

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 986 741**

21 Número de solicitud: 202330300

51 Int. Cl.:

A61K 35/16 (2015.01)

A61K 35/19 (2015.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

14.04.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.11.2024

71 Solicitantes:

SANTXA RESEARCH S.L.U. (50.0%)

Beato Tomás de Zumárraga 10

01008 Vitoria-Gasteiz (Araba/Álava) ES y

UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO / EUSKAL

HERRIKO UNIBERTSITATEA (50.0%)

72 Inventor/es:

SÁNCHEZ ÁLVAREZ, Mikel;

SÁNCHEZ ARIZMENDIARRIETA, Pello;

DELGADO SAN VICENTE, Diego;

BEITIA SAN VICENTE, Maider;

MERCADER RUIZ, Jon;

BASABE DESMONTS, Lourdes y

BENITO LÓPEZ, Fernando

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **PLASMA ENRIQUECIDO EN PLAQUETAS Y MOLÉCULAS PLASMÁTICAS**

57 Resumen:

Plasma enriquecido en plaquetas y moléculas plasmáticas

La invención se refiere a un método para producir un plasma enriquecido en plaquetas y en biomoléculas plasmáticas, así como al propio plasma producido. El método de la invención comprende la centrifugación, evaporación y ajuste de pH de una muestra de sangre.

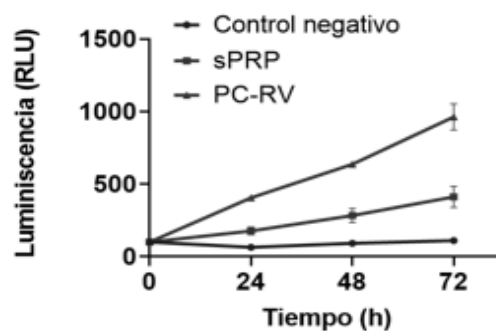


FIG. 4

DESCRIPCIÓN

PLASMA ENRIQUECIDO EN PLAQUETAS Y MOLÉCULAS PLASMÁTICAS

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención pertenece al campo de la biotecnología y se refiere a un método de obtención de un plasma rico en plaquetas y en moléculas plasmáticas y al plasma obtenido mediante dicho método.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En los últimos años, las terapias biológicas avanzadas y la medicina regenerativa se han convertido en una prometedora alternativa a los tratamientos convencionales. El uso de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) es una de las tecnologías que más se ha extendido y consolidado en varios campos de la medicina. Prueba de ello es el impacto económico en el mercado global, donde la tecnología fue valorada en \$45 millones en 2009 y \$120 millones en 2016.

20 El PRP es un conjunto de hemoderivados en los que las plaquetas se encuentran en concentraciones más altas que en la sangre. Una vez que se activa el PRP, el fibrinógeno plasmático se polimeriza en un andamio de fibrina transitorio tridimensional, atrapando varios factores de crecimiento, micropartículas y otras biomoléculas liberadas por la desgranulación de plaquetas y plasma. Los factores de crecimiento y las biomoléculas secuestradas en el andamio de fibrina se liberan de forma gradual y sostenida a medida que se produce la fibrinólisis del andamio, por lo que el PRP es muy adecuado para mejorar y acelerar el proceso natural de reparación de tejidos y, en última instancia, para reducir los tiempos de recuperación.

30 En particular, los factores de crecimiento liberados desencadenan procesos biológicos destinados a reparar el tejido dañado, por ejemplo, la angiogénesis, la quimiotaxis, la migración celular o la proliferación por medio de la señalización de la membrana celular. Algunos tipos de factores de crecimiento circulan en el plasma, por ejemplo, el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), que promueve la cicatrización de heridas, la formación de hueso, la miogénesis del músculo estriado y la migración de queratinocitos y ha demostrado ser especialmente útil en la terapia regenerativa musculoesquelética, como en la

35

reparación del cartílago articular, o contra la osteoporosis, el desgaste asociado a la edad, la distrofia muscular o la osteoartritis, entre otras (Leon A Bach, Clin Biochem Rev Vol 25 155-160 Agosto 2004).

