo**

30 Prioridad:

21.08.2006 WO PCT/EP2006/065493

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

09.06.2021

73 Titular/es:

REGEN LAB SA (100.0%)

En Budron B2

1052 Le Mont-sur-Lausanne, CH

72 Inventor/es:

TURZI, ANTOINE y

DU TOIT, DONALD FRANÇOIS

74 Agente/Representante:

DÍAZ DE BUSTAMANTE TERMINEL, Isidro

ES 2 831 708 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

Preparaciones de células para uso extemporáneo, útiles para cicatrización y rejuvenecimiento in vivo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la regeneración de tejidos, especialmente regeneración de piel, cartílago, músculo, tendón, tejido adiposo, córnea, nervios periféricos, columna vertebral y hueso. Se refiere, más particularmente, a nuevas preparaciones de células como un almacén biológico, un método de preparación de las mismas, un uso de las mismas, un dispositivo para la preparación de las mismas y preparaciones que contienen dicha preparación de células para uso extemporáneo.

15 **Antecedentes de la invención**

La importancia de los materiales biológicos autólogos en el proceso de cicatrización está bien documentada. Más importante aún, se ha demostrado que dos materiales biológicos autólogos están directamente implicados en la formación de la estructura de los coágulos sanguíneos, que proporcionan una barrera hemostática cuya función es asegurar la hemostasia y sellar la herida: (1) la fibrina, que se deriva de la separación de fibrinógeno plasmático en dos cadenas mediante la acción de la trombina, y (2) las membranas activadas de las plaquetas.

El proceso de cicatrización de heridas se presenta generalmente como la sucesión de una fase de coagulación, un proceso inflamatorio y un proceso de regeneración.

La fase de coagulación (coagulación sanguínea o formación de coágulos) es un proceso complejo mediante el cual la pared de un vaso sanguíneo dañado se cubre con un coágulo de fibrina para detener la hemorragia y la reparación del vaso dañado se inicia mediante la liberación de grandes cantidades de citocinas y factores de crecimiento a partir de gránulos alfa de plaquetas. 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 traumatismo tisular y su papel en el proceso de cicatrización de heridas, así como en la unión de fracturas óseas, es bien conocido.

El proceso de inflamación, que sigue a la formación de un coágulo sanguíneo, es estimulado por numerosos mediadores vasoactivos y factores quimiotácticos (señales específicas en forma de proteínas) liberados por los glóbulos blancos y las plaquetas. Estas señales atraen a los macrófagos que "limpian" el sitio de bacterias y partículas extrañas, así como de glóbulos rojos antes de la migración de nuevas células.

La fase de regeneración de tejidos implica la quimioatracción y la mitosis de las células indiferenciadas en el almacén (o matriz de crecimiento) formado por el coágulo sanguíneo. Las nuevas células que se multiplican bajo la estimulación de factores de crecimiento plaquetarios reemplazarán a las células dañadas o destruidas ingeridas por macrófagos.

Los factores de crecimiento y numerosas proteínas plasmáticas, también llamadas moléculas de señalización, que promueven la migración y división celular dentro de los coágulos sanguíneos, juegan un papel crucial en el proceso de cicatrización de heridas.

Teóricamente, es posible amplificar los efectos de estas primeras fases en la cascada de cicatrización de heridas desechando los glóbulos rojos y aumentando la concentración de factores de crecimiento.

La amplificación de la coagulación sanguínea se puede definir como la formación de un "coágulo enriquecido (CE)". Los CE se obtienen mediante el uso de concentrados de plaquetas y se han descrito en Platelets and Megacaryocytes 2004, vol. 1 y 2, como "Estructura y señales", Ed. Gibbins y Mahaut-Smith, Humana Press, Nueva Jersey.

El plasma rico en plaquetas (PRP) se puede definir como un concentrado autólogo de plaquetas en un pequeño volumen de plasma; ha sido desarrollado como biomaterial autólogo y ha demostrado su utilidad en la cicatrización y regeneración de tejidos. (Marx y col., 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) que son secretados activamente por las plaquetas y se sabe que tienen un papel fundamental en el proceso de inicio de la cicatrización de heridas.

Por ejemplo, se sabe que el PDGF inicia la cicatrización del tejido conectivo, incluida la regeneración y reparación óseas. El PDGF también aumenta la mitogénesis (células cicatrizantes), la angiogénesis (mitosis endotelial en capilares funcionales) y la activación de macrófagos. También se sabe que el VEGF liberado por los leucocitos tiene

potentes actividades angiogénicas, mitogénicas y potenciadoras de la permeabilidad vascular en las células endoteliales. El TGF- β promueve la mitosis celular y la diferenciación del tejido conectivo y el hueso, actúa sobre las células madre mesenquimatosas, los preosteoblastos y los fibroblastos e inhibe la formación de osteoclastos. Se sabe que el EGF induce el desarrollo epitelial y promueve la angiogénesis.

Los concentrados de plaquetas se usan generalmente en implantología dental y cirugía ósea, especialmente en los EE. UU. Se han desarrollado diversas técnicas de preparación de PRP mediante procesos de centrifugación. Sin embargo, debido a la sensibilidad de las células plaquetarias y la variabilidad de la eficiencia 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. (Marx y col., 2004, *anteriormente*; Roukis y col., Adv. Ther., 2006, 23(2): 218-37): por ejemplo, el material de laboratorio para diagnóstico *in vitro* que se usa para la preparación de plaquetas, conduce a un rendimiento deficiente de plaquetas y otros componentes del plasma (Marx y col., 2004, *anteriormente*: Anitua 35 %, Landsberg 30 %, Clinaseal 39 %, ACE surgical 33 %, Curasan 29 %). La configuración automatizada de Biomet PCCS y GPS (Marx y col., 2004, *anteriormente*), los cuales no solo presentan el inconveniente de ser un proceso complejo con costes prohibitivos para el proceso de una muestra de sangre, conducen a solo un rendimiento del 61 % y SmatPreP de Harvest Technology al 62 %. En esos sistemas, obviamente hay una pérdida importante de tejido biológico valioso de los pacientes, por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar un proceso fiable que recoja las células plasmáticas con altos rendimientos, fácil de usar y rentable.

Recientemente se ha demostrado que los efectos positivos del plasma rico en plaquetas sobre la regeneración ósea abarcan un intervalo limitado de concentración de plaquetas y se ha revelado que se produce un efecto inhibitor en presencia de más de 10^6 plaquetas por μl , que es de 3 a 4 veces el recuento inicial (Weibrich y col., 2004, Bone, 34 (4): 665-71).

Además, la obtención de concentrados de plaquetas todavía requiere el uso de kits relativamente complejos y maquinaria dedicada costosa y la participación igualmente costosa de técnicos especializados. Este inconveniente hace que los métodos de preparación de PRP conocidos actualmente no se adapten a un uso en el punto de atención.

Además, la preparación de células con vistas a la regeneración celular o tisular para uso en trasplantes, regeneración postoperatoria o con fines estéticos se enfrenta al problema de conservación a largo plazo de células y tejidos. La crioconservación de tejidos o células se usa, generalmente, para el mantenimiento a largo plazo de tejidos o células, en particular plaquetas, pero esta técnica ha mostrado inconvenientes y problemas graves tales como formación de cristales, problemas osmóticos, agregación, inhibición de la capacidad de síntesis de proteínas, expresión de proteínas de estrés en respuesta al estrés térmico, etc. Por lo tanto, se sabe que la crioconservación de tejidos o células altera la viabilidad y estabilidad celular (Agence française de sécurité sanitaire, 2003; Arnaud y col., 1999, Cryobiology, 38, 192-199; Tablin y col., 2001, Cryobiology, 43(2), 114-23). Algunos de los efectos secundarios de la crioconservación pueden estar limitados por el uso de agentes anticongelantes tales como DMSO o glicerol u otros crioconservantes (US 5.5891.617, Oh y col., Cornea, 26, 840-846) pero la concentración de estos agentes debe adaptarse para limitar su toxicidad y efectos secundarios. Por lo tanto, existe la necesidad de un método nuevo o alternativo de preparación de células y tejidos adecuado para su uso extemporáneo mientras se preserva su integridad, en particular en términos de capacidad y viabilidad de secreción de factores de crecimiento.

Resumen de la invención

Se describe una nueva preparación de células, un método de preparación de nuevas preparaciones de células, un uso de dichas preparaciones de células que contienen dichas preparaciones de células de plaquetas, opcionalmente mezcladas con un extracto de células, tal como un extracto autólogo de queratinocitos, células de médula ósea, fibroblastos, periostio o células corneales, melanocitos y células de Langerhans; células grasas; células musculares tales como mioblastos y células satélite; osteoblastos; condrocitos; células del cordón umbilical; células de Schwann o células del tendón de Aquiles.

El proceso para la preparación de una composición de concentrado de plaquetas de acuerdo con la invención constituye un proceso fiable que recoge el 95 % $\pm$ 5 de las células plasmáticas, fácil de usar y rentable (Borzini P. y col., *en preparación*).

Se describe un proceso para la preparación de una composición de concentrado de plaquetas, que comprende las etapas de:

a) Centrifugar sangre completa en un tubo separador seleccionado entre:

- un tubo separador de vidrio que contiene un gel tixotrópico a base de poliéster y una solución tamponada de citrato de sodio a 0,10 M; y

- un tubo separador de tereftalato de polietileno que contiene un gel altamente tixotrópico formado por una mezcla de polímero y un citrato de sodio anhidro a 3,5 mg/ml;

b) Separar el plasma rico en plaquetas enriquecido del plasma completo eliminando la mitad del sobrenadante que contiene el plasma pobre en plaquetas;

c) Resuspender el plasma enriquecido;

5 en donde la etapa de centrifugación se realiza a una fuerza de aproximadamente 1500 g a aproximadamente 2000 g en un período de tiempo suficiente para formar una barrera entre el plasma que contiene las plaquetas, los linfocitos y los monocitos y el sedimento que contiene los eritrocitos; la etapa de separación b) se realiza recogiendo el sobrenadante de la parte superior de dicha barrera y en donde el plasma enriquecido está enriquecido en leucocitos, trombocitos y proteínas de adhesión (por ejemplo, fibronectina) en comparación con la sangre completa nativa.

10 Se describe una composición de concentrado de plaquetas aislado que comprende:

a) plasma;

b) plaquetas a una concentración de al menos 300×10^9 células/l;

c) glóbulos blancos a una concentración de al menos $7,0 \times 10^9$ células/l;

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

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

Se describe una composición cicatrizante de heridas que comprende:

a) plasma;

b) plaquetas a una concentración de al menos 300×10^9 células/l;

c) glóbulos blancos a una concentración de al menos $7,0 \times 10^9$ células/l;

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

e) un activador de la coagulación en una relación en volumen (concentrado de plaquetas:activador de la coagulación) de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 10:3;

25 f) opcionalmente un extracto de células autólogas, tal como un extracto de queratinocitos, células de médula ósea, osteoblastos; condrocitos, fibroblastos, periostio o células corneales, melanocitos y células de Langerhans; células grasas; células musculares tales como mioblastos y células satélite; células del cordón umbilical; células de Schwann, células tendinosas o células de los islotes pancreáticos;

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

Se describe un proceso para la preparación de una composición cicatrizante de heridas que comprende:

a) Proporcionar un concentrado de plaquetas de la invención;

30 b) Mezclar el concentrado de plaquetas con un activador de coagulación en una relación en volumen (concentrado de plaquetas:activador de la coagulación) de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 10:3;

c) Mezclar opcionalmente extracto de células autólogas, tal como extracto de queratinocitos, médula ósea, fibroblastos, periostio o células corneales, melanocitos y células de Langerhans; células grasas; células musculares tales como mioblastos y células satélite; osteoblastos; condrocitos; células del cordón umbilical; células de Schwann o células del tendón de Aquiles.

35 Se describe un dispositivo para la preparación de un concentrado de plaquetas a partir de sangre completa que comprende un tubo separador en donde el tubo separador se selecciona entre:

- un tubo separador de vidrio que contiene un gel tixotrópico a base de poliéster y una solución tamponada de citrato de sodio a 0,10 M; y

40 - un tubo separador de tereftalato de polietileno que contiene un gel altamente tixotrópico formado por una mezcla de polímeros y un citrato de sodio anhidro a 3,5 mg/ml;

caracterizado por que el dispositivo tiene una entrada para introducir dicha sangre completa, se mantiene en un vacío destinado a aspirar la muestra de sangre completa, es estéril, tiene un vacío utilizable de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 ml y es adecuado para someterse a centrifugación.

45 Se describe un uso de un concentrado de plaquetas de acuerdo con la invención para la fabricación de un

medicamento para la cicatrización de heridas o para promover el crecimiento óseo o periodontal y/o la regeneración ósea y/o tisular.

5 Se describe un uso de un concentrado de plaquetas de acuerdo con la invención para la fabricación de una preparación cosmética para su uso como agente antienviejecimiento o agente reparador de la piel, tal como agente reparador de cicatrices, relleno de arrugas y/o agente reparador.

Se describe una composición farmacéutica que comprende un concentrado de plaquetas de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se describe una composición cosmética que comprende un concentrado de plaquetas de acuerdo con la invención y un vehículo cosméticamente aceptable.

10 Se describe un dispositivo implantable para su uso en terapia de regeneración de tejidos, que comprende:

(a) un núcleo permeable que comprende un concentrado de plaquetas de la invención; y

(b) una envoltura externa que rodea dicho núcleo, comprendiendo dicha envoltura un material biocompatible, preferentemente biorreabsorbible.

15 Se describe un kit adaptado para la regeneración de tejidos que comprende un tubo separador de acuerdo con la invención, accesorios de flebotomía para la preparación del cicatrizante de heridas de acuerdo con la invención y un dispositivo aplicador (por ejemplo, una jeringa doble) para la dispensación simultánea sobre la herida del concentrado de plaquetas de acuerdo con la invención y un activador de la coagulación.

20 En un duodécimo aspecto, la invención proporciona un método para promover la cicatrización y/o el sellado de heridas y/o la regeneración de tejidos y/o huesos en una herida de un ser humano o un animal inferior que comprende:

a) Proporcionar un cicatrizante de heridas de acuerdo con la invención;

b) Aplicar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho cicatrizante de heridas a una herida, un tejido dañado o un hueso dañado.

25 Se describe un método para inducir la regeneración periodontal en una herida o un defecto periodontal de un mamífero con enfermedad periodontal u otra afección que requiera regeneración periodontal, que comprende:

a) Proporcionar un cicatrizante de heridas de acuerdo con la invención;

b) Aplicar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho cicatrizante de heridas a dicha herida o dicho defecto o cavidad periodontal;

30 c) Opcionalmente insertar una barrera periodontal, en donde la barrera se coloca entre el tejido gingival y la herida tratada de acuerdo con las etapas a) y b) y dicha barrera se selecciona entre una membrana, un polímero biodegradable y/o un material poroso biocompatible;

d) Cerrar la herida.

Se describe un método para promover la regeneración de la piel en una cicatriz o una arruga de un ser humano o animal inferior, que comprende:

35 a) Proporcionar un cicatrizante de heridas de acuerdo con la invención;

b) Rellenar la cicatriz de la piel o la línea de la arruga con dicho cicatrizante de heridas.

Se describe un proceso para la preparación de una composición de células, que comprende las etapas de:

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

40 - un tubo separador de vidrio que contiene un gel tixotrópico a base de poliéster y una solución tamponada de citrato de sodio a 0,10 M; y

- un tubo separador de tereftalato de polietileno que contiene un gel altamente tixotrópico formado por una mezcla de polímero y un citrato de sodio anhidro a 3,5 mg/ml;

(b) Separar opcionalmente el plasma rico en plaquetas enriquecido del plasma completo eliminando la mitad del sobrenadante que contiene el plasma pobre en plaquetas;

45 (c) Resuspender el plasma enriquecido;

(d) Proporcionar un extracto de células tal como un extracto de células dérmicas tales como queratinocitos, fibroblastos, melanocitos y células de Langerhans; células grasas; células de médula ósea; células musculares tales como mioblastos y células satélite; osteoblastos; condrocitos; células de la membrana perióstica; células corneales; células del cordón umbilical; células de Schwann, células tendinosas o células de los islotes pancreáticos;

(e) Mezclar el concentrado de plaquetas obtenido en la etapa (c) con el extracto de células obtenido en (d);

en donde la etapa de centrifugación a) se realiza con una fuerza de aproximadamente 1500 g a aproximadamente 2000 g en un período de tiempo suficiente para formar una barrera entre el plasma que contiene las plaquetas, los linfocitos y los monocitos y el sedimento que contiene los eritrocitos; la etapa de separación b) se realiza recogiendo el sobrenadante de la parte superior de dicha barrera y en donde el plasma enriquecido está enriquecido en leucocitos, trombocitos y proteínas de adhesión (por ejemplo, fibronectina) en comparación con la sangre completa nativa.