5 Las prácticas clínicas concretas en las que han irrumpido las terapias basadas en PRP son la ortopedia y la medicina deportiva. Prueba de ello son los crecientes estudios relacionados con patologías como la artrosis, las tendinopatías o las lesiones ligamentosas. Como resultado, han surgido en el mercado una gran cantidad de productos PRP y, aunque estos productos generalmente se etiquetan como PRP, presentan propiedades diferentes, como

10 concentraciones variables de plaquetas, moléculas plasmáticas, o presencia o ausencia de leucocitos. El dispositivo y método empleado en la preparación de PRP tiene un impacto importante en dichas propiedades. Ejemplos de sistemas comercialmente disponibles para preparar PRP son Magellan (Arteriocyte Medtronic), ACP o Angel (Arthrex), PRGF-Endoret (BTI Biotechnology Institute), MTF (Cascade), Secquire (Pure PRP Emcyte), RegenKit

15 (RegenLab), GPS (Zimmer Biomet), Ortho Pras (Proteal).

A pesar de la gran cantidad de sistemas PRP en el mercado, todos se basan en el principio de centrifugación para concentrar las plaquetas. Esta técnica genera un gradiente de concentración en función del peso de los componentes sanguíneos y permite aislar y

20 concentrar las plaquetas. Como resultado del aumento en la concentración de plaquetas, también aumentan los factores de crecimiento de plaquetas almacenados en estas plaquetas. Sin embargo, la velocidad de centrifugación empleada en estos métodos no puede concentrar muchas biomoléculas no plaquetarias (extraplaquetarias) que se encuentran en el plasma en el mismo grado que las plaquetas o los factores de crecimiento de plaquetas antes

25 mencionados. La obtención de dichas moléculas no plaquetarias por centrifugación implicaría velocidades de centrifugación muy altas que no son compatibles con la viabilidad celular ni con la práctica médica diaria.

Aunque los PRP obtenidos por los métodos mencionados anteriormente de la técnica anterior

30 están logrando resultados prometedores, existe una necesidad constante para el desarrollo de nuevas metodologías que sean capaces de producir PRP de próxima generación que permitan terapias médicas más efectivas.

COMPENDIO DE LA INVENCION

En el presente documento se muestra el desarrollo de una nueva metodología para la producción de un plasma enriquecido en plaquetas y en moléculas plasmáticas completamente natural. Esto permite un alto nivel de bioseguridad y aprovecha las propiedades biológicas de las biomoléculas presentes en el plasma.

5

Como se muestra en los ejemplos de la solicitud, los autores de la presente invención han demostrado que el plasma de la invención aventaja a los plasmas convencionales en la proporción de proteínas plasmáticas presente en el mismo y en su capacidad para inducir la proliferación celular de fibroblastos dérmicos. En particular, el plasma obtenido por el método desarrollado contiene, sorprendentemente, una concentración del factor de crecimiento IGF-I superior a la de otros plasmas del estado de la técnica.

10

El nuevo método resulta muy ventajoso porque requiere una preparación mínima para su uso por parte del médico.

15

Así, en un primer aspecto la invención se refiere a un método "*in vitro*" para producir un plasma enriquecido en plaquetas y en moléculas plasmáticas que comprende:

i) obtener un plasma libre de glóbulos rojos a partir de una muestra de sangre anticoagulada de un sujeto, en donde el plasma comprende plaquetas y moléculas plasmáticas;

20 ii) concentrar las plaquetas y moléculas plasmáticas presentes en el plasma obtenido en el paso i) mediante evaporación;

iii) ajustar el pH del plasma concentrado obtenido en el paso ii) a un valor de entre 6.5 y 7.5, más preferiblemente a 7.4.

25 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un plasma enriquecido en plaquetas y en moléculas plasmáticas obtenido mediante el método del primer aspecto de la invención.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un plasma enriquecido en plaquetas y moléculas plasmáticas de acuerdo al segundo aspecto de la invención para su uso en medicina.

30

En una realización, la invención se refiere a un plasma enriquecido en plaquetas y moléculas plasmáticas de acuerdo al segundo aspecto de la invención para su uso en el tratamiento de tejidos lesionados.

En una realización, la invención se refiere a un plasma enriquecido en plaquetas y moléculas plasmáticas de acuerdo al segundo aspecto de la invención para su uso en el tratamiento de patologías inflamatorias.

- 5 En otro aspecto, la invención se refiere al uso cosmético del plasma enriquecido en plaquetas y moléculas plasmáticas de acuerdo al segundo aspecto de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 10 **Figura 1.** Niveles relativos de plaquetas, proteínas totales y albúmina en las diferentes formulaciones de plasmas. La significancia estadística entre el nuevo plasma (PC-RV) y un PRP convencional/standard comercial disponible (sPRP) se calculó mediante t-test (* $p < 0,05$ **** $p < 0,0001$).
- 15 **Figura 2.** Niveles relativos de iones en las diferentes formulaciones de plasmas. Los plasmas obtenidos mediante los diferentes sistemas fueron analizados para determinar su contenido en calcio, sodio, cloro, potasio, fósforo y magnesio. La significancia estadística entre los plasmas nuevos y sPRP se calculó mediante t-test (**** $p < 0,0001$).
- 20 **Figura 3.** Niveles relativos de factores de crecimiento en las diferentes formulaciones de plasmas. Los plasmas obtenidos fueron analizados para determinar su contenido en PDGF, HGF e IGF-1. La significancia estadística entre los plasmas nuevos y sPRP se calculó mediante t-test (* $p < 0.05$; **** $p < 0,001$).
- 25 **Figura 4.** Curva de crecimiento de fibroblastos dérmicos cultivados con los diferentes sueros. Las células se cultivaron con medios suplementados con los sueros provenientes de los diferentes plasmas concentrados, sPRP o PC-RV, y se midió la viabilidad cada 24h durante un total de 72h.
- 30 **Figura 5.** Expresión proteica de Faloidina (verde) y Hoechst (azul) mediante inmunofluorescencia en fibroblastos dérmicos. Las células se cultivaron en medios suplementados con sueros de las diferentes formulaciones de plasmas, sPRP y PC-RV. Tras 72h las células se tiñeron mediante inmunofluorescencia para observar la densidad celular a ese tiempo.

Figura 6. Niveles relativos de plaquetas en las formulaciones PC-RV y PRP-MT. Los plasmas obtenidos mediante los diferentes sistemas fueron analizados para determinar su contenido en plaquetas, que fue relativizado con respecto a niveles basales en sangre. La significancia estadística entre los dos PRPs se calculó mediante t-student.

5

Figura 7. Niveles relativos de proteínas totales y albúmina de PC-RV relativos a sangre. Los plasmas obtenidos fueron analizados para determinar su contenido en proteínas y albúmina, que fueron relativizadas frente a niveles basales en sangre. La significancia estadística para la concentración de albúmina y proteínas totales entre el PC-RV y sangre se calculó mediante t-student y Wilcoxon respectivamente (** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

10

Figura 8. Niveles relativos de iones de PC-RV relativos a sangre. Los plasmas obtenidos fueron analizados para determinar su contenido en calcio, sodio, cloro, potasio, fósforo y magnesio. La significancia estadística entre el PC-RV y la sangre se calculó mediante t-student (**** $p < 0,0001$).

15

Figura 9. Niveles relativos de factores de crecimiento plasmáticos en las diferentes formulaciones de plasmas. Los plasmas obtenidos mediante los diferentes sistemas PRP-MT y PC-RV fueron analizados para determinar su contenido en IGF-1. La significancia estadística se calculó mediante t-student (* $p < 0.05$).