Se describe un proceso para la preparación de una composición cicatrizante de heridas o tejidos, que comprende las etapas de:

a) Centrifugar sangre completa en un tubo separador seleccionado entre:

- un tubo separador de vidrio que contiene un gel tixotrópico a base de poliéster y una solución tamponada de citrato de sodio a 0,10 M; y
- un tubo separador de tereftalato de polietileno que contiene un gel altamente tixotrópico formado por una mezcla de polímero y un citrato de sodio anhidro a 3,5 mg/ml;

b) Separar opcionalmente el plasma rico en plaquetas enriquecido del plasma completo eliminando la mitad del sobrenadante que contiene el plasma pobre en plaquetas;

c) Resuspender el plasma enriquecido;

d) Mezclar el concentrado de plaquetas obtenido en la etapa (c) con un activador de coagulación en una relación en volumen (concentrado de plaquetas:activador de la coagulación) de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 10:3;

e) Proporcionar un extracto de células, tal como un extracto de células dérmicas, tales como queratinocitos, fibroblastos, melanocitos y células de Langerhans; células grasas; células de médula ósea; células musculares tales como mioblastos y células satélite; osteoblastos; condrocitos; células de la membrana perióstica; células corneales; células del cordón umbilical; células de Schwann, células tendinosas o células de los islotes pancreáticos;

f) Mezclar la mezcla de concentrado de plaquetas obtenida en la etapa (d) con el extracto de células obtenido en (e); en donde la etapa de centrifugación se realiza a una fuerza de aproximadamente 1500 g a aproximadamente 2000 g en un período de tiempo suficiente para formar una barrera entre el plasma que contiene las plaquetas, los linfocitos y los monocitos y el sedimento que contiene los eritrocitos; la etapa de separación b) se realiza recogiendo el sobrenadante de la parte superior de dicha barrera y en donde el plasma enriquecido está enriquecido en leucocitos, trombocitos y proteínas de adhesión (por ejemplo, fibronectina) en comparación con la sangre completa nativa.

Se describe una composición de células aisladas que comprende:

a) plasma;

b) plaquetas a una concentración de al menos 300×10^9 células/l;

c) glóbulos blancos a una concentración de al menos $7,0 \times 10^9$ células/l;

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

e) un extracto de células, tal como un extracto de células dérmicas tales como queratinocitos, fibroblastos, melanocitos y células de Langerhans; células grasas; células de médula ósea; células musculares tales como mioblastos y células satélite; osteoblastos; condrocitos; células de la membrana perióstica; células corneales; células del cordón umbilical; células de Schwann, células tendinosas o células de los islotes pancreáticos en donde las células están a una concentración de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^6 células/ml de plasma o plasma enriquecido;

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

Se describe una composición de células aisladas que comprende:

- a) plasma;
- b) plaquetas a una concentración de al menos 300×10^9 células/l;
- c) glóbulos blancos a una concentración de al menos $7,0 \times 10^9$ células/l;
- d) fibrinógeno a una concentración de al menos 3 mg/l;

5 e) un activador de la coagulación en una relación en volumen (concentrado de plaquetas:activador de la coagulación) de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 10:3;

10 f) un extracto de células, tal como un extracto de células dérmicas tales como queratinocitos, fibroblastos, melanocitos y células de Langerhans; células grasas; células de médula ósea; células musculares tales como mioblastos y células satélite; osteoblastos; condrocitos; células de la membrana perióstica; células corneales; células del cordón umbilical; células de Schwann, células tendinosas o células de los islotes pancreáticos en donde las células están a una concentración de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^6 células/ml de plasma o plasma enriquecido;

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

15 Se describe una composición cicatrizante de heridas o tejidos que comprende una composición de células aisladas de acuerdo con la invención.

En un vigésimo aspecto, la invención proporciona un método para promover la cicatrización y/o el sellado de heridas y/o la regeneración de un tejido y/o un cartílago y/o un hueso y/o un nervio en un ser humano o un animal inferior, que comprende:

- 20 a) Proporcionar una composición cicatrizante de heridas o tejidos o una composición de células de acuerdo con la invención;
- b) Aplicar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición cicatrizante de heridas o tejidos o composición de células a una herida, un tejido dañado o un cartílago dañado o un hueso dañado.

Se describe un método para aumentar el volumen de tejido adiposo en un mamífero con un injerto de grasa dérmica u otra afección que requiere la regeneración del tejido adiposo, que comprende:

- 25 a) Proporcionar una composición de células grasas de acuerdo con la invención;
- b) Aplicar una cantidad terapéutica o cosméticamente eficaz de dicha composición de células grasas al injerto de grasa dérmica o al tejido adiposo que requiere la regeneración del tejido adiposo;
- 30 c) Opcionalmente insertar un colgajo o implante quirúrgico, en donde el colgajo o implante quirúrgico, se sitúa en el sitio que requiere regeneración o amplificación volumétrica y dicho colgajo o implante quirúrgico comprende una combinación de una preparación de células grasas de acuerdo con la invención y plasma o material plasmático enriquecido.

Se describe un método para inducir la regeneración del miocardio en un mamífero con deficiencia de miocardio u otra afección que requiera regeneración de tejido del miocardio, que comprende:

- 35 a) Proporcionar una composición de células musculares o de células de médula ósea de acuerdo con la invención;
- b) Aplicar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición de células musculares al tejido miocárdico que requiere regeneración.

Se describe un método para inducir la regeneración corneal en un mamífero con deficiencia corneal u otra afección que requiera regeneración corneal, que comprende:

- 40 a) Proporcionar una composición de células de córnea de acuerdo con la invención;
- b) Aplicar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición de células corneales a

Se describe un método para inducir la regeneración articular o cartilaginosa en un mamífero con deficiencia articular o cartilaginosa u otra afección que requiera regeneración de tejido articular o cartilaginosa, que comprende:

- 45 a) Proporcionar una composición de células de condrocitos o de células de médula ósea de acuerdo con la invención;
- b) Aplicar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición de células de condrocitos al tejido articular o cartilaginosa que requiere regeneración;

c) Opcionalmente insertar un colgajo o implante quirúrgico, en donde el colgajo o implante quirúrgico, se sitúa en el defecto del cartílago o debajo de un parche perióstico, y dicho colgajo o implante quirúrgico comprende una combinación de una composición de condrocitos o células de médula ósea de acuerdo con la invención y plasma o material plasmático enriquecido.

5 Se describe un método para promover la regeneración de la piel en una cicatriz, una arruga o una deficiencia de grasa de un ser humano o animal inferior, que comprende:

- a) Proporcionar un cicatrizante de heridas o tejidos o una composición de células de acuerdo con la invención;
- b) Rellenar la cicatriz de la piel, la línea de arrugas o la deficiencia de grasa con dicho cicatrizante de heridas o tejido o composición de células de acuerdo con la invención.

10 Se describe un método para inducir la regeneración del nervio periférico en un mamífero con daño del nervio periférico, sutura del nervio o lesión de la médula espinal u otra afección que requiera la regeneración del nervio periférico, que comprende:

- a) Proporcionar una composición de células de Schwann de acuerdo con la invención;
- b) Aplicar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición de células de Schwann al nervio periférico que requiere regeneración.

15

Se describe un método para inducir la regeneración ósea en un mamífero con daño óseo, deficiencia ósea u otra afección que requiera regeneración ósea, que comprende:

- a) Proporcionar una composición de células de médula ósea o de células de osteoblastos de acuerdo con la invención;

20 b) Aplicar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición de células de médula ósea o células de osteoblastos al hueso que requiere regeneración.

Se describe un método para el tratamiento de la diabetes tipo I, diabetes insulino dependiente o hiperglucemia en un mamífero que comprende:

- a) Proporcionar una composición de células de los islotes pancreáticos de acuerdo con la invención;

25 b) Aplicar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición de células de los islotes pancreáticos, por ejemplo, mediante inyección.

Se describe un método para el tratamiento de la incontinencia urinaria en un mamífero u otra afección que requiera regeneración de la vejiga, que comprende:

- a) Proporcionar una composición de células de mioblastos de acuerdo con la invención;

30 b) Aplicar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición de células de mioblastos en el cuello de la vejiga que requiere regeneración.

Se describe un método para el tratamiento de la incontinencia anal en un mamífero u otra afección que requiera regeneración del músculo anal, que comprende:

- a) Proporcionar una composición de células de mioblastos de acuerdo con la invención;

35 b) Aplicar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición de células de mioblastos al área para-anal que requiere regeneración.

Se describe un método para el tratamiento de la esofagitis por reflujo o los trastornos por reflujo gastroesofágico en un mamífero u otra afección que requiera la regeneración del esfínter esofágico, que comprende:

- a) Proporcionar una composición de células de mioblastos de acuerdo con la invención;

40 b) Aplicar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición de células de mioblastos al esfínter esofágico que requiere regeneración.

Se describe el uso de una preparación de células 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, tejido adiposo, córnea, nervios periféricos, médula espinal o hueso.

45 Se describe un uso de una composición de células para 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 lipoatrofia o agente reparador y/o de relleno de arrugas.

Se describe una composición farmacéutica que comprende una composición de células y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se describe una composición cosmética que comprende una composición de células y un vehículo cosméticamente aceptable.

5 Se describe un dispositivo implantable para su uso en terapia de regeneración de tejidos, que comprende:

a) un núcleo permeable que comprende una composición de células; y

b) una envoltura externa que rodea dicho núcleo, comprendiendo dicha envoltura un material biocompatible, preferentemente biorreabsorbible.

10 Los usos, métodos y composiciones correspondientes son útiles en la regeneración y/o rejuvenecimiento de tejidos, huesos y/o cartílagos.

Los usos, métodos y composiciones de acuerdo con son particularmente útiles en el tratamiento de úlceras neuropáticas diabéticas o llagas por decúbito; daños en los huesos y cartílagos, tal como cartílago articular profundo o daños condrales, tales como reparación quirúrgica de tendones desgarrados; artritis en la articulación causada por traumatismos 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 miembros inferiores de equinos; enfermedades periodontales; cirugía de implantes; daños en el músculo cardíaco, 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 de folículos pilosos en las áreas de quemaduras laterales), cirugía de estiramiento facial (ritidectomía), rinoplastia, injertos de grasa dérmica (en el tratamiento de aumento facial, hemiatrofia congénita de la cara tal como atrofia y lipoatrofia congénita de del cartílago nasal, tal como en pacientes con VIH/SIDA, erosión y artroscopia); complicaciones de la cicatrización de heridas, tales como después de una blefaroplastia de párpados; trastornos de la córnea tales como la opacidad de la córnea, tales como los provocados por quemaduras químicas, afección por el síndrome de Steven Johnson y úlceras corneales; formación de tejido cicatricial de la córnea; síndrome del ojo seco; enfermedades hematológicas tales como talasemia; daño del nervio periférico, sutura del nervio y lesión de la médula espinal; defectos o trastornos óseos tales como injerto óseo o fractura ósea, daños o trastornos en la piel tales como acné (especialmente después de un tratamiento de dermoabrasión), quemaduras, rubéola o cicatrices de viruela, vitíligo, lipoatrofia, sarcoma de Kaposi, queloides cutáneos o fibromatosis palmar de Dupuytren.

30 En otro aspecto, los usos, métodos y composiciones son útiles en la regeneración y/o rejuvenecimiento de los tejidos de la piel, particularmente para promover y/o iniciar la regeneración de la piel tal como la reducción de arrugas cutáneas, acné (especialmente después de un tratamiento de dermoabrasión), quemaduras, rubéola o cicatrices de 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 de 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 piel y de tejidos.

Descripción de las figuras:

40 La figura 1 es una representación esquemática de la variación de concentración en factores de crecimiento (PDGF-AB, EGF y VEGF) de una composición de concentrado de plaquetas de acuerdo con la invención frente al tiempo (T en horas) después de la etapa de centrifugación en el proceso de preparación de la invención.

45 La figura 2 es una representación esquemática del resultado del tratamiento de un sitio donante de injerto de piel con una preparación que contiene una composición de concentrado de plaquetas de acuerdo con la invención en comparación con un grupo de control en términos de tiempo de cicatrización en días (HT), dolor el día 5 en una escala de 0 a 10 (P) y epitelización el día 5 en una escala de 0 a 7 (E). Grupo de control: C, preparación rica en plaquetas sola: RegenPRP™, preparación rica en plaquetas y queratinocitos autólogos: RegenExtracell™. La línea de puntos indica cuándo se cambia el primer vendaje el día 5.

La figura 3 representa la morfología de un fibroblasto humano expandido en una preparación de células de acuerdo con la invención en las condiciones descritas en el ejemplo 7, mostrando ramificación y filopodios x 5.000 (microscopio invertido Olympus®).

50 La figura 4a representa un armazón en 3D de fibroblastos humanos de una preparación de células de acuerdo con la invención en las condiciones descritas en el ejemplo 7.

La figura 4b representa monocapas de fibroblastos densamente empaquetados en cultivo en 3D a partir de una preparación de células de acuerdo con la invención en las condiciones descritas en el ejemplo 7.

Descripción detallada de la invención:

Los siguientes párrafos proporcionan definiciones de los términos y están destinados a aplicarse uniformemente a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, a menos que una definición establecida expresamente de otro modo proporcione una definición más amplia.

5 Por la expresión "tixotrópico" se entiende 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 las características de los materiales especificados que determinan el grado de gelificación, tal como por ejemplo la firmeza o dureza del material, el grado en el que el material se resiste a fluir como un fluido. Un gel tixotrópico de acuerdo con la invención que comprende un gel de poliéster o una mezcla del mismo que es insoluble en agua y químicamente inerte a los constituyentes de la sangre que se pueden usar de acuerdo con la invención. Los geles tixotrópicos típicos se usan en la separación de células sanguíneas con fines diagnósticos y proteómicos.

La expresión "punto de atención" se refiere a todos los servicios prestados a los pacientes junto a la cama.

15 La expresión "accesorios de flebotomía" o "accesorios de punción venosa" se refiere a los accesorios que permiten la punción de una vena con una aguja con el fin de extraer sangre.

Por la expresión "cicatrizante de heridas" o "sellador de heridas" o una "composición cicatrizante de tejidos" se entiende un agente o una composición que puede promover y/o aumentar la velocidad y/o calidad de cicatrización de una herida. Los cicatrizantes o selladores de heridas pueden promover la regeneración de tejidos.

20 Por la expresión "herida" se entiende cualquier tejido dañado, por ejemplo, después de un traumatismo o cirugía. Las heridas en mamíferos incluyen, por ejemplo, úlceras de decúbito, úlceras, laceraciones y quemaduras, sitios de injerto (sitios donantes y aceptores del injerto), fístulas, daños al tejido periodontal, heridas diabéticas que no cicatrizan, consecuencias de traumatismos o cualquier acto quirúrgico. En su sentido general, la expresión también pretende abarcar daños en la piel donde la superficie de la piel presenta alguna depresión sin necesariamente un corte en su superficie, tales como daños en los tejidos relacionados con la edad (por ejemplo, arrugas) y cicatrices tales como, por ejemplo, el acné (especialmente después de un tratamiento de dermoabrasión) o cicatrices de rubéola.

25 Por la expresión "PRP" se entiende un plasma rico en plaquetas, preferentemente de origen humano, más preferentemente autólogo, preparado mediante el proceso de la invención con el fin de sedimentar y eliminar eritrocitos y concentrar el plasma en leucocitos, trombocitos y proteínas de adhesión en comparación con sangre completa nativa.