20

Figura 10. Curva de crecimiento de fibroblastos dérmicos cultivados con los diferentes sueros. Las células se cultivaron con medios suplementados con los sueros provenientes de los diferentes plasmas concentrados y se midió la viabilidad cada a 0, 48 y 96h. La significancia estadística entre PRP-MT y PC-RV para cada tiempo se calculó mediante t-student con Welch's correction (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

25

Figura 11. Expresión proteica de Faloidina (verde) y Hoechst (azul) mediante inmunofluorescencia en fibroblastos dérmicos. Las células se cultivaron en medio suplementado con PC-RV. Las células se tiñeron mediante inmunofluorescencia al inicio y tras 72h para observar el aumento de densidad celular a ese tiempo.

30

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Todos los términos, como se usan en la presente solicitud, salvo que se indique de otra forma, se entenderán en su significado común, tal como se conoce en la técnica. Otras definiciones

35

más específicas para ciertos términos como se usan en la presente solicitud se definirán más adelante en este apartado y pretenden aplicarse uniformemente a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, a menos que una definición expuesta expresamente de otra manera proporcione una definición más amplia.

5 Método de la invención

En un primer aspecto la invención se refiere a un método "*in vitro*" para producir un plasma enriquecido en plaquetas y en moléculas plasmáticas que comprende:

- 10 i) obtener un plasma libre de glóbulos rojos a partir de una muestra de sangre anticoagulada de un sujeto, en donde el plasma comprende plaquetas y moléculas plasmáticas;
- ii) concentrar las plaquetas y moléculas plasmáticas presentes en el plasma obtenido en el paso i) mediante evaporación;
- 15 iii) ajustar el pH del plasma concentrado obtenido en ii) a un valor de entre 6.5 y 7.5, más preferiblemente a 7.4.

El término "*in vitro*", como se usa aquí, se refiere a que el método no se lleva a cabo en el cuerpo de un sujeto humano o animal, sino en células o fluidos aislados de dicho sujeto o en un tubo de ensayo.

- 20 El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier animal con circulación sanguínea, preferentemente un mamífero, más preferentemente un primate, y aún más preferentemente, un ser humano, varón o mujer, de cualquier edad o raza. Además, el sujeto puede ser un sujeto sano o un sujeto diagnosticado de cualquier patología o enfermedad.

- 25 El término "plasma" o la expresión "plasma sanguíneo", en la presente invención, se refiere a la porción fluida no celular de la sangre de humanos o animales que se encuentra antes de la coagulación. Se compone de agua al 90 %, proteína al 7 % y el 3 % restante de grasa, glucosa, vitaminas, hormonas, oxígeno, dióxido de carbono y nitrógeno, además de productos de desecho metabólicos como el ácido úrico. Es el componente principal de la sangre, que representa aproximadamente el 55 % del volumen total de sangre, mientras que el 45 % restante corresponde a los elementos formados. La viscosidad del plasma sanguíneo es 1,5 veces la del agua. Las principales proteínas plasmáticas son las siguientes: albúmina, que también participa en el transporte de lípidos; globulinas, que están relacionadas principalmente con los mecanismos de defensa del organismo (por ejemplo, 30 inmunoglobulinas) o con el transporte del hierro (transferrina); fibrinógeno, una proteína que

es esencial para la coagulación de la sangre; protrombina, proteína que participa en el proceso de coagulación; y las lipoproteínas de baja y alta densidad (LDL y HDL, respectivamente) que participan en el transporte del colesterol. El conjunto de proteínas plasmáticas, también denominadas "factores plasmáticos", realiza las funciones, entre otras, de:

- 5 - mantener el volumen plasmático y el volumen sanguíneo,
- proteger y mantener la estabilidad del pH de la sangre,
- participar en la viscosidad de la sangre, y por lo tanto, contribuir mínimamente a la resistencia vascular periférica y la presión vascular (presión arterial), e
- intervenir en la concentración de iones de equilibrio electroquímico (denominado efecto
- 10 Donnan).