30 Por la expresión "autólogo" o "autógeno" se entiende un método de la invención que usa sangre de un solo donante y en el que la sangre extraída de este donante está destinada a ser usada en el mismo donante. Por el contrario, los métodos "alógenos" usan sangre 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 el cribado para asegurar que el donante era biológica o inmunológicamente compatible con el paciente y la posible contaminación con hepatitis, VIH, priones, Enfermedad de Creutzfeld-Jacobs y similares.

Por la expresión "activador de la coagulación" se entiende un agente que puede desencadenar o activar la coagulación. Un activador de la coagulación comprende un activador de trombina y/o un activador de fibrinógeno.

40 La expresión "activador de trombina" se refiere a un agente que puede activar la trombina y desencadenar la coagulación. Los activadores de trombina típicos son ciertos cofactores tales como el sodio o el calcio. Al poner en práctica esta invención, la activación de la trombina se produce preferentemente en presencia de iones calcio. Los iones calcio se añaden generalmente al concentrado de plaquetas como una solución salina para proporcionar una concentración final generalmente de aproximadamente 0,1 mg/ml de concentrado de plaquetas. Las sales de calcio adecuadas incluyen, sin limitación, CaCO_3 y CaSO_4 . Una sal de calcio preferida para su uso en la invención es el cloruro de calcio (CaCl_2). CaCl_2 está disponible como inyección de cloruro de calcio, USP 10 % (Regen Lab, Suiza).

45 Por la expresión "activador de fibrinógeno" se entiende un agente que es capaz de activar la conversión de fibrinógeno en fibrina y desencadena la formación del coágulo. Los activadores de fibrinógeno típicos son la trombina o la 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 cloruro 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 autólogo de trombina de acuerdo con la invención.

55 Por la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende la cantidad o cantidades de los elementos constituyentes o la combinación de los mismos necesaria para mejorar la cicatrización de heridas, tal como, por

- ejemplo, la reducción del volumen o área superficial de una herida, el aumento de la cantidad de tejido de granulación u otro material biológico que facilite la formación de colágeno, crecimiento vascular, proliferación de fibroblastos o cicatrización general; se supone que todas las versiones de la invención descritas en el presente documento tienen la o las cantidades de efecto terapéutico de las 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, corticosteroides 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.
- Las composiciones, usos y métodos de acuerdo con la invención son particularmente útiles en tratamientos de cicatrización o regeneración de heridas o tejidos, especialmente el tratamiento de heridas traumáticas o quirúrgicas tales como el ajuste y/o sujeción y/o sellado de injertos nativos o protésicos (especialmente de piel, injertos óseos y/o prótesis o implantes dentales o similares, incluyendo también el sitio donante del injerto); tratamiento de vasculitis; úlceras tales como úlceras neuropáticas diabéticas o úlceras por decúbito; radiodermatitis (por ejemplo, después de la irradiación de un carcinoma epidermoidal de piel) y fístulas de cierre (tales como para ciclistas).
- Además, las composiciones, usos y métodos son particularmente útiles en 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.
- Además, las composiciones, usos y métodos son particularmente útiles en el tratamiento de la incontinencia urinaria y/o anal.
- Además, las composiciones, usos y métodos de acuerdo con la invención son particularmente útiles en el tratamiento de la esofagitis por reflujo y/o el trastorno por reflujo gastroesofágico.
- Además, las composiciones, usos y métodos son particularmente útiles en el tratamiento de daños cutáneos tales como en pieles dañadas por radiaciones (radiodermatitis o piel dañada por el sol), pieles envejecidas o pieles quemadas y/o en la mejora de arrugas faciales, arrugas, acné (especialmente después de un tratamiento de dermoabrasión), quemaduras, cicatrices de rubéola o viruela, vitiligo, lipoatrofia o lipodistrofia, sarcoma de Kaposi, queloides cutáneos o fibromatosis palmar de Dupuytren y/o en tratamientos de rejuvenecimiento cutáneo.
- Además, las composiciones, usos y métodos son particularmente útiles en el tratamiento de la lipoatrofia, tal como en pacientes con VIH/SIDA, y en otras hemiatrofias congénitas de la cara, tal como la atrofia congénita del cartílago nasal. Además, las composiciones, usos y métodos son particularmente útiles en el tratamiento de trastornos óseos, cartilaginosos y articulares tales como daño condral, artritis, lesión cartilaginosa y/o ósea tal como daño profundo del cartílago y/o erosión y/o artroscopia, desgarrar de tendón y manguito rotador en el hombro.
- Además, las composiciones, usos y métodos son particularmente útiles en el tratamiento de enfermedades hematológicas tales como la talasemia.
- Además, las composiciones, usos y métodos son particularmente útiles en el tratamiento de trastornos de la córnea tales como el síndrome del ojo seco; opacidad corneal tal como la causada por quemaduras químicas, aflicción por el síndrome de Steven Johnson; formación de tejido cicatricial de la córnea y úlceras corneales.
- Además, las composiciones, usos y métodos son particularmente útiles en el tratamiento del daño de nervios periféricos, sutura de nervios y lesión de la médula espinal.
- Además, las composiciones, usos y métodos son particularmente útiles en el tratamiento de diabetes tipo 1, diabetes insulino dependiente y/o hiperglucemia.
- Además, las composiciones, usos y métodos son particularmente útiles en el tratamiento de defectos o trastornos óseos tales como injerto óseo o fractura ósea.
- El uso de la composición resultante se puede modificar adicionalmente antes de la aplicación y de acuerdo con el objetivo terapéutico.
- Las composiciones 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 usarse como una mezcla con extractos óseos en un proceso para el recrecimiento de hueso, por ejemplo, en procedimientos craneofaciales y ortopédicos.
- Las composiciones se pueden usar como sellador de heridas en cirugía plástica que incluye injertos de quemaduras y otras aplicaciones de injertos de piel libre, por ejemplo, en oncología para favorecer la regeneración tisular, incluida la (neo)vascularización acelerada.

Las composiciones son particularmente útiles en tratamientos de cicatrización de heridas en el sitio donante del injerto de piel. La retirada de un injerto de piel sobre una piel sana crea una nueva herida en el sitio del donante que normalmente cicatriza espontáneamente entre 12 y 14 días. Sin embargo, esta cicatrización es extremadamente exigente para el organismo, sobre todo si el sitio donante es amplio o la persona es menos resistente (por ejemplo, víctimas de quemaduras, personas que sufren de múltiples traumatismos, personas tratadas con corticoides, niños o ancianos) y las pérdidas energéticas aumentan incluso por la pérdida de minerales, oligoelementos y proteínas inducida por las pérdidas de líquido de la nueva herida. Además, un dolor importante durante los primeros 8 días suele estar presente en el sitio del donante del injerto. Los tratamientos de reducción del dolor se usan a menudo, tal como el uso de analgésicos (por ejemplo, morfina) y/o apósitos hidrocelulares para heridas, sin embargo, el dolor permanece presente, especialmente durante el cambio de apósito que ocurre imperativamente dentro de las 48 horas hasta 1 semana después de la retirada del injerto. Además, los apósitos hidrocelulares para heridas tienen los inconvenientes no solo de ser bastante costosos sino también de mantener la humedad en la herida, evitar su secado, aumentar la profundidad de la herida, favorecer el brote de infecciones bacterianas y causal cicatrices no estéticas. Por lo tanto, es muy deseable una estimulación de la cicatrización del sitio donante del injerto de piel.

Las composiciones están particularmente adaptadas a heridas crónicas que pueden carecer de suficiente circulación sanguínea para facilitar la cascada de cicatrización de heridas.

Las composiciones y los métodos también se pueden usar en 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 cavidad periodontal en un ser humano o en un animal inferior que necesita regeneración del tejido periodontal una composición de acuerdo con la invención.

Las composiciones son efectivas para eliminar o reducir en gran medida el sangrado postoperatorio y la extravasación o pérdida de líquido seroso u otro en estas aplicaciones, para reducir el riesgo de infección causado por la mayoría de las bacterias y/o mejorar la formación de tejido conectivo en comparación con la cicatrización natural (es decir, sin agentes exógenos añadidos) o con la cicatrización obtenida mediante el uso de otros concentrados de plaquetas preparados con métodos conocidos.

Las composiciones son particularmente útiles en la preparación de productos farmacéuticos para 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 reducir las arrugas de la piel, acné (especialmente después del tratamiento de dermoabrasión), rubéola o pequeñas cicatrices de viruela, vitiligo y lipoatrofia (por ejemplo, composiciones antienvjecimiento y composiciones de regeneración de la piel).

Las composiciones pueden administrarse localmente o inyectarse en la herida o dentro o cerca del órgano injertado o inyectarse por vía subcutánea. La administración local puede ser por inyección en el sitio de la lesión o defecto o por inserción o fijación de un vehículo sólido en el sitio, o por mezcla con una crema o emulsión, o por inclusión en un tisú, papel o vehículo de hidrogel, o por aplicación tópica directa de la composición tal como en forma de colirio. Preferentemente, las composiciones son composiciones fácilmente inyectables. La vía de administración, la dosis administrada, como dosis única 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), grado de síntomas, tratamientos concurrentes, frecuencia de tratamiento y el efecto deseado.

Las composiciones se pueden administrar en combinación con un coagente útil en el tratamiento de la regeneración de tejidos, tal como un agente cicatrizante, un relleno de arrugas, un agente antienvjecimiento tal como un complejo vitamínico antienvjecimiento, un agente antibacteriano, un agente antibiótico, un agente corticosteroide, un agente antálgico y analgésico, o un agente anestésico tal como la adrenalina, etc. Se describen composiciones combinadas con un coagente útil en el tratamiento de la regeneración tisular para uso simultáneo, separado o secuencial en la terapia de regeneración tisular, tal como cicatrización de heridas, reparación del crecimiento óseo y periodontal.

Las composiciones, el dispositivo y los procedimientos para la preparación de concentrados de plaquetas autólogos o composiciones de células son particularmente útiles para uso terapéutico, particularmente como pegamento biológico autógeno en un sistema hemostático destinado a acelerar el proceso fisiológico de regeneración tisular, por ejemplo, en implantología dental, cirugía de piel y ósea, cirugía de cartílagos y tendones, regeneración de nervios corneales y periféricos y cirugía cardíaca. Las composiciones, el dispositivo y los procedimientos para la preparación de concentrados de plaquetas autólogos y la composición de células de la invención son particularmente útiles para uso cosmético, particularmente como material de rejuvenecimiento autógeno destinado a usarse, por ejemplo, como relleno de arrugas, cicatrices o deficiencia de grasa, solo o en combinación con al menos un agente antienvjecimiento.

El concentrado de plaquetas de la invención puede combinarse con una preparación de extracto de células autólogas tales como, por ejemplo, queratinocitos, células de médula ósea, osteoblastos, condrocitos, fibroblastos, perostio, melanocitos y células de Langerhans; células grasas; células de médula ósea; células musculares tales como mioblastos y células satélite; células de la membrana perióstica; células corneales; células del cordón

umbilical; células del tendón o células de los islotes pancreáticos. Los queratinocitos se pueden recoger mediante un método descrito por Reinwald y Green, 1975, Cell, 6 (3): 331-43. Otras células mencionadas se pueden recoger mediante métodos descritos en "Culture de cellules animales; méthodologies-applications", 2003, Ed. Barlovatz-Meimom y Adolphe, ediciones INSERM, París. Como alternativa, los extractos de células se derivan de un banco de células o un cultivo celular o se recogen como se describe en los ejemplos a continuación.

El concentrado de plaquetas y las composiciones de células han demostrado ser realmente beneficiosos en la aceleración y/o promoción del proceso de cicatrización de heridas, incluso heridas crónicas que no cicatrizan, dando lugar a cierres exitosos donde semanas de terapias convencionales habían fallado y logrando una disminución de los riesgos de infección, una mejora en la recuperación y comodidad del paciente, una reducción de los costes de atención médica y un resultado final más estético.

Por supuesto, las composiciones también se pueden preparar a partir de plasma derivado de varios donantes identificados. La invención no se limita a materiales biológicos autólogos, tales como la recogida de plaquetas concentradas del propio material biológico del herido. La invención 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 la composición cicatrizante de heridas descrita en el presente documento, a menos que resulte bioincompatibilidad por el uso de dichos materiales biológicos de terceros.

Se describe un proceso para la preparación de una composición de concentrado de plaquetas o una composición de células como se describe en el presente documento.

Se describe un dispositivo para la preparación de una composición de concentrado de plaquetas a partir de sangre completa como se describe en el presente documento.

Se describe un proceso para la preparación de una composición de concentrado de plaquetas en donde la etapa de centrifugación se realiza a una fuerza entre aproximadamente 1500 g y hasta aproximadamente 1700 g durante un tiempo seleccionado de aproximadamente 3 min hasta aproximadamente 15 min, preferentemente a 1500 g durante aproximadamente 8 min.

Se describe un proceso para la preparación de una composición de concentrado de plaquetas en donde el tubo separador tiene una entrada para introducir dicha sangre completa, se mantiene en un vacío destinado a aspirar la muestra de sangre completa, es estéril, tiene un vacío utilizable de 8 a 10 ml y es adecuado para someterse a centrifugación.

Se describe un proceso para la preparación de una composición de concentrado de plaquetas en donde el tubo separador es un tubo separador de tereftalato de polietileno que contiene un gel altamente tixotrópico formado por una mezcla de polímeros y un citrato de sodio anhidro a 3,5 mg/ml.

Se describe una composición de concentrado de plaquetas aislado que se puede obtener mediante el proceso de acuerdo con la invención.

Se describe una composición de concentrado de plaquetas aislado, que comprende:

a) plasma;

b) plaquetas a una concentración de al menos 300×10^9 células/l, preferentemente de al menos 350×10^9 células/l, más preferentemente de al menos 400×10^9 células/l;

c) glóbulos blancos a una concentración de al menos $7,0 \times 10^9$ células/l, preferentemente de al menos $8,0 \times 10^9$ células/l;

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

y en donde la concentración de eritrocitos es menor de $0,6 \times 10^{12}$ células/l, preferentemente menos de $0,5 \times 10^{12}$ células/l.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición cicatrizante de heridas o tejidos, que comprende:

a) plasma;

b) plaquetas a una concentración de al menos 300×10^9 células/l, preferentemente de al menos 350×10^9 células/l, más preferentemente de al menos 400×10^9 células/l;

c) glóbulos blancos a una concentración de al menos $7,0 \times 10^9$ células/l, preferentemente de al menos $8,0 \times 10^9$ células/l;

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

e) un activador de la coagulación en una relación en volumen (concentrado de plaquetas:activador de la coagulación) de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 10:3;

f) opcionalmente un extracto de células autólogas, tal como extracto de queratinocitos, células de médula ósea, fibroblastos, periostio, melanocitos y células de Langerhans; células grasas; células de médula ósea; células musculares tales como mioblastos y células satélite; osteoblastos; condrocitos; células de la membrana perióstica; células corneales; células del cordón umbilical; células de tendones o células de islotes pancreáticos;

y en donde la concentración de eritrocitos es menor de $0,6 \times 10^{12}$ células/l, preferentemente menos de $0,5 \times 10^{12}$ células/l.

En otra realización, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición cicatrizante de heridas o tejidos como se describe en el presente documento.

En otra realización adicional, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición cicatrizante de heridas o tejidos en donde el activador de la coagulación que se mezcla es cloruro cálcico al 10 %.

En otra realización adicional, la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición cicatrizante de heridas o tejidos en donde el activador de la coagulación que se mezcla en la etapa b) es una preparación enriquecida en trombina. Un método para preparar trombina para su uso en un pegamento biológico se describe en el documento US 6.472.162 mediante la adición del 8 al 20 % de ETOH a un volumen de plasma y esta preparación puede usarse como una preparación enriquecida en trombina en el contexto de la invención. Como alternativa, se puede usar un suero autólogo de trombina (ATS) como preparación enriquecida en trombina en el contexto de la invención. Un suero autólogo de trombina de acuerdo con la invención se obtiene mediante un proceso que comprende (i) la adición a la muestra de sangre completa de un paciente (por ejemplo, 8 ml) recogida en un tubo separador de la invención, un 10 % del volumen final de cloruro de calcio al 10 % (por ejemplo, 1 ml) y un 10 % del volumen final de una preparación de solución de etanol al 95 % en volumen (por ejemplo, 1 ml) y (ii) precipitación durante aproximadamente 30 min a temperatura ambiente. Después de 30 min, centrifugar a o aproximadamente a 1500 g durante aproximadamente de 8 a 10 min. En una realización preferida adicional, la preparación enriquecida en trombina y preferentemente el suero autólogo de trombina se mezclan en la etapa b) directamente sobre la herida.

Se describe la preparación de una composición cicatrizante de heridas o tejidos de acuerdo con la invención en donde una etapa adicional b') en donde la composición de preparación rica en plaquetas activadas (obtenida mediante la mezcla del concentrado de plaquetas con dicho activador de coagulación) obtenida en la etapa b) puede deshidratarse parcialmente por el contacto de un apósito cubierto por una capa hidrófoba suave para evitar la contaminación con microhilos del apósito con el fin de obtener un gel semisólido que pueda ser manipulado con instrumentos adecuados, por ejemplo para llenar un deficiencia de cavidad o tejido, o como una matriz de crecimiento ("armazón") mientras se espera la reconstitución de la matriz extracelular autógena. El cicatrizante de heridas o tejidos obtenido es particularmente útil en un método para inducir la regeneración periodontal en una herida, un tejido o un defecto o una cavidad periodontal.

Se describe un proceso para la preparación de un cicatrizante de heridas o tejido o una composición de células en donde el extracto de células es un extracto de queratinocitos.

Se describe un proceso para la preparación de un cicatrizante de heridas o tejido o una composición de células en donde el extracto de células es un extracto autólogo de queratinocitos.

Se describe un proceso para la preparación de un cicatrizante de heridas o tejido o una composición de células en donde el extracto de células es un extracto de células de músculo esquelético tales como células progenitoras de músculo o células madre satélite.

Se describe un proceso para la preparación de un cicatrizante de heridas o tejido o una composición de células en donde el extracto de células es un extracto de fibroblastos.

Se describe un proceso para la preparación de una composición de células o cicatrizante de heridas o tejidos en donde el extracto de células es un extracto de adipocitos.

Se describe un proceso para la preparación de un cicatrizante de heridas o tejido o una composición de células en donde el extracto de células es un extracto de condrocitos.

Se describe un proceso para la preparación de un cicatrizante de heridas o tejido o una composición de células en donde el extracto de células es un extracto de células madre tales como células madre del cordón umbilical.

Se describe un proceso para la preparación de un cicatrizante de heridas o tejido o una composición de células en donde el extracto de células es un extracto de células tendinosas.

Se describe un proceso para la preparación de un cicatrizante de heridas o tejidos o una composición de células en

donde el extracto de células es un extracto de membrana perióstica o células gingivales.

Se describe un proceso para la preparación de un cicatrizante de heridas o tejido o una composición de células en donde el extracto de células es un extracto de células corneales.

5 Se describe un proceso para la preparación de un cicatrizante de heridas o tejido o una composición de células en donde el extracto de células es un extracto de células de médula ósea.

Se describe un proceso para la preparación de un cicatrizante de heridas o tejido o una composición de células en donde el extracto de células es un extracto de células osteoblásticas.

Se describe un proceso para la preparación de un cicatrizante de heridas o tejido o una composición de células en donde el extracto de células es un extracto de células de Schwann.

10 Se describe un proceso para la preparación de un cicatrizante de heridas o tejido o una composición de células en donde el extracto de células es un extracto de células de los islotes pancreáticos.

En otra realización adicional, la composición de concentrado de plaquetas aislado, la composición cicatrizante de heridas o tejidos, el suero enriquecido en trombina y/o el extracto de células de la invención son autólogos.

15 Se describe un kit adaptado para la regeneración de tejidos de acuerdo con la invención en donde el kit comprende además viales separados que contienen ETOH y CaCl_2 , portajeringas, aglutinadores y un aplicador de puntas con doble salida.

Se describe un kit adaptado para la regeneración de tejidos de acuerdo con la invención que comprende dos blísteres estériles:

20 (1) un blíster que comprende accesorios para la flebotomía, tubos separadores de la invención, viales de ETOH y CaCl_2 para la preparación de un suero autólogo de trombina; y

(2) un segundo blíster compuesto por accesorios para dos portajeringas y aglutinador, y aplicador de puntas con doble salida.

Se describe un proceso para la preparación de una composición de células de acuerdo con la invención en donde el extracto de células proporcionado en la etapa d) o e) se obtiene mediante un proceso que comprende las etapas de:

25 (A) Proporcionar dichas células en un concentrado de plaquetas de acuerdo con la invención;

(B) Opcionalmente cultivar las células;

(C) Resuspender las células cultivadas obtenidas en la etapa (B) en un concentrado de plaquetas de acuerdo con la invención.

30 Se describe un proceso para la preparación de una composición de células de acuerdo con la invención en donde la expansión celular en la etapa (A) se realiza en un concentrado de plaquetas de acuerdo con la invención, tal que la concentración final en plaquetas está comprendida entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 40 % del volumen del medio de cultivo.

35 Se describe un proceso para la preparación de una composición de células de acuerdo con la invención en donde la etapa de cultivo celular (B) comprende al menos una etapa de sembrar las células, por ejemplo, en una superficie de cultivo celular tal como una placa de Petri o un matraz de cultivo.

Se describe un proceso para la preparación de una composición de células de acuerdo con la invención que comprende al menos una etapa adicional de recogida de células después de la etapa de cultivo celular (B).

Se describe un proceso para la preparación de una composición de células de acuerdo con la invención en donde la etapa de cultivo celular (B) se realiza a 37 °C.

40 Se describe un proceso para la preparación de una composición de células de acuerdo con la invención en donde la etapa de cultivo celular (B) se realiza bajo un flujo de gas que comprende oxígeno o aire y dióxido de carbono, típicamente el flujo de gas comprende el 95 % de oxígeno o aire y el 5 % de dióxido de carbono.

Se describe un proceso para la preparación de una composición de células de acuerdo con la invención en donde la etapa de cultivo celular (B) dura de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 semanas.

45 Se describe un proceso para la preparación de una composición de células de acuerdo con la invención en donde durante la etapa de cultivo celular (B), el medio de cultivo celular se cambia regularmente durante la incubación, típicamente cada aproximadamente 3 días.

Se describe un proceso para la preparación de una composición de células de acuerdo con la invención en donde la

etapa de cultivo celular (B) comprende al menos una etapa de exposición de las células a la luz visible, típicamente a aproximadamente 633 nm, durante aproximadamente 10 minutos. En otro aspecto, la etapa de exposición a la luz visible se repite una vez a la semana durante la incubación celular.

5 Se describe un proceso para la preparación de una composición de células de acuerdo con la invención en donde la composición de células es una composición de células de queratinocitos o fibroblastos y la etapa de cultivo celular (B) comprende al menos una etapa de exposición de las células a la luz visible, típicamente a aproximadamente 633 nm, durante aproximadamente 10 minutos. En otro aspecto, la etapa de exposición a la luz visible se repite una vez a la semana durante la incubación celular.

10 Se describe un proceso para la preparación de una composición de células de acuerdo con la invención en donde la etapa de cultivo celular (B), comprende al menos una etapa de adición de concentrado de plaquetas diluido de acuerdo con la invención tal que la concentración final en plaquetas está comprendida entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 40 % del volumen del medio de cultivo.

15 Se describe un proceso para la preparación de una composición de células de acuerdo con la invención en donde la composición de células es una composición de células de queratinocitos o fibroblastos y la etapa de cultivo celular (B) comprende al menos una etapa de adición de concentrado de plaquetas diluido de acuerdo con la invención tal que la concentración final en plaquetas está comprendida entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 40 % del volumen del medio de cultivo.

Se describe una composición de células aisladas obtenible a partir de un proceso de acuerdo con la invención.

20 Se describe una composición de células aisladas, en donde la composición de células aisladas es una composición de células grasas tal como una composición de células de adipocitos.

Se describe una composición de células aisladas, en donde la composición de células aisladas es una composición de células musculares, tal como una célula de mioblastos o una composición de células madre satélite.

Se describe una composición de células aisladas, en donde la composición de células aisladas es una composición de células corneales.

25 Se describe una composición de células aisladas, en donde la composición de células aisladas es una composición de células de cartilago, tal como una composición de células de condrocitos.

Se describe una composición de células aisladas, en donde la composición de células aisladas es una composición de células de la piel, tal como una composición de células de fibroblasto o de queratinocitos.

30 En otra realización, la presente invención describe que la composición de células aisladas es una membrana perióstica o una composición de células gingivales.

Se describe una composición de células aisladas, en donde la composición de células aisladas es una composición de células de tendones, tal como la composición de células de tendones.

Se describe una composición de células aisladas, en donde la composición de células aisladas es una composición de células madre, tal como una composición de células madre de cordón umbilical.

35 Se describe una composición de células aisladas, en donde la composición de células aisladas es una composición de células de médula ósea.

Se describe una composición de células aisladas, en donde la composición de células aisladas es una composición de células de Schwann.

40 Se describe una composición de células aisladas, en donde la composición de células aisladas es una composición de células de islotes pancreáticos.

Se describe una composición de células aisladas, en donde la composición de células aisladas es una composición de células de osteoblastos.

45 En otra realización, la presente invención proporciona una composición de células aisladas, en donde las células están a una concentración de aproximadamente 3×10^5 a aproximadamente 10^6 células/ml de plasma o plasma enriquecido.

Se proporcionan composiciones, métodos y usos para promover el sellado de heridas y/o la regeneración de tejidos y/o huesos en una herida de un ser humano o un animal inferior como se describe en el presente documento.

Se proporcionan composiciones, métodos y usos para promover el sellado de heridas y/o la regeneración de tejidos y/o huesos en una herida de un mamífero, preferentemente un ser humano.

En otra realización, la presente invención proporciona composiciones, métodos y usos para inducir la regeneración periodontal en una herida o un defecto periodontal de un mamífero con enfermedad periodontal u otra afección como se describe en el presente documento.

5 En otra realización adicional, la presente invención proporciona un método para inducir la regeneración periodontal en una herida o un defecto o cavidad periodontal de un mamífero con enfermedad periodontal u otra afección en donde el mamífero es un ser humano.

10 En otra realización adicional, la presente invención proporciona un método para inducir la regeneración periodontal en una herida o un defecto o cavidad periodontal de acuerdo con la invención, en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición cicatrizante de heridas o tejidos se aplica en forma de gel semisólido o una matriz de crecimiento en dicha herida o dicho defecto o cavidad periodontal como se describe, por ejemplo, en Garg y col., 2000, Dental Implantology Update, 11(6), 41-44.

En otra realización, la presente invención proporciona un método para promover la regeneración del tejido cutáneo en una cicatriz o arruga como se describe en el presente documento.

15 En otra realización, la presente invención proporciona un método para inducir la regeneración del miocardio de acuerdo con la invención, en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición de células musculares de acuerdo con la invención se inyecta en el miocardio, típicamente en el miocardio del ventrículo izquierdo. La inyección se puede realizar como inyección directa o inyección con múltiples catéteres.

20 Se pueden diseñar mioblastos o células satélite *ex vivo* como se describe en la presente descripción sobre una construcción de amnios y biocompuestos biológicos humanos desepitelizados e irradiados con UV, como una monocapa en la presente descripción. A continuación, el amnios se sutura al epicardio isquémico para repoblar el tejido subyacente con células madre, con el fin de mejorar el poder contráctil de la pared ventricular y los miocitos.

25 En otra realización, la presente invención proporciona un método para inducir la regeneración miocárdica de acuerdo con la invención, en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición de células musculares de acuerdo con la invención se inyecta en el miocardio, junto con una cantidad terapéuticamente eficaz de composición de células de fibroblastos de acuerdo con la invención, tal que la relación fibroblasto/mioblasto, es de aproximadamente 30:70.

30 Se proporciona un método para inducir la regeneración del miocardio de acuerdo con la invención, en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición de células musculares de acuerdo con la invención se aplica sobre la superficie ventricular en forma de un parche de amnios previamente incubado en un mioblasto y una composición de células madre satélite de acuerdo con la invención.

Se proporciona un método para inducir la regeneración corneal de acuerdo con la invención, en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición de células corneales se aplica al tejido corneal en forma de un parche de amnios preferentemente extendido sobre una lente de contacto soluble.

35 Dicho método de tratamiento de una herida, un tejido o una enfermedad puede incluir el uso de cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento; también puede incluir el uso de cualquier composición preparada mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

40 Los métodos, los dispositivos y el kit presentan las ventajas de proporcionar una forma rápida y relativamente económica de obtener concentrados de plaquetas en una sola operación que es fácil de implementar y se adapta a una aplicación en el punto de atención. Los métodos presentan la ventaja de no solo conducir a preparaciones enriquecidas en las que las plaquetas se concentran con un rendimiento tan alto que no se obtiene mediante métodos conocidos, sino también en donde el contenido en eritrocitos es mucho menor que los obtenidos mediante métodos conocidos para la preparación de PRP. Las composiciones presentan la ventaja de tener mayor contenido en plaquetas, menor contenido en eritrocitos que el PRP obtenido por métodos conocidos y propiedades completamente mantenidas para su posterior uso terapéutico *in vivo*. Más específicamente, se mantiene la capacidad de las plaquetas para liberar los principales factores de crecimiento implicados en la regeneración tisular (PDGF, TGF- β , IGF, VEGF y EGF) a niveles durante varios días (o la vida útil de los trombocitos de 7 a 10 días).

Además, en la medida en que las composiciones se preparen a partir de sangre autóloga, la invención descrita en el presente documento reduce la transmisión de enfermedades y los riesgos de inmunorreacción asociados con el uso de materiales de tratamiento elaborados a partir de materiales biológicos obtenidos de uno o más terceros.

50 Se proporciona un material biológico mejorado para la cicatrización de heridas y la regeneración de tejidos, preferentemente autólogo, que promueve la regeneración de tejidos tales como piel, cartílago y huesos, especialmente cicatrización y/o rejuvenecimiento. Los beneficios de la invención comprenden un método simple y rápido de preparación de materiales mejorados para la cicatrización de heridas y regeneración de tejidos adaptados a los servicios en el punto de atención y que demostraron disminuir el tiempo de cicatrización, el dolor asociado y los costes médicos. Además, el material de cicatrización de heridas y regeneración de tejidos reduce los riesgos de rechazo del injerto y mejora las tasas de éxito del injerto. Además, los materiales mejorados para la cicatrización de

heridas y la regeneración de tejidos conducen a cicatrices que tienen un aspecto final estético mucho mejor y al relleno duradero de cicatrices y arrugas.

Típicamente, los extractos de células se obtienen de una biopsia de tejido en donde la biopsia se realiza preferentemente el día anterior a la mezcla con el concentrado de plaquetas en la etapa a). El tamaño de las biopsias se adapta al propósito terapéutico pretendido y los tipos de células usadas en la preparación de la composición de células de acuerdo con la invención. En los ejemplos a continuación se dan ejemplos de biopsias para diferentes tipos de tejidos.

A continuación, se describirán ejemplos que ilustran la invención de una manera más detallada y con referencia a las realizaciones representadas en las figuras.

EJEMPLOS

Las siguientes abreviaturas se refieren respectivamente a las siguientes definiciones:

ATS (suero autólogo de trombina); **BU (unidad de baxotrobina)**; **DMEM** (medio esencial mínimo de Dulbecco); **DMSO** (Dimetilsulfóxido); **CE** (coágulo enriquecido); **FCS** (suero fetal de ternera); **HT** (tiempo de cicatrización); **UI (Unidad Internacional)**; **PBS** (solución salina tamponada con fosfato); **PET** (tereftalato de polietileno); **PRP (plasma rico en plaquetas)**; **PPP (plasma pobre en plaquetas)**; **USP** (farmacopea de los Estados Unidos); **cm** (centímetro); **dl** (decilitro); **g** (gramo); **Gy** (Gray); **J** (Julio); **l** (litro); **min** (minuto); **mm** (milímetro); **M** (molar); **ml** (mililitro); **nm** (nanómetro); **rpm** (rotación por minuto); **Vol.** (volumen).

PROCEDIMIENTOS Y CONDICIONES GENERALES

Para determinar la eficacia de las composiciones de la invención para promover la cicatrización de heridas y/o la regeneración de huesos y/o tejidos, se realizan los siguientes experimentos.