El término "plaquetas", como se usa en el presente documento, se refiere a unidades de células pequeñas (2-3 micrómetros de diámetro), ovaladas y sin núcleo generadas en condiciones normales en la médula ósea a partir de la fragmentación citoplasmática de los

15 megacariocitos. Las plaquetas circulan en la sangre de todos los mamíferos y participan en la hemostasia, participando en la formación de los coágulos de sangre. Las plaquetas liberan un gran número de factores de crecimiento y/o citoquinas, incluyendo el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF, también abreviado como PDGFAA), un potente agente quimiotáctico y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β 1), que estimula la

20 formación de la matriz extracelular. Dependiendo de ciertas condiciones, las plaquetas también sintetizan muchas otras moléculas, tal como se ha comentado anteriormente, esenciales del proceso inflamatorio, y del proceso reparador y regenerativo de los tejidos. Estos factores de crecimiento o moléculas han demostrado desempeñar un papel importante en la regeneración y reparación del tejido conjuntivo. Otras proteínas y factores de crecimiento

25 producidos por plaquetas y procesos inflamatorios, reparadores y regenerativos asociados, incluyen el factor de crecimiento de fibroblastos básico (BFGF), el factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1), el factor de crecimiento de tipo insulina 2 (IGF-2), el factor de crecimiento epitelial (EGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la interleucina 8, el factor de crecimiento de

30 queratinocitos, el factor de crecimiento del tejido conjuntivo. La aplicación local de todos estos factores de crecimiento, moléculas y proteínas producidos por las plaquetas participa en y acelera el proceso de curación de diferentes lesiones. Las plaquetas también liberan grandes cantidades de trombina y adenosina difosfato ADP, calcio, tromboxano A2, PF4, PAI-1, fibrinógeno, fibronectina, trombomodulina, FV, FXIII, RANTES, trombospondina, WWF PF-3,

35 serotonina, enzimas hidrolíticas, etc.

Como se usa en este documento, el término "moléculas plasmáticas", "biomoléculas plasmáticas" o "biomoléculas no plaquetarias", se refiere a biomoléculas no almacenadas o no almacenadas exclusivamente en plaquetas.

5

Preferiblemente, "moléculas plasmáticas" se refiere a factores de crecimiento. Sin embargo, el término "moléculas plasmáticas" también puede incluir iones y proteínas distintos de los factores de crecimiento. Preferentemente, el término "moléculas plasmáticas" se refiere a biomoléculas que no pueden ser concentradas por técnicas de centrifugación sin dañar las plaquetas ni/o las propias biomoléculas tras dicha centrifugación. La concentración se refiere a un aumento de la concentración de proteínas totales tal y como se define más abajo para la presente invención. A este respecto, la concentración de plaquetas y de moléculas plasmáticas presentes en la sangre anticoagulada es similar a la concentración de plaquetas y moléculas plasmáticas presentes en el plasma libre de glóbulos rojos obtenido tras el proceso de centrifugación antes de la concentración por evaporación.

15

Por "proteína plasmática" se entiende, según la invención, cualquier proteína, y más particularmente cualquier proteína de interés industrial o terapéutico, contenida en el plasma sanguíneo. Las proteínas del plasma sanguíneo abarcan la albúmina, alfa/macroglobulina, antitripsina, antitrombina, antitripsina, Apo A, Apo B, Apo C, Apo D, Apo E, Apo F, Apo G, beta XIIa, C 1 -inhibidor, proteína C-reactiva, C7, C1r, C1s, C2 C3, C4, C4bP, C5, C6, C1q, C8, C9, carboxipeptidasa N, ceruloplasmina, factor B, factor D, factor H, factor I, factor IX, factor V, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor X, factor XI, factor XII, factor XIII, fibrinógeno, fibronectina, haptoglobina, hemopexina, heparina cofactor II, histidina rich GP, IgA, IgD, IgE, IgG, ITI, IgM, quininasa II, quininógeno HPM, lisozima, PAI 2, PAI I, PCI, plasmina, inhibidor de la plasmina, plasminógeno, prealbúmina, precalicreína, properdina, proteasa nexina INH, proteína C, proteína S, proteína Z, protrombina, suero amiloide proteína (SAP), TFPI, tiol-proteinasa, trombomodulina, factor tisular (TF), TPA, transcolabamina II, transcortina, transferrina, vitronectina, y el factor de Willebrand. Asimismo, entre las proteínas del plasma sanguíneo también se encuentran algunas hormonas, entre ellas, los factores de crecimiento similar a la insulina, p.ej. IGF-I.