Las muestras de sangre humana completa se recogen en un tubo separador de acuerdo con la invención. Un tubo separador de acuerdo con la invención es, por ejemplo, un tubo de vidrio de aproximadamente 15 ml (16 mm de diámetro y 130 mm de longitud) que contiene 3 ml de gel tixotrópico a base de poliéster, así como 1 ml de solución de citrato de sodio a 0,1 M y que contiene un vacío utilizable de o aproximadamente de 8,5 ml. Este tubo separador constituye un dispositivo listo para usar para la preparación de una composición de concentrado de plaquetas de la invención (también llamada RegenTHT™ (tubo de recogida de trombocitos) de Regen Lab, Suiza).

Otro ejemplo de tubo separador de acuerdo con la invención es un tubo de aproximadamente 10 ml en PET (tereftalato de polietileno) que contiene 1 ml de un gel tixotrópico que comprende una mezcla polimérica y citrato de sodio anhidro depositado en la superficie interna del tubo por pulverización (aproximadamente 3,5 mg por ml de sangre) y que contiene un vacío utilizable de o aproximadamente de 8 ml, constituye un dispositivo listo para usar para la preparación de un concentrado de plaquetas de acuerdo con la invención (también llamado RegenBCT™ (Terapia de células sanguíneas) de Regen Lab., Suiza).

Estos tubos se esterilizan por irradiación (tal como prescribe la norma ISO 11137, UNI EN ISO 11737-2, UNI EN 552, UNI EN 556) y se sellan herméticamente con un tapón tradicional tal como el tapón de caucho convencional de bromobutilo moteado para el tubo de vidrio y un tapón de clorobutilo teniendo una cubierta de polietileno para la seguridad del operador.

A continuación, el tubo separador se centrifuga a de o aproximadamente de 1500 g hasta o aproximadamente hasta 2000 g durante aproximadamente de 3 a 10 min, es decir, de o aproximadamente de 2500 rpm hasta o aproximadamente hasta 3800 rpm con una centrifuga con un rotor oscilante, con un radio de 20 cm. En el caso de una centrifuga que tenga un rotor con un ángulo fijo de aproximadamente 45 °, el tiempo de centrifugación debe durar al menos aproximadamente 15 min.

Después de la centrifugación, el concentrado de plaquetas se recoge para su uso en aplicaciones terapéuticas o cosméticas o para la preparación de otras composiciones que contienen el concentrado de plaquetas obtenido a través de la mezcla con otros agentes tales como extractos de células, preferentemente autólogos (por ejemplo, queratinocitos, fibroblastos, células de médula ósea, osteoblastos, condrocitos, mioblastos, células corneales, células de Schwann, células grasas, células madre del cordón umbilical, células tendinosas, células de los islotes pancreáticos, células ligamentosas y gingivales, células de la membrana perióstica) y/o sustitutos óseos y/o activadores de la coagulación.

Para las aplicaciones terapéuticas, se usa un kit adaptado para la regeneración de tejidos en donde el kit (también llamado RegettKit™) comprende dos blísteres estériles, que comprenden:

- un blíster (RegenPRP™) que comprende accesorios para la flebotomía, tubos separadores de la invención (RegenTHT™ o RegenBCT™), opcionalmente viales de ETOH y CaCl₂ para la preparación de un suero autólogo de trombina (RegenATS™).

- un blíster (RegenApplicator™) que consta de dos jeringas (por ejemplo, 1 ml y 1 o 3 ml), soportes y pinza y un aplicador de punta con doble salida.

Para la preparación de composiciones de células, las células se preparan de acuerdo con el protocolo general de la siguiente manera:

5 a) Biopsia

Se obtiene una biopsia del tejido correspondiente en condiciones estériles usando métodos estándar adaptados a la célula específica que se recogerá. Las células se usan extemporáneamente, u opcionalmente después del cultivo *ex vivo* y la proliferación celular como sigue.

b) Cultivo y proliferación celular *ex vivo*

10 Células usadas para la preparación de composiciones de células, tales como queratinocitos, células de médula ósea, fibroblastos; células del periostio o de la córnea, tales como células madre del limbo corneal; melanocitos y células de Langerhans; células grasas; células musculares tales como mioblastos y células satélite; osteoblastos; condrocitos; células del cordón umbilical; células de Schwann, las células tendinosas o pancreáticas se expanden en un medio portador de células (por ejemplo DMEM o Ham's) en placas (por ejemplo placas de Petri o frasco de cultivo) recubiertas con un concentrado de plaquetas, preferentemente autólogo, enriquecido con fibronectina. Los medios de cultivo pueden enriquecerse preferentemente con DMEM, por ejemplo, en el caso de queratinocitos. Para células tales como osteoblastos óseos, condrocitos y mioblastos, es necesaria la digestión enzimática del tejido correspondiente en presencia, por ejemplo, de colagenasa o tripsina antes de la siembra en placa. La incubación en las placas se realiza a 37 °C bajo un flujo de gas del 95 % de oxígeno o aire y el 5 % de dióxido de carbono.

20 Típicamente, el tiempo de incubación varía de 10 a 20 min. La expansión celular puede incrementarse (como por ejemplo en el caso de células de mioblastos, fibroblastos y condrocitos) mediante fototerapia (por ejemplo, exposición a la luz a 633 nm de aproximadamente 10 min a 2J/cm², una vez a la semana durante la fase de incubación).

25 Los explantes se pueden cultivar en placas de Petri o en matraces de cultivo usando la técnica de elevación con aire (Molnar y col., 1996, Tissue & Cell, 28: 547-556) y el método de interfaz de aire (Melter y col., 2002, Br. J. Oft., 86, 463-471) con la mitad del explante expuesto al aire. El medio de cultivo se cambia regularmente durante la incubación, por ejemplo, cada 3 días. La expansión de las células en un modo en 2D como monocapas planas, se obtiene, por ejemplo, para células de mioblastos, fibroblastos y condrocitos. Se puede obtener un patrón de crecimiento celular en 3D, por ejemplo, para células de córnea, mioblastos, fibroblastos, condrocitos, adipocitos y queratinocitos, añadiendo una composición de concentrado de plaquetas autólogo diluido de acuerdo con la invención en aproximadamente el 5 a aproximadamente el 40 % del volumen de plasma o plasma enriquecido al medio cultural. Típicamente, la adición de la composición de concentrado de plaquetas autólogo diluido de acuerdo con la invención se realiza 2 o tres veces durante el tiempo de incubación. El armazón biológico en 3D obtenido a continuación permite mejorar la matriz extracelular que es útil para la transferencia de células madre autólogas.

35 Después de la incubación, las células se liberan a continuación de las placas con una digestión suave con tripsina que las separa y permite que se sedimenten.

c) Control de seguridad y calidad celular

40 La viabilidad celular en la preparación de células así obtenida se verifica mediante recuento de células microscópicas, recuento de células con citómetro de flujo junto con inmunoquímica sobre marcadores de tejido mediante técnicas estándar. La viabilidad celular también se prueba a través del azul tripán justo después de la liberación celular por la tripsina. La seguridad de la preparación también se verifica mediante un control de la contaminación mediante un ensayo microbiológico para excluir la contaminación con virus o bacterias y evitar la transmisión de infecciones zoonóticas. Se evita el uso de FCS evitando así la transmisión de la enfermedad de las vacas locas.

45 d) Administración de la preparación de células

La preparación de células obtenida anteriormente se coloca en una composición de concentrado de plaquetas autólogo como vehículo portador de células para su transporte antes de la administración al paciente. A continuación, la preparación de células obtenida anteriormente se inyecta o se trasplanta al paciente. El modo de inyección o trasplante debe adaptarse al tipo de células contenidas en la preparación de células y al efecto terapéutico o estético deseado. En los ejemplos a continuación se dan más detalles sobre el método para la preparación y el uso de las composiciones de células más específicamente, dependiendo del tipo de células y del efecto terapéutico o estético deseado.

55 Las preparaciones de células de queratinocitos o de células de fibroblastos se pueden usar fácilmente después de la recogida o después del cultivo celular como se describió anteriormente. Sin embargo, las preparaciones de células se preparan preferentemente después del cultivo celular como se describió anteriormente.

Las preparaciones de células presentan una mejor viabilidad y estabilidad (incluida la integridad de las propiedades celulares conservadas, tales como la capacidad de sintetizar proteínas y administrar factores de crecimiento) que las células preparadas en un medio sin una composición de concentrado de plaquetas autólogo de acuerdo con la invención. Además, la proliferación celular así obtenida está mejorada: las células crecen más rápido (aproximadamente de 3 a 5 días más rápido) y son más densas en comparación con los medios de control y los medios privados de suero. La ventaja del proceso para la preparación de una composición de células es que se usa el mismo medio autólogo como vector para cultivo celular, preservación celular, inyección celular, vector para bioestimulación celular y regeneración tisular.

Ejemplo 1: preparación de un concentrado de plaquetas autólogo

Los tubos separadores de la invención se prueban previamente para la buena tolerabilidad, no toxicidad y no mutagenicidad del gel tixotrópico de acuerdo con las normas ISO 10993-11, ISO 10993-10, ISO 10993-12 e ISO 10993-3.

Se recogen de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 10 ml de muestra de sangre humana dentro del tubo separador de la invención, donde la sangre se aspira mediante vacío. A continuación, la mezcla se centrifuga a aproximadamente 3800 rpm durante aproximadamente 3,5 min. A continuación, se recoge el plasma rico en plaquetas.

El análisis del concentrado de plaquetas obtenido ha demostrado que contiene de 2 a 4 veces los niveles normales de plaquetas y factores de crecimiento, en comparación con un coágulo sanguíneo natural, manteniendo niveles normales de fibrina y fibrinógeno y prácticamente sin glóbulos ($<1\%$ hematocrito, comparado con un 35-50 % en un coágulo sanguíneo normal y un 15-20 % en plasma rico en plaquetas obtenido a partir de métodos de preparación conocidos). El estudio muestra también la presencia de fibronección de glucoproteína leucocitaria y esto demuestra que se conservan las propiedades coagulantes.

La composición del concentrado de plaquetas (también llamado RegenPRP™ de Regen Lab, Suiza) en comparación con la sangre completa, el plasma completo y el plasma pobre en plaquetas se presenta en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1

Muestra	Glóbulos blancos ($\times 10^9/l$)	Glóbulos rojos ($\times 10^{12}/l$)	Hemoglobina (g/dl)	Plaquetas ($\times 10^9/l$)
Sangre completa	6,6	4,43	13,5	269
Plasma completo	2,8	0,04	0,4	305
Plasma rico en plaquetas	14,2	0,57	2,1	570
Plasma pobre en plaquetas	0	0	0,1	116

Se repitió el experimento en varios pacientes y se observó que los concentrados de plaquetas obtenidos presentan concentraciones reproducibles para plaquetas (al menos 300×10^9 células/l), glóbulos blancos (al menos $7,0 \times 10^9$ células/l), fibrinógeno (al menos 3 mg/l) y eritrocitos (menos de $0,6 \times 10^{12}$ células/l).

El rendimiento de plaquetas obtenido por dicho método se ha medido (90-99 %) y muestra un aumento drástico en comparación con el rendimiento de plaquetas (30-62 %) obtenido de los métodos de preparación conocidos descritos en Marx y col., 2004, anteriormente. Además, se ha demostrado mediante kits de ELISA (R&D Systems, Inc.) y la respuesta a la activación de la coagulación del concentrado de plaquetas de la invención, que se conserva la actividad de los factores de coagulación: la concentración de D-dímeros (productos de degradación de fibrina), marcadores conocidos de activación de la coagulación y el proceso de lisis son estables y, por tanto, las propiedades de coagulación del concentrado de plaquetas no se ven debilitadas por el proceso de la invención.

Los niveles de factores de crecimiento (PDGF, EGF, TGF- β y VEGF) del concentrado de plaquetas de la invención son demostrablemente estables durante un período de al menos 72 horas (4 días) cuando se almacenan a temperatura ambiente en el tubo separador estéril de la invención. La evolución de los factores de crecimiento PDGF BB, EGF y VEGF durante 72 horas se presenta en la figura 1.

Las propiedades del concentrado de plaquetas de acuerdo con la invención permiten plantear la preparación del concentrado de plaquetas obtenido mediante el procedimiento de la invención, de uno a varios días antes de una cirugía reparadora, con el fin de reducir la carga de trabajo en el quirófano y acelerar el procedimiento quirúrgico.

Para su uso terapéutico posterior, el concentrado de plaquetas autólogo generalmente se mezcla con un activador de coagulación convencional tal como un activador de trombina (por ejemplo, cloruro de calcio, por ejemplo, al 10 %), opcionalmente mezclado con un activador de fibrinógeno tal como trombina, preferentemente homólogo (por ejemplo, 10 UI a 100 UI por ml de plasma), batroxobina (por ejemplo, 20 UB por ml de plasma) o una preparación enriquecida en trombina.

Ejemplo 2: uso terapéutico del concentrado de plaquetas autólogo de la invención

a) Pacientes:

Se seleccionan tres pacientes que presentan heridas crónicas que no cicatrizan:

- Un paciente de 88 años (paciente 1) que padecía angiosarcoma de Kaposi de múltiples localizaciones en miembros inferiores y necrosis radioinducida en la pierna izquierda. La necrosis radioinducida fue el resultado del tratamiento con radioterapia. A los 12 meses de finalizado el tratamiento con rayos X de bajo voltaje, la necrosis consistía en una úlcera profunda superinfectada rodeada de una costra (35x25 mm). La herida había sido previamente tratada sin éxito con diversos tratamientos, tales como esteroides y cremas cicatrizantes.

- Un paciente de 81 años (paciente 2) que padecía un carcinoma espinocelular de vértice presentaba una ulceración cutánea (de unos 10 mm de diámetro) con disqueratosis periférica sin ningún signo de infección resultante de una biopsia-resección y una radioterapia posquirúrgica (dosis total de 52 Gy),

- Un paciente de 60 años (paciente 3) que había recibido una irradiación prequirúrgica (7 Gy) por sinostosis de tibia y peroné en la pierna derecha presentaba una necrosis radioinducida consistente en una úlcera profunda (50x30 mm de diámetro) sin inflamación.

b) Tratamiento:

Se toman 8,5 ml de muestra de sangre de cada paciente y se centrifugan en un tubo separador como se describe en el ejemplo 1, de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 2. Los concentrados de plaquetas resultantes se mezclan después con cloruro de calcio al 10 % en volumen. A continuación, se aplica cada composición de concentrado de plaquetas autólogo en el lugar de la herida por radioepidermitis del paciente correspondiente. A continuación, la herida se cubre y protege con compresas húmedas (día 1).

Entre los días 3 y 5, se comprueba el estado de la herida y se cambia el apósito. En el día 7 ± 1 , se realiza una nueva aplicación de una nueva preparación de concentrado de plaquetas autólogo de la invención. Si es necesario, se sigue la misma secuencia de tratamiento con los mismos intervalos de tiempo hasta la cicatrización completa de la herida.

c) Efectos cicatrizantes:

Paciente 1: cicatrización lenta y regular de la úlcera. Cicatrización completa a los 189 días.

Paciente 2: cicatrización muy rápida obtenida en 21 días.

Paciente 3: cicatrización progresiva y regular. Cicatrización completa a los 41 días.

Estos resultados muestran el efecto beneficioso de la composición de concentrado de plaquetas en la cicatrización de úlceras radioinducidas crónicas, incluso en el caso de aquellas que fueron resistentes a tratamientos tópicos previos y en ausencia de reacción alérgica.

Ejemplo 3: uso terapéutico del concentrado de plaquetas autólogo de la invención en combinación con un suero enriquecido con trombina autólogo

Para activar la coagulación, una alternativa a la mezcla de plaquetas con un activador de trombina antes del uso en un paciente, como se describe en el ejemplo 1, es la combinación del concentrado de plaquetas de la invención con un activador de fibrinógeno tal como una composición enriquecida con trombina y preferentemente con un suero de trombina (por ejemplo, autólogo) de acuerdo con la invención.

a) Preparación de un suero autólogo de trombina (ATS)

Un suero autólogo de trombina que se usará como preparación enriquecida con trombina se prepara mediante un proceso que comprende la adición a una muestra de sangre completa del paciente (por ejemplo, 8 ml) recogida en un tubo separador de la invención como se describe en el ejemplo 1, un 95 % en volumen de solución de etanol (por ejemplo, 1 ml) y cloruro de calcio al 10 % (por ejemplo, 1 ml). A continuación, se deja que la mezcla (también denominada RegenATS™ de Regen Lab, Suiza) precipite durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente.

Después de 30 min, se precipita casi el 80 % de la antitrombina (entre otras proteínas como el fibrinógeno); a

continuación, el tubo se centrifuga a aproximadamente 1500 g durante aproximadamente de 8 a 10 min y el suero autólogo de trombina está listo para usar en combinación con el concentrado rico en plaquetas de la invención.

b) Preparaciones combinadas

- 5 Una de las originalidades de este proceso es que, después de la etapa inicial de incubación del proceso de preparación de suero autólogo de trombina (por ejemplo, al menos aproximadamente 30 min), los tubos separadores de la invención que contienen, respectivamente, la preparación de suero autólogo de trombina y la preparación de concentrado de plaquetas pueden centrifugar simultáneamente para que las dos preparaciones de extractos de sangre estén listas para su uso al mismo tiempo.

c) Uso combinado

- 10 Para permitir que la polimerización del fibrinógeno en una malla de fibrina (que ocurre durante el proceso de coagulación) ocurra solo en el momento de la aplicación de la preparación rica en plaquetas sobre la herida, se aplica la composición de concentrado de plaquetas y suero autólogo de trombina (activador de coagulación) simultáneamente a una relación en volumen de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 10:3 (relación de concentrado respecto a activador de la coagulación) a la herida.
- 15 La administración simultánea de ambas preparaciones se logra, por ejemplo, mediante un dispositivo que comprende dos jeringas (por ejemplo, una jeringa de 10 ml para la composición de concentrado de plaquetas y una jeringa de 1 ml o 3 ml para el suero de trombina), que libera las preparaciones simultáneamente para que se mezclen y polimericen al entrar en contacto con la herida.

Ejemplo 4: uso terapéutico del concentrado de plaquetas autólogo de la invención en combinación con extracto de células cutáneas

Se incluyeron en el estudio un total de 35 pacientes que habían recibido un injerto de piel (que representa menos del 15 % de la superficie de la piel). Se excluyeron pacientes tratados con inmunosupresores o corticoides o con insuficiencia renal o arteropatía periférica grave.

Todas las siguientes manipulaciones se realizan bajo estrictas reglas de asepsia y esterilidad.

25 Grupo A: 13 pacientes

a) Preparación de concentrado de plaquetas

- Se recoge una muestra de 8,5 ml de sangre completa de cada paciente (de un miembro superior donde no hay perfusión) en un tubo separador de acuerdo con la invención. El tubo separador con la sangre completa se centrifuga inmediatamente durante unos 8 min a 2800 rpm. Antes de recoger el plasma enriquecido (PRP), el operador descarta la mitad o 2 ml del sobrenadante y luego resuspende las plaquetas en el plasma restante. El concentrado rico en plaquetas se transfiere a continuación a un tubo estéril mantenido a una temperatura de 37 °C.

b) Recubrimiento de heridas

- El concentrado de plaquetas autólogo (también llamado RegenPRP™) se mezcla con una solución de cloruro de calcio al 10 % en una relación de 10:1 y el sitio donante del injerto (donde se extrajo la piel) de cada paciente correspondiente se recubre con la mezcla correspondiente autóloga en orden para obtener la coagulación del concentrado de plaquetas sobre la herida.

Grupo B: 8 pacientes

a) Toma de muestras de células cutáneas del paciente

- 40 Los queratinocitos se extraen de cada uno de los pacientes de este grupo. Una muestra fina de piel sana (unos 2 cm²) se extrae de cada paciente y se lava tres veces en una solución de PBS. A continuación, la biopsia lavada se deposita en una placa de Petri que contiene tripsina y se corta en fragmentos muy pequeños (0,5 cmx0,5cm) con un bisturí. A continuación, los fragmentos de piel se incuban durante 45 min a 37 °C en un dispositivo de agitación en un 20 % del volumen de composición de concentrado de plaquetas autólogo, también llamado RegenPRP™ obtenido anteriormente. A continuación, se recoge el sobrenadante, se centrifuga y las células se resuspenden en una solución de PBS. El recuento de queratinocitos se determina al microscopio. Finalmente, los queratinocitos obtenidos se resuspendieron en el concentrado de plaquetas autólogo de acuerdo con la invención (5-40 % en volumen) del paciente correspondiente.

b) Preparación de concentrado de plaquetas

El procedimiento es el mismo que para el grupo A.

50 c) Recubrimiento de heridas

La suspensión de queratinocitos (también llamada RegenExtracell™) se aplica tan pronto como esté lista (no excediendo toda la preparación un día) sobre la herida de la misma forma que se describe en el caso del grupo A.

Grupo de control: 14 pacientes

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

5 Aleatorización y tratamiento

En el bloque quirúrgico, después de la retirada de piel del injerto, se recubre el sitio donante con una compresa temporal empapada con una solución de adrenalina (1 ampolla de 1 mg/ml de adrenalina diluida en 500 ml de NaCl al 0,9 %) y dependiendo de la tabla de aleatorización, el sitio donante se trata de acuerdo con los tres métodos siguientes:

10 Grupos 1 y 2: recubrimiento de la herida con la respectiva composición cicatrizante y recubrimiento de la herida con una compresa no terapéutica (Jelonet®).

Grupo 3: cobertura directa de la herida con una compresa no terapéutica (Jelonet®). A continuación, las compresas se cubren con bandas Kerlix® y bandas elásticas tales como "Velpeau".

Criterios de eficacia del tratamiento

15 La eficacia del tratamiento se evalúa de acuerdo con 3 criterios:

- El tiempo necesario para la cicatrización completa del sitio tratado (tiempo de cicatrización o HT en días)
- La epitelización (evolución del progreso de cicatrización) medida el día 5 después del tratamiento de acuerdo con 7 grados:

0: Ausente

20 1: Ligera

2: Moderada

3: Importante

4-7: Muy importante, grados de importancia crecientes;

25 - El dolor evaluado el día 5 después del tratamiento por el propio paciente, generalmente en el momento del cambio de compresa, en una escala de 0 a 10 (0: sin dolor y 10: dolor extremo).

La compresa se abre el día 5 postcirugía para permitir la evaluación de la calidad del tratamiento y se cubre con nuevas compresas Jelonet® cubiertas con compresas secas.

A continuación, se cambia la compresa cada dos días hasta la cicatrización completa. Los efectos secundarios o complicaciones médicas se vigilan durante todo el proceso de cicatrización.

30 Resultados

Los resultados de los tratamientos para cada grupo de pacientes (grupo de control: C, grupo A: RegenPRP™, grupo B: RegenExtracell™) se presentan en la figura 2 en términos de tiempo de cicatrización en días (HT), dolor en el día 5 (P) y epitelización el día 5 (E). La línea de puntos indica cuándo se cambia el primer vendaje el día 5.

35 El proceso de cicatrización está claramente estimulado por el uso del concentrado de plaquetas en comparación con el grupo de control. La calidad de la cicatrización también es mejor en el caso del uso de concentrado de plaquetas. Además, el dolor en el sitio donante se reduce drásticamente en el caso en el que se usó el concentrado de plaquetas de la invención en comparación con el grupo de control.

Todos los efectos beneficiosos del concentrado de plaquetas, se incrementan cuando se usa una mezcla de queratinocitos suspendidos en el concentrado de plaquetas de la invención.

40 El tiempo medio de cicatrización es de 7 días para el grupo tratado con un concentrado de plaquetas y de 5 días cuando los queratinocitos se suspenden en el concentrado de plaquetas en comparación con un promedio de 12 días en el grupo de control.

La tolerabilidad fue excelente y no se detectaron efectos secundarios o alergias.

45 Esto demuestra que el concentrado de plaquetas solo o combinado con queratinocitos es muy eficaz para acelerar el proceso de cicatrización de la herida y no solo disminuye el dolor, sino también la reacción inflamatoria y mejora el

aspecto final de la cicatriz.

Como alternativa, usando el mismo proceso de disociación, las células de la piel pueden colocarse en una placa de Petri recubierta con la composición de concentrado de plaquetas autólogo de acuerdo con la invención, también llamado RegenPRP™, obtenida anteriormente y cultivada durante 2 a 5 días. A continuación, antes del injerto, la preparación de células cutáneas obtenida se puede rociar sobre la herida, con el fin de preparar el sitio para una mejor biointegración de las células implantadas y una mejor expansión in vivo.

Ejemplo 5: uso cosmético del concentrado de plaquetas autólogo de la invención

Se prepara una composición de concentrado de plaquetas autólogo como se describe en el ejemplo 1. 5 ml de esta composición de concentrado de plaquetas (también llamada RegenACR™: (Rejuvenecimiento de células autólogas) de RegenLab, Suiza) se inyecta por vía subcutánea en un surco de arrugas como material de relleno de arrugas, de la misma manera como se hace comúnmente con otros rellenos de arrugas tales como el ácido hialurónico. La profundidad de la arruga va disminuyendo progresivamente durante las primeras semanas posteriores al tratamiento y en el lugar de la inyección se obtiene una regeneración muy clara de la zona con un resultado óptimo a los dos o tres meses. A diferencia de lo observado con otros materiales de relleno de arrugas, no se observa inflamación ni hinchazón en el lugar de la inyección y el beneficio es duradero en comparación con el ácido hialurónico, que se biorreabsorbe después de 4 a 6 meses.

Se pueden usar métodos conocidos para estudiar el efecto del concentrado de plaquetas autólogo sobre la profundidad de las arrugas, tales como una reconstitución tridimensional del relieve de la piel mediante perfilometría óptica (método de estilite) (Grove y col., 1989, J. Am. Acad. Dermatol., 21: 631-7) o mediante microscopía láser sobre réplicas de piel de silicona. Otro método consiste en cuantificación *in vivo* de la superficie cutánea "Evaluación superficial de piel viva" o "SELS" mediante el análisis de imágenes en luz ultravioleta (Tronnier y col., 1997, Alct. Dermatol., 23: 290-295). Otro método para la evaluación de la superficie de la piel viva se basa en un sistema óptico con una cámara CCD que mide los cuatro parámetros de la piel: rugosidad, descamación, alisado y arrugamiento (Fluhr y col., 1995, Alct. Dermatol., 21: 151-156). La aumentación dérmica profunda se puede evaluar mediante ecografía, Dermascan®, Dinamarca).

Otros ejemplos de uso cosmético del concentrado de plaquetas autólogo incluyen: mezclar el concentrado de plaquetas con una crema, preferentemente una emulsión, antes de la aplicación a una herida, después de una cirugía o sobre una piel sana. Durante el proceso de absorción, la crema o emulsión lleva la preparación de plaquetas a la piel para amplificar el beneficio hidratante y bioestimular la regeneración o el rejuvenecimiento de la piel.

Usando un hidrogel como el Albugel (EP 1 543 846) preparación 100 % de albúmina o cualquier otro hidrogel resultante de la reticulación de albúmina y otro compuesto químico como polietilenglicol o cualquier otro ingrediente, usando un papel a base de papel altamente hidrófilo, un vehículo para dejar en contacto con la piel hasta que se absorba el plasma rico en plaquetas.

Ejemplo 6: preparación de una asociación de células musculares autóloga

Puede prepararse un ejemplo de asociación de células autóloga usando el proceso de acuerdo con la invención en donde se proporcionan células de músculo esquelético (células progenitoras de músculo o células madre satélite) en la etapa (d) o (e).

a) Células madre progenitoras de mioblastos

La biopsia del músculo esquelético se obtiene del Vasto lateral y mide 7x3 cm. El músculo se prepara el día antes de la biopsia, con una inyección intramuscular en el sitio propuesto para la biopsia (área de piel de 10 por 15 cm en la cara lateral del muslo que recubre el músculo vasto lateral y justo por encima de la articulación de la rodilla, a cada lado) con Decadon y Marcaine (lignocaína de acción prolongada). El músculo se corta en cubitos y se digiere enzimáticamente con una combinación de collagenasa, pronasa y tripsina (Worthington). La acción de la enzima se neutraliza usando suero de pacientes en medio de cultivo DMEM. Los explantes de músculo se siembran en placas de Petri recubiertas con la composición de concentrado de plaquetas autólogo de acuerdo con la invención, también llamado RegenPRP™, (preparada como se describe en el ejemplo 4) y se incuban en el 95 % de oxígeno y el 5 % de dióxido de carbono a 37 °C durante de 3 a 4 semanas. La expresión de Desmina o CD-56 se usa como marcador de mioblastos para identificar mioblastos a partir de fibroblastos. La proliferación de células progenitoras de mioblastos en 3D se muestra en la figura 3. La proliferación celular se puede mejorar mediante la exposición a la luz fotoeléctrica a 633 nm de 2 J/cm² cuadrado durante 10 min durante el cultivo. El día del trasplante (por ejemplo, después de 3 a 4 semanas de incubación), las células del músculo esquelético se liberan mediante tripsina y se colocan en la composición de concentrado de plaquetas autólogo, también llamado RegenPRP™, (preparada como se describe en el ejemplo 4). Las inyecciones en el miocardio se pueden realizar como inyección directa o inyecciones múltiples con catéter en el miocardio del ventrículo izquierdo. La preparación de células de mioblastos es útil para trastornos cardíacos tales como regeneración cardíaca, tratamiento de insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca isquémica y no isquémica y cardiomiopatía no isquémica. La

fracción de eyección se puede mejorar en un 9 % para los receptores cardíacos de mioblastos esqueléticos.

La preparación de células anterior también puede ser útil para el tratamiento de la incontinencia urinaria (extractos de células de mioblastos preparados como se describió anteriormente e inyectados en el cuello de la vejiga), esofagitis por reflujo o trastorno por reflujo gastroesofágico (extractos de células de mioblastos preparados como se describió anteriormente inyectados en el esfínter esofágico inferior) e incontinencia anal (extractos de células de mioblastos preparados como se describió anteriormente e inyectados en el área para-anal).

Como alternativa, se puede llevar a cabo una preparación combinada de fibroblastos y mioblastos (los fibroblastos están presentes en la biopsia de músculo y brotan del perimio junto a los miotubos y las células madre satélite).

En el caso del tratamiento de trastornos cardíacos, se inserta una mezcla de preparación de células de fibroblastos y preparación de células de mioblastos (obtenida como se indicó anteriormente) en el miocardio en una relación de fibroblastos/mioblastos de aproximadamente 30:70.

Para el tratamiento de la incontinencia del cuello de la vejiga, se hace un cultivo separado de fibroblastos al mismo tiempo que los mioblastos como se describió anteriormente y la preparación de células de fibroblastos se inyecta por vía parauretral y la preparación de células de mioblastos se inyecta en el rabdoesfínter, bajo control ecográfico.

b) Células madre satélite

Se cultivan mioblastos y células madre satélite *ex vivo* en presencia de una composición de concentrado de plaquetas autólogo de acuerdo con la invención, también llamado RegenPRP™. El cebado de la proliferación celular se observa después de 7 días de cultivo primario.

Las células se recogen a continuación después de una incubación de aproximadamente 3-4 semanas y se colocan en medio de cultivo tisular (DMEM más un 5-10 % en volumen de composición de concentrado de plaquetas autólogo de acuerdo con la invención) que contiene un parche de amnios desepitelizado humano que mide 4x4 cm y la composición de concentrado de plaquetas de acuerdo con la invención, también llamado RegenPRP™, (preparada como se describe en el ejemplo 4). A continuación, la preparación se somete a irradiación UV durante 10 min. Durante la incubación (típicamente de 2 a 3 semanas aproximadamente), las células se extienden sobre la construcción de amnios y forman una monocapa. La viabilidad y el progreso de la monocapa se evalúan mediante una biopsia dos veces por semana del borde del parche y una evaluación histológica del grosor de la monocapa.

El día del trasplante (por ejemplo, después de aproximadamente 3 a 4 semanas de incubación), la superficie ventricular se esparce con la composición de concentrado de plaquetas autólogo de acuerdo con la invención, también llamado RegenPRP™, (preparada como se describe en el ejemplo 4) y a continuación el parche obtenido anteriormente se coloca con las células boca abajo sobre una superficie en bruto del ventrículo isquémico para permitir que las células madre del parche llenen el segmento isquémico después de la inyección ventricular. La retención celular es mantenida por el amnios que es inerte y no induce reacción inmunológica.