25

30

Especialmente, las proteínas plasmáticas abarcan las proteínas de la coagulación, es decir las proteínas plasmáticas implicadas en la cadena de reacciones en cascada que llevan a la formación de un coágulo sanguíneo. Las proteínas de la coagulación abarcan el factor I (fibrinógeno), el factor II (protrombina), el factor V (proacelerina), el factor VII (proconvertina),

35

el factor VIII (factor anti-hemofílico A), el factor IX (factor anti-hemofílico B), el factor X (factor Stuart), el factor XI (factor Rosenthal o PTA), el factor XII (factor Hageman), el factor XIII (factor que estabiliza la fibrina o FSF), la PK (Precalicroina) el KHPM (quininógeno de alto peso molecular), el factor III (tromboplastina o factor tisular), el cofactor II de la heparina (HCII), la proteína C (PC), la trombomodulina (TM), la proteína S (PS), el factor de Willebrand (Wf) y el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), o también los factores tisulares.

En algunos modos de realización, la proteína plasmática consiste en una proteína de la coagulación con actividad enzimática. Las proteínas de la coagulación con actividad enzimática abarcan las formas activadas del factor II (protrombina), factor VII (proconvertina), factor IX (factor anti-hemofílico B), factor X (factor Stuart), factor XI (Factor Rosenthal o PTA), factor XII (factor Hageman), factor XIII (factor que estabiliza la fibrina o FSF) y de la PK (Precalicroina).

Como se usa en este documento, "plasma enriquecido en moléculas plasmáticas" se refiere al plasma que ha sufrido un proceso que aumenta su concentración de biomoléculas no plaquetarias. En una modalidad preferida, se refiere a plasma que ha sido sometido a un proceso que aumenta la concentración de sus proteínas totales tal y como se define más abajo.

El término "sangre", como se usa en el presente documento, se refiere a un fluido tisular que fluye a través de los capilares, venas y arterias de todos los vertebrados. Su característico color rojo se debe a la presencia del contenido de pigmento rojo de los eritrocitos. Es un tipo especializado de tejido conjuntivo con una matriz coloidal líquida y constitución compleja. De hecho, la sangre comprende una fase sólida formada por células (incluyendo leucocitos, eritrocitos y plaquetas) y una fase líquida, representada por el plasma. Su función principal es la distribución logística y la integración sistémica, cuya contención en los vasos (espacio vascular) apoya su distribución (circulación sanguínea) en la mayor parte del organismo.

El término "eritrocitos" o "glóbulos rojos" o "RBC", en el sentido usado en la presente descripción, se refiere a los corpúsculos sanguíneos que transportarán el oxígeno y el dióxido de carbono en la sangre. Se sabe que los corpúsculos carecen de núcleos y orgánulos (solo en mamíferos), por lo que no pueden considerarse estrictamente células. Contienen algunas vías enzimáticas, y su citoplasma está ocupado casi por completo por la hemoglobina, una proteína responsable del transporte de oxígeno. En la membrana plasmática de los eritrocitos se encuentran las glicoproteínas (CD) que definen los diferentes grupos sanguíneos y otros

identificadores celulares. Los eritrocitos tienen forma de disco, son bicóncavos, deprimidos en el centro; esto aumenta el área de superficie eficaz de la membrana. Los RBC maduros carecen de núcleo, porque se desaloja en la última etapa de la maduración en la médula ósea antes de introducirse en el torrente sanguíneo.

5

El término “anticoagulada” se utiliza en el presente documento para referirse a sangre que ha sido tratada con un anticoagulante. Por su parte, el término “anticoagulante”, en el sentido usado en la presente descripción, se refiere a una sustancia endógena o exógena que interfiere con o inhibe la coagulación de la sangre. Los ejemplos no limitantes de
 10 anticoagulantes son los activadores de antitrombina III y la heparina, ardeparina de bajo peso molecular, certoparina, nadroparina, logiparina, parnaparina, reviparina y tedelparina, y antitrombina recombinante III, inhibidor del factor tisular (TF)-Factor Vila, como los mutantes TF, anticuerpos anti-TF, inhibidores del factor VII, inhibidores de la trombina tales como inhibidores del factor Xa antiestatina, TAP (péptido anticoagulante de garrapatas), DX9065,
 15 lefaxina, fondaparinux, terostatina, YM-75466 y ZK-807,834, anticuerpos contra el factor IXa y Xa, activadores de la vía de la proteína C e inhibidores selectivos de la trombina como argatrobán, bivalirudina, efegatrán, H376/95, hirugeno, inogatrán, melagatrán, napsagatrán, UK-156406 y ximelagatrán, y compuestos químicos que capturan los iones de calcio, tales como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), citrato (en general, citrato de sodio) y oxalato.

20

En una realización particular, el anticoagulante es citrato de sodio.

En una realización particular, el anticoagulante, preferiblemente el citrato de sodio, está comprendido en una solución, preferiblemente acuosa. En una realización particular, el citrato
 25 de sodio, está comprendido en una solución, preferiblemente acuosa, que comprende ácido cítrico.

En otra realización, el anticoagulante, preferiblemente el citrato de sodio, está presente en una concentración de entre 1% y 10%, de entre 2% y 8%, de entre 2% y 6%, de entre 3% y
 30 5%, de entre 3% y 4%, más específicamente a una concentración de 3,8 % (p/v), p/v refiriéndose al peso de anticoagulante con respecto al volumen de la solución en g/100 mL.

Según se utiliza en la presente invención, el término “evaporación” se refiere a un tipo de vaporización de un líquido en el que la superficie del líquido pasa a una fase gaseosa que no
 35 está saturada con la sustancia que se evapora.

En un primer paso i), el método de la invención comprende la obtención de un plasma libre de glóbulos rojos a partir de una muestra de sangre anticoagulada de un sujeto. Dicho paso comprende tratar una muestra de sangre de un sujeto con anticoagulante, en donde el significado de anticoagulante es el mismo que se proporcionó anteriormente.

5

En una realización particular, la obtención del plasma libre de glóbulos rojos y se obtiene mediante la centrifugación de la muestra de sangre anticoagulada a una velocidad de al menos 700 g, de al menos 750 g, de al menos 800 g, de al menos 850 g, de al menos 900 g, de al menos 950 g, de al menos 1000 g, de al menos 1050 g, de al menos 1100 g, de al menos 1150 g, de al menos 1200 g, en particular hasta: 1500 g, 1400 g, o 1300 g. En una realización el plasma libre de glóbulos rojos se obtiene mediante la centrifugación de la muestra de sangre anticoagulada durante al menos 2 minutos, al menos 3 minutos, al menos 4 minutos, al menos 5 minutos, al menos 6 minutos, al menos 7 minutos, al menos 8 minutos, al menos 9 minutos, al menos 10 minutos, al menos 11 minutos, al menos 12 minutos, al menos 13 minutos, al menos 14 minutos, al menos 15 minutos, al menos 16 minutos, al menos 17 minutos, al menos 18 minutos, al menos 19 minutos o al menos 20 minutos, en particular hasta: 45 minutos, 40 minutos, 35 minutos, 30 minutos o 25 minutos. En otra realización, estas velocidades y tiempos se combinan. Un experto en la materia sabrá combinar y variar las condiciones de velocidad de centrifugación y tiempo de centrifugación modificándolas de manera compensatoria, esto es aumentando la fuerza de centrifugación y disminuyendo el tiempo de centrifugación o de manera alternativa disminuyendo la velocidad de centrifugación y aumentando el tiempo para obtener el plasma libre de glóbulos rojos.

En una realización particular, el plasma libre de glóbulos rojos se obtiene mediante la centrifugación de una muestra de sangre anticoagulada a una velocidad de entre 700 y 1500 g, preferiblemente entre 1050 y 1400 g, más preferiblemente a 1200 g.

En otra realización particular, el plasma libre de glóbulos rojos se obtiene mediante la centrifugación de una muestra de sangre anticoagulada durante entre 5 y 15 minutos, preferiblemente entre 5 y 11 minutos, más preferiblemente durante 8 minutos.

En otra realización particular, el plasma libre de glóbulos rojos se obtiene mediante la centrifugación de una muestra de sangre anticoagulada a una velocidad de entre 700 y 1500 g, preferiblemente entre 1050 y 1400 g, más preferiblemente a 1200 g, y durante 5-15 minutos, preferiblemente durante 5-11 minutos, más preferiblemente durante 8 minutos.

35

En una realización preferida, el plasma libre de glóbulos rojos se obtiene mediante la centrifugación de una muestra de sangre anticoagulada a una velocidad de 1200 g durante 8 minutos.

- 5 Tras el proceso de centrifugación, se obtienen diferentes capas de componentes sanguíneos: una capa de plasma en la parte superior (sobrenadante) que comprende las plaquetas y las moléculas plasmáticas; una capa leucocitaria en el centro que comprende los glóbulos blancos; y una capa inferior que comprende los glóbulos rojos.
- 10 El plasma libre de glóbulos rojos se obtiene recogiendo el sobrenadante y la capa central. Esto puede hacerse por cualquier medio conocido por el experto en la materia, como por ejemplo pipeteando.

El término "centrifugación" se refiere a un método mediante el que los sólidos de diferentes densidades se separan de los líquidos a través de una fuerza de rotación, que aplica a la mezcla una fuerza centrífuga superior a la de la gravedad. Los sólidos y las partículas de mayor densidad se sedimentan. Los ejemplos de centrifugación incluyen, sin limitación, centrifugación diferencial, isopícnica, zonal o ultracentrifugación. En el contexto de la presente invención se prefiere la centrifugación diferencial.

20 Las centrífugas utilizadas para preparar el plasma libre de glóbulos rojos y pueden obtenerse de una diversidad de fuentes, incluyendo, por ejemplo, la centrífuga PLACONTM, que puede obtenerse de OCT USA Inc., Torrence.

25 El término "libre de glóbulos rojos" se refiere a que el plasma no contiene glóbulos rojos o contiene cantidades muy bajas de los mismos. En otra realización particular, el plasma obtenido no contiene glóbulos rojos o contiene menos del 5% en peso, menos del 4% en peso, menos del 3% en peso, menos del 2% en peso, menos del 1% en peso de glóbulos rojos con respecto al peso total del plasma.

30 El plasma libre en glóbulos rojos contiene una concentración plasmática similar a la de los niveles basales de la sangre. Por lo tanto, en una realización particular, el plasma libre de glóbulos rojos obtenido tras la centrifugación contiene una concentración plaquetaria de entre 100.000 y 400.000 plaquetas por microlitro de sangre (pl/μl), más concretamente de entre
35 150.000 y 350.000 plaquetas por microlitro de sangre (pl/μl).

En otra realización particular, el método de la invención comprende, en el paso i), obtener un plasma libre de glóbulos rojos y libre de glóbulos blancos a partir de una muestra de sangre anticoagulada de un sujeto.

- 5 El término "leucocito" o la expresión "glóbulos blancos", que se usan de manera indistinta en el presente documento, se refiere a células sanguíneas que forman parte de los efectores celulares del sistema inmunitario. Son células con capacidad migratoria que usan la sangre como vehículo para acceder a las diferentes partes del organismo. Los leucocitos son responsables de destruir los agentes infecciosos y las células infectadas. Basándose en las
- 10 características microscópicas de su citoplasma (tinción) y de su núcleo (morfología), se dividen en:
- granulocitos y células polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos y eosinófilos) y tienen un núcleo polimorfo y numerosos gránulos en el citoplasma, con tinción diferencial de acuerdo con los tipos de células; y
 - 15 - agranulocitos