La preparación de células madre satélite es útil para la regeneración cardíaca y el tratamiento de la insuficiencia cardíaca como preparación de ingeniería de tejidos para la cardiomioplastia.

Ejemplo 7: preparación de una asociación de células de fibroblastos autóloga

Se puede preparar un ejemplo de asociación de células de fibroblastos autóloga usando el proceso de acuerdo con la invención en donde se proporcionan células de fibroblastos dérmicos en la etapa (d) o (e).

Los fibroblastos dérmicos se aíslan y expanden de acuerdo con el siguiente procedimiento: un mes antes de la biopsia, el área de piel del donante principal (detrás de la oreja del pliegue axilar anterior, por ejemplo, área no envejecida por el sol) se trata con crema de vitamina A para activar los fibroblastos dérmicos, se realiza una biopsia de piel de 10x6 mm de grosor total y se disecciona al microscopio para eliminar todo el epitelio. La biopsia epitelializada (dermis) se corta a continuación en bloques de 3x3 mm como explantes. La dermis papilar se coloca hacia arriba y se cultiva con la técnica de elevación con aire (*Molnar y col., 1996, anteriormente*) e interfaz de aire (*Meller y col., 2002, anteriormente*) con la mitad del explante expuesto al aire. Los explantes se siembran (por ejemplo, 6 explantes por pocillo) en DMEM y se cultivan a 37 °C con un 95 % de oxígeno y un 5 % de CO₂ durante de aproximadamente 3-5 a aproximadamente 9 días en placas de Petri o matraz de cultivo. El medio se cambia cada 3 días. Los fibroblastos se expanden en modo en 2D como monocapas planas, ya que se observa un crecimiento estático durante la incubación. En los días 7 a 9 después del inicio de la incubación, se obtiene un cambio en el patrón de proliferación y fenotipo en 3D mediante la adición de una composición de concentrado de plaquetas autólogo diluida al 5-10 % de acuerdo con la invención, también llamado RegenPRP™. (preparada como se describe en el ejemplo 4) al medio de cultivo: las células se ceban con RegenPRP™ (0,2 ml por pocillo) solo para cubrir la base. Las células crecen después como una matriz de gel de fibrina en 3D (figura 3). A continuación, las células se diferencian para formar un armazón biológico o una red en gel de fibrina como se muestra en las figuras 4a y 4b. El número de células se mide mediante el recuento diario bajo una rejilla y para evaluar la apoptosis: usar un microscopio invertido (Olympus®).

Después de 3 a 6 semanas de incubación, las células se recogen del gel de fibrina. La viabilidad celular se analiza con el método clásico de azul de tripán y con evaluación bacteriológica, incluida la contaminación por virus.

El extracto de células de fibroblastos expandidos obtenido anteriormente se coloca en una jeringa en presencia de una composición de concentrado de plaquetas autólogo de acuerdo con la invención, también llamado RegenPRP™, y la preparación se inyecta en las arrugas de la cara, más específicamente debajo de las arrugas. Las inyecciones deben realizarse en toda la cara para cubrir la frente, la papada, la región molar, las mejillas, el mentón y el cuello.

La expansión celular puede incrementarse mediante la fotoexposición a la luz del cultivo celular a 633 nm. La preparación de células de fibroblastos es útil para el rejuvenecimiento facial, la mejora de arrugas y arrugas faciales, el tratamiento de pieles dañadas por radiaciones (radiodermatitis o piel dañada por el sol), pieles envejecidas o pieles quemadas y/o en la mejora de arrugas faciales, arrugas, acné (especialmente después de un tratamiento de dermoabrasión), quemaduras, rubéola o cicatrices de viruela, vitiligo, lipoatrofia o lipodistrofia, tal como la lipodistrofia relacionada con el SIDA; sarcoma de Kaposi, queloides cutáneos o fibromatosis palmar de Dupuytren y/o en tratamientos de rejuvenecimiento cutáneo.

Ejemplo 8: preparación de una asociación de células grasas autóloga

Puede prepararse un ejemplo de asociación de células autóloga usando el proceso de acuerdo con la invención en el que se proporcionan células madre adiposas en la etapa (d) o (e).

Las células madre adiposas adultas se aíslan mediante el método de cultivo estándar en 5-10 % en volumen de una composición de concentrado de plaquetas autólogo, también llamado RegenPRP™. A continuación, la preparación se inyecta con un aplicador en pacientes que padecen deficiencias tisulares, tales como deficiencias postraumáticas o deficiencias relacionadas con la edad para pacientes de alrededor de 40 años.

La preparación de células grasas es útil para el tratamiento de la lipoatrofia, tal como en pacientes con VIH/SIDA y otras hemiatrofias congénitas de la cara.

Ejemplo 9: preparación de una asociación de células de condrocitos autóloga

Se puede preparar un ejemplo de asociación de células autólogas de acuerdo con la invención usando el proceso en donde se proporcionan células de condrocitos en la etapa (d) o (e).

Se aísla cartílago de la rodilla del donante (tamaño de la biopsia 10 x 5 mm) y se corta en cubitos. Las células de condrocitos de cartílago se cultivan durante 4-6 semanas en un medio enriquecido con una composición de concentrado de plaquetas autólogo, también llamado RegenPRP™. Las células de cartílago se liberan a continuación por digestión enzimática (colagenasa y pronasa). A continuación, la preparación de células se incorpora quirúrgicamente al paciente con defectos y daños condrales profundos.

La preparación de células de condrocitos es útil para el tratamiento de lesiones profundas del cartílago y erosión o artroscopia.

Otro ejemplo del uso de una preparación de células de condrocitos es el uso en rinoplastia sin cirugía mediante un procedimiento de inyección única: un paciente que padece atrofia congénita del cartílago nasal.

El día antes de la inyección, se realiza una biopsia del cartílago del oído 0,4x0,4 cm se realiza y se coloca en un recipiente estéril lleno de DMEM y antibiótico. La biopsia se trata con digestión enzimática que incluye tripsina y colagenasa. Los condrocitos liberados se resuspenden a continuación en la composición de concentrado de plaquetas autólogo de acuerdo con la invención donde se ha añadido un 10 % de CaCl₂.

El paciente recibe primero anestesia local y desinfección de la nariz. A continuación, la preparación de condrocitos anterior se inyecta en la superficie del cartílago o en la membrana del periostio del sitio que requiere aumento de volumen o elevación. En una segunda fase, la composición de concentrado de plaquetas autólogo donde se ha añadido un 10 % de CaCl₂ se inyecta en la parte superficial de la piel de la nariz, con el fin de bioestimular la regeneración y el rejuvenecimiento de la piel. Después de una hora, se logra la inyección y el paciente puede regresar a casa. Se observa una recuperación excepcional de células viables: la cantidad de condrocitos y células plasmáticas recuperadas e inyectadas fue de aproximadamente 10⁹ células.

Por lo tanto, la preparación de células de condrocitos de acuerdo con la invención es útil para el tratamiento de defectos del cartílago nasal, sin procedimiento quirúrgico, pero solo mediante inyección.

Ejemplo 10: preparación de una asociación de células madre de cordón umbilical autóloga

Se puede preparar un ejemplo de asociación de células autóloga usando el proceso en donde se proporcionan células madre del cordón umbilical en la etapa (d) o (e). Las células madre del cordón umbilical se aíslan y después se crioconservan y se usan para tratar trastornos sanguíneos.

La preparación de células madre del cordón umbilical es útil para el tratamiento de enfermedades hematológicas (tales como talasemia).

Ejemplo 11: preparación de una asociación de células de tendón autóloga

Puede prepararse un ejemplo de asociación de células autóloga usando el proceso de acuerdo con la invención en donde se proporcionan células de tendón en la etapa (d) o (e).

Las células de fibroblastos de tendón se aíslan de acuerdo con los procedimientos estándar de procedimiento en 5-10 % en volumen de composición de concentrado de plaquetas autólogo.

Las células de fibroblastos del tendón se cultivan durante de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 semanas en medio de cultivo enriquecido con una composición de concentrado de plaquetas autólogo, también llamado RegenPRP™. A continuación, la preparación de células se inyecta en el paciente en el lugar de la lesión (por ejemplo, tendón desgarrado, zona artrítica). La inyección puede ser guiada por ecografía, para la localización del sitio dañado y un mejor injerto de la solución implantada.

La inyección de la preparación de células de fibroblastos del tendón también se puede realizar junto al manguito rotadores en el hombro: primero se repara artroscópicamente el desgarro del manguito de los rotadores, luego se inyecta la preparación de células de fibroblastos del tendón a través de un catéter largo en el área suturada. Esto mejora la cicatrización de fibroblastos del tendón en el borde del manguito de los rotadores, previene el hematoma en espacios confinados debajo del acromion, previene el hombro bloqueado al acelerar la cicatrización y mejorar la rehabilitación y el movimiento de la articulación.

La preparación de células tendinosas es útil para el tratamiento de tendones desgarrados, artritis en articulaciones causadas por traumatismos o por envejecimiento, del manguito rotador en hombro.

Ejemplo 12: preparación de una asociación células de ligamento y gingivales autóloga

Puede prepararse un ejemplo de asociación de células autóloga usando el proceso de acuerdo con la invención en el que la membrana perióstica y las células gingivales se proporcionan en la etapa (d) o (e).

Bajo anestesia general y local, el periostio (aproximadamente 10 x 10 mm) se recoge asépticamente del lado bucal del cuerpo mandibular en cuatro perros Beagle hembra sanos. El periostio recogido se corta en trozos de 3x3 mm. Los tejidos se colocan directamente en una placa de 6 pocillos y se cultivan (durante de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 semanas) en una atmósfera humidificada del 5 % de CO₂ y el 95 % de aire a 37 °C en un medio de cultivo enriquecido con una composición de concentrado de plaquetas autólogo, también llamado RegenPRP™. La membrana perióstica y las células gingivales se aíslan mediante digestión enzimática y se cultivan mediante técnica estática.

Típicamente, 6 semanas de cultivo fueron suficientes para obtener el grosor de la membrana perióstica adecuado para el injerto.

Los pacientes se separan en dos grupos: (1) un grupo de control que recibe una composición de concentrado de plaquetas autólogo sin células de la membrana perióstica y (2) un grupo de tratamiento que recibe la preparación de células de la membrana del periostio obtenida anteriormente. La composición de concentrado de plaquetas autólogo (en el grupo de control) y la preparación de células (para el grupo tratado) se inyectan respectivamente al paciente en el lugar de la lesión.

12 semanas después de la operación, la preparación de células de la membrana perióstica había desaparecido por completo tanto en el grupo de control como en el de tratamiento. La regeneración ósea en el grupo de tratamiento con membrana de periostio cultivada fue significativamente mayor que en el grupo de control: el hilo de los implantes dentales estaba casi cubierto con el hueso regenerado, mientras que la mayor parte del hilo en el grupo de control estaba expuesta. El grupo de tratamiento demostró una formación de hueso laminar relativamente grueso y denso de abajo hacia arriba del defecto creado. Se unieron capas gruesas de hueso tejido a la superficie del implante y se observaron células similares a osteoblastos alrededor de la superficie. Aunque se observó abundante neovascularización en la matriz ósea, rara vez se observaron células inflamatorias. El límite entre el hueso regenerado y el original no estaba claro. En el grupo de control, la muestra mostró una fina formación de hueso cortical en el defecto de dehiscencia. Se observó escaso hueso tejido entre la superficie del implante y el hueso cortical, y se observaron pocos osteocitos y osteoclastos dentro de la matriz ósea y en la superficie, respectivamente. La densidad ósea fue significativamente mayor en el grupo de tratamiento que en el grupo de control. Los valores medios de LF fueron $77,58 \pm 1,14$ % y $37,03 \pm 4,63$ % en los grupos de tratamiento y de control, respectivamente ($P < 0,05$).

La preparación de la membrana perióstica y de las células gingivales es útil para el tratamiento de la enfermedad periodontal y la osteítis alveolar, especialmente para promover la regeneración ósea en los sitios de dehiscencia del implante.

Ejemplo 13: preparación de una asociación de células corneales autóloga

Puede prepararse un ejemplo de asociación de células autóloga usando el proceso en el que se proporcionan células de la córnea en la etapa (d) o (e).

5 Se toma una biopsia del epicanto en el borde de la córnea y las células madre del limbo corneal se expanden para autotrasplante en la misma persona después de 4 semanas de cultivo en placas de Petri o frascos recubiertos con una composición de concentrado de plaquetas autólogo de acuerdo con la invención, también llamado RegenPRP™. Las células madre cultivadas de la córnea (de origen limbico) se pueden modificar *ex vivo* sobre la superficie de amnios humano desepitelializado en una monocapa, después de sembrar la construcción con una suspensión de queratinocitos corneales cultivados y viables de acuerdo con la invención. Se usan aproximadamente 10 500.000 células para la siembra y se deja que las células cubran la superficie de la construcción con células después de una incubación adicional de aproximadamente otras 3 semanas. La ingeniería con células se produce después de aproximadamente tres semanas de cultivo de células primarias y puede ser necesario volver a sembrar. La construcción biológica de células-biocompuesto resultante consistiendo en colágeno, fibras de amnios y queratinocitos corneales, que consiste en una membrana y una monocapa de células.

15 La preparación de células corneales se puede extender sobre una lente de contacto soluble que se aplica a la córnea dañada. La lente de contacto desaparece y las células cierran el defecto corneal.

La preparación de células corneales se puede administrar por vía tópica en colirio a pacientes que padecen síntomas de ojo seco. Como alternativa, el amnios anterior se puede usar solo en la córnea cicatrizada o la construcción y la preparación de células de acuerdo con la invención pueden unirse al interior de una lente de 20 contacto biológica o artificial y después aplicarse a la córnea y cubrirse con un parche ocular.

La preparación de células corneales es útil para aliviar el dolor del ojo seco, para el tratamiento del síndrome de Stevens-Johnson y la ceguera corneal debida a quemaduras ácidas y alcalinas corrosivas en la industria, úlceras corneales tales como úlceras corneales recalcitrantes neurotróficas, herpéticas e inducidas inmunológicamente.

Ejemplo 14: preparación de una asociación de células de médula ósea autóloga

25 Se puede preparar un ejemplo de asociación de células autóloga usando el proceso de acuerdo con la invención en donde se proporcionan células de médula ósea en la etapa (d) o (e).

La médula ósea de la cadera se recoge y centrifuga en un dispositivo listo para usar para la preparación de un concentrado de plaquetas (también llamado RegenBCT™ (terapia de células sanguíneas) para separar los glóbulos rojos.

30 La preparación de células de médula ósea se mezcla después con el concentrado de plaquetas y se aplica o inyecta con un aplicador con la adición de CaCl_2 al sitio lesionado de los pacientes.

La preparación de células de médula ósea es útil para el tratamiento de enfermedades cardíacas isquémicas y no isquémicas, defectos óseos y defectos del cartílago.

Ejemplo 15: preparación de una asociación de células de Schwann autóloga

35 Se puede preparar un ejemplo de asociación de células autóloga de acuerdo con la invención usando el proceso de acuerdo con la invención en donde se proporcionan células de Schwann en la etapa (d) o (e).

Bajo anestesia local, se realiza una biopsia de N. Safena o N. SURALIS en la extremidad inferior. La biopsia de nervio se corta en pequeños bloques y se inducen cultivos primarios en placas de Petri enriquecidas con una composición de concentrado de plaquetas autólogo de acuerdo con la invención, también llamado RegenPRP™.

40 Las monocapas se expanden en 3D y las células finalmente se recogen mediante digestión con tripsina y se concentran en una jeringa para la infiltración local de la médula espinal dañada y expuesta quirúrgicamente. Se ha demostrado que las células cultivadas contienen mielina.

La preparación de células de Schwann es útil para el tratamiento del daño del nervio periférico, sutura del nervio y lesión de la médula espinal.

Ejemplo 16: preparación de células de islotes humanas autólogas

Puede prepararse un ejemplo de asociación de células autóloga usando el proceso en donde se proporcionan células de los islotes pancreáticos en la etapa (d) o (e).

50 Los islotes pancreáticos se recogen mediante biopsia abierta y se separan mediante digestión enzimática convencional y separación de Ficol o Hypaque (Page y col., 2007, Diba. Vas. Dis. Res., 7-12) en un medio enriquecido con una composición de concentrado de plaquetas autólogo de acuerdo con la invención, también llamado RegenPRP™.

La preparación de células de los islotes pancreáticos se inyecta después en forma de bolo a través de la vena porta en el hígado.

La preparación de células de los islotes pancreáticos es útil para el tratamiento de la diabetes tipo 1 o diabetes insulino dependiente y para la reversión de la hiperglucemia de la diabetes mellitus.

5 **Ejemplo 17: preparación de células de osteoblastos humanos autólogas**

Se puede preparar un ejemplo de asociación de células autóloga usando el proceso en donde se proporcionan células osteoblásticas en la etapa (d) o (e).

10 La biopsia de hueso cortical en sacabocados se deriva de la cresta ilíaca o del sitio equivalente (maxilar) bajo anestesia local. La biopsia ósea se coloca asépticamente en medio DMEM a 4 °C, o medio de transporte equivalente por expertos en la materia del cultivo de huesos y osteoblastos *ex vivo*. A continuación, la biopsia ósea se corta en cubitos y se digiere diluida en colagenasa de tipo 1 al 10 % (Sigma o Boehringer) a 37 °C durante 15 min bajo una campana de flujo laminar. Como alternativa, se puede usar la digestión con tripsina (Worthington) como alternativa. La digestión enzimática se termina con tres lavados con una composición de concentrado de plaquetas autólogo de acuerdo con la invención, también llamado RegenPRP™ al 10 % en DMEM a 4 °C. La preparación se centrifuga, se
15 granula y se resuspende. Los fragmentos de hueso se colocan en placas de Petri o matraces como explantes con tecnología de elevación con aire en una composición de concentrado de plaquetas autólogo, también llamado RegenPRP™. La preparación se cultiva a 37 °C con antibióticos, gentamicina y anfotericina-B bajo un flujo de gas del 95 % de aire y el 5 % de CO₂. El medio de cultivo se cambia tres veces por semana, cada vez que se añade medio DMEM al 10 % en volumen de una composición de concentrado de plaquetas autólogo. La viabilidad y morfología
20 celulares se evalúan tres veces por semana para evaluar la locomoción celular, la apoptosis y la progresión de la monocapa dimensional en 3D. La formación de microfilamentos y la diferenciación se evalúan mediante microscopía invertida (Olympus®). Se comprueba la ausencia de contaminación bacteriana y viral. Los osteoblastos se pueden modificar en amnios humanos para crear un armazón de biocompuesto celular y un vehículo/construcción de monocapa celular después de la siembra de membrana con 100.000 células como se obtuvo anteriormente y
25 permitiendo la expansión de la membrana de monocapa durante 3-4 semanas, lo que permite una construcción única de la construcción osteoblasto-amnios-membrana para su uso y transferencia para cubrir un defecto óseo o un área injertada después de la pseudoartrosis de la fractura en cualquier sitio.

La preparación de células de osteoblastos es útil para el tratamiento de defectos óseos, injertos óseos o trastornos óseos.

30

REIVINDICACIONES

1. Un tubo separador de vidrio para la preparación de una composición de concentrado de plaquetas, en donde el contenido del tubo consiste en un gel tixotrópico a base de poliéster y una solución tamponada de citrato de sodio a 0,10 M.

5

2. El tubo separador de la reivindicación 1, en donde el tubo separador tiene una entrada para introducir sangre completa, se mantiene en un vacío destinado a aspirar la muestra de sangre completa, es estéril y tiene un vacío utilizable de 8 a 10 ml.

10

3. El tubo separador de la reivindicación 1, en donde el tubo separador es un tubo de vidrio de aproximadamente 15 ml que contiene 3 ml de gel tixotrópico a base de poliéster y 1 ml de solución de citrato de sodio a 0,1 M y que contiene un vacío de aproximadamente 8,5 ml, opcionalmente en donde el tubo de vidrio tiene 16 mm de diámetro y 130 mm de longitud.

15

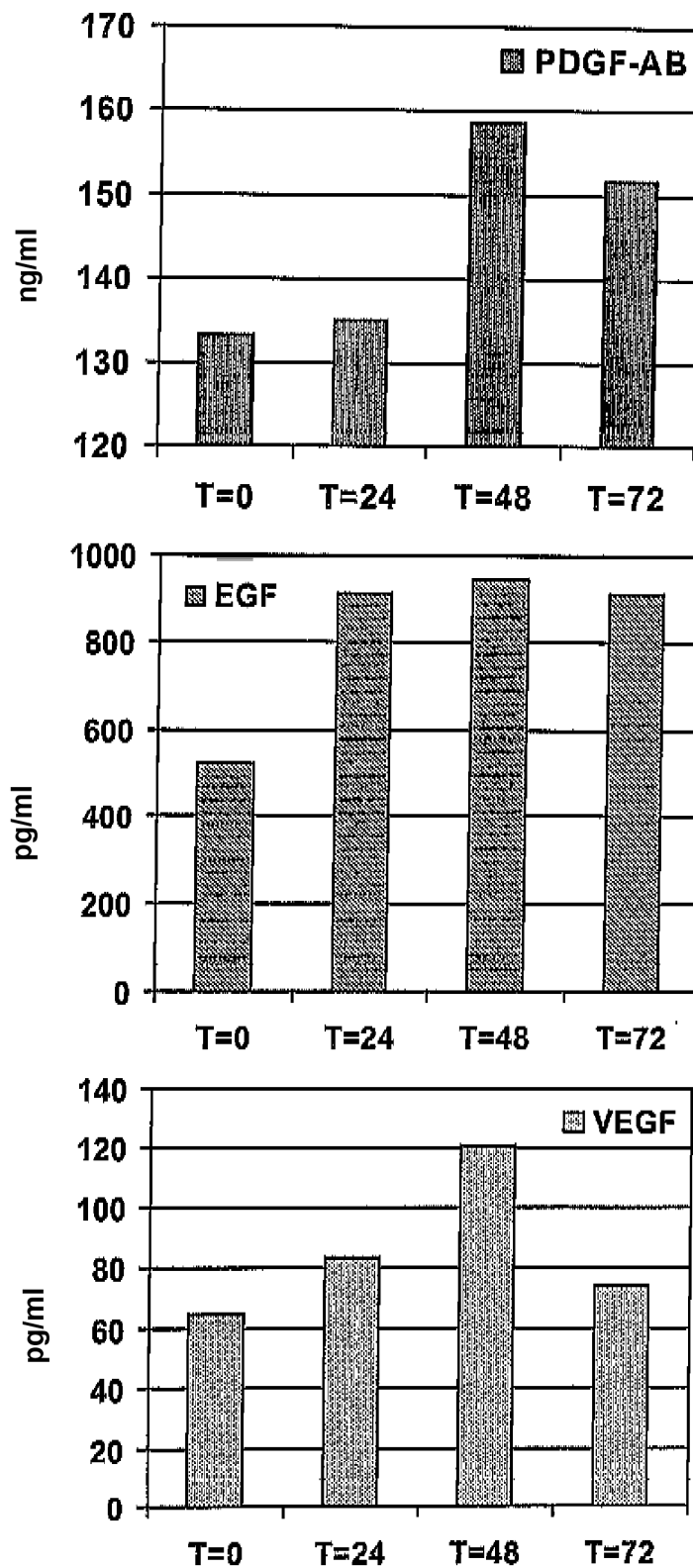


Figura 1

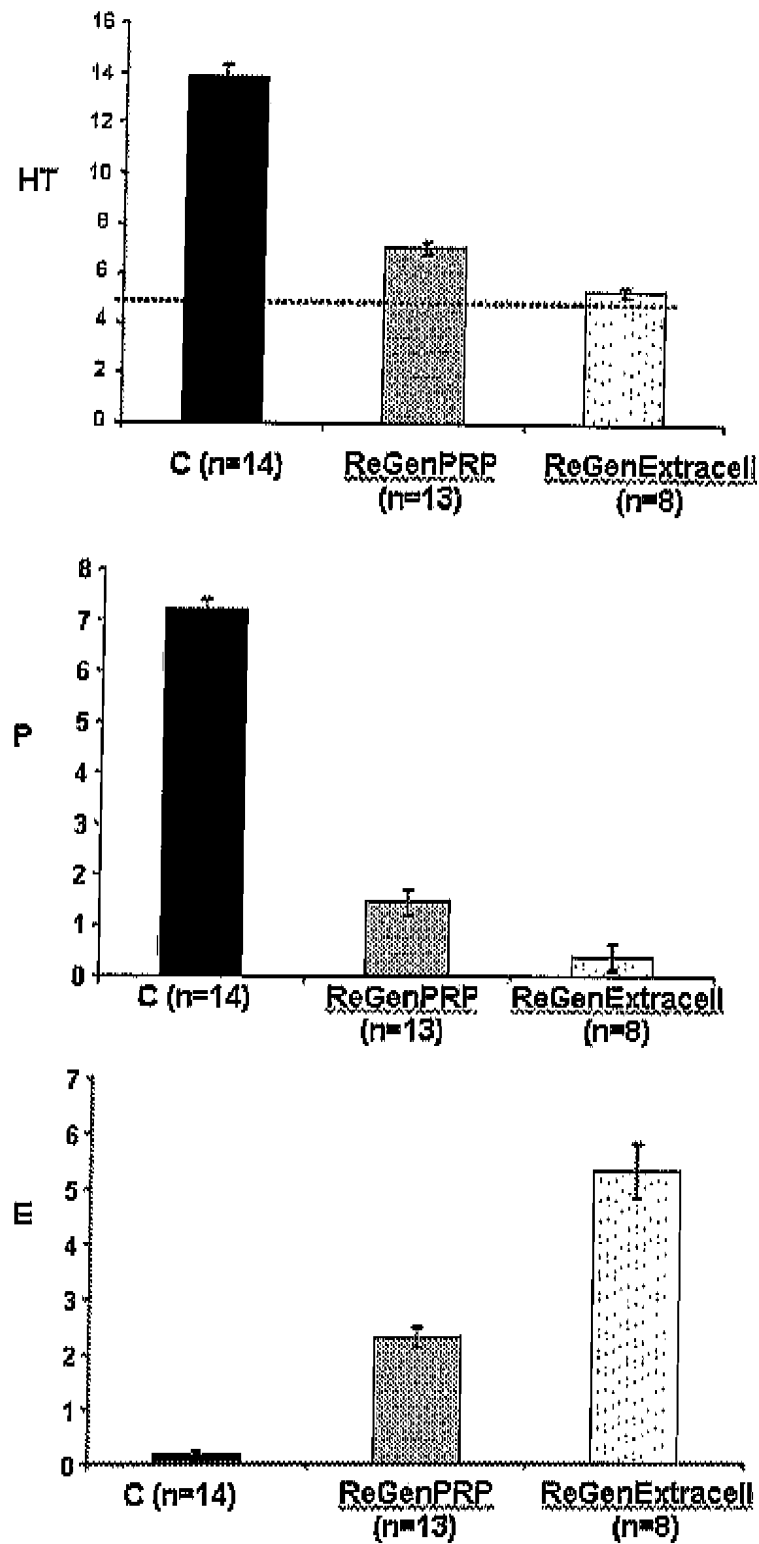


Figura 2

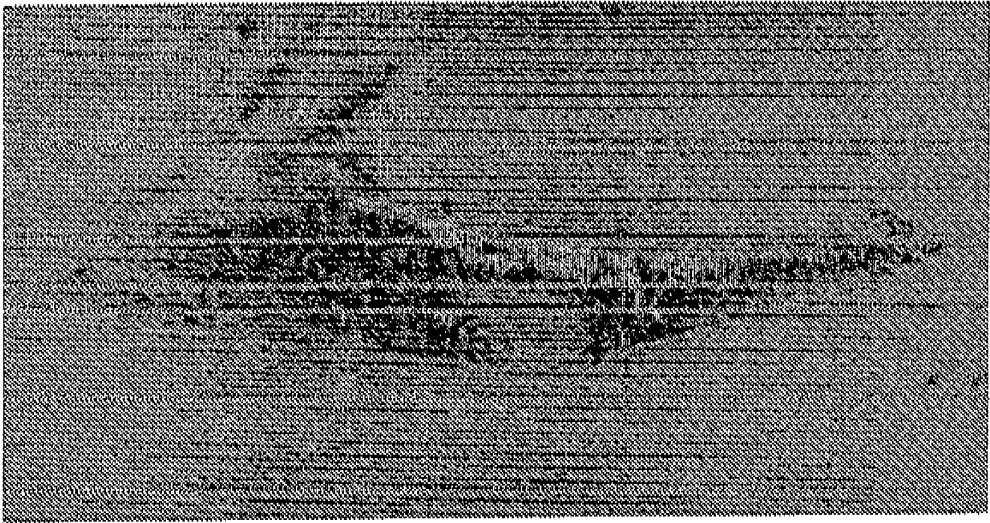


Figura 3

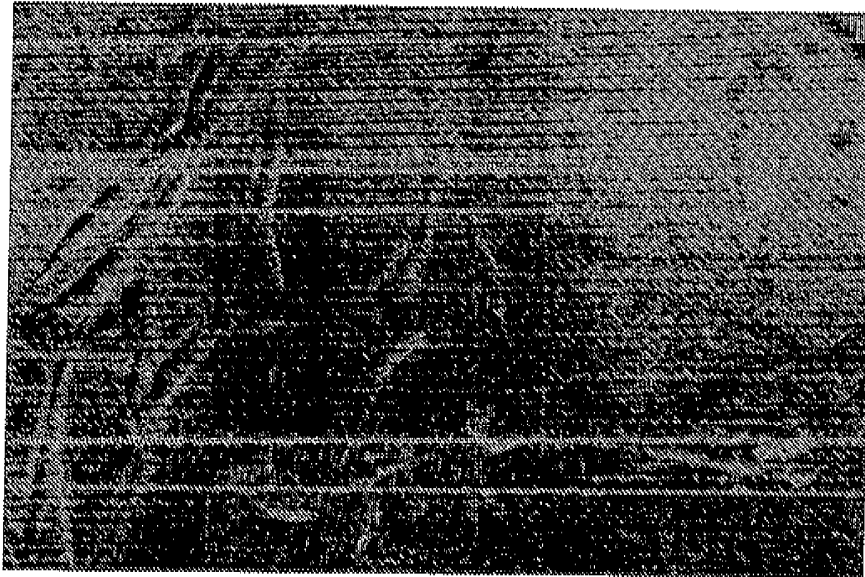


Figura 4a

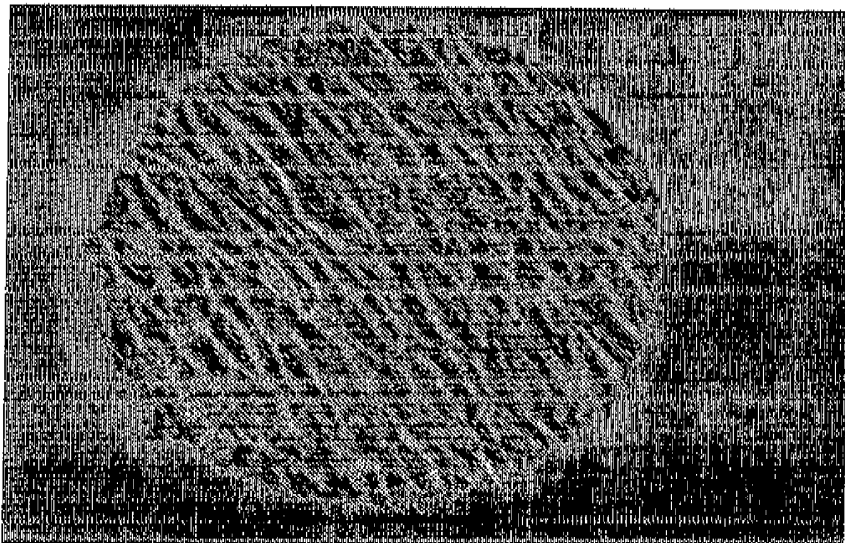


Figura 4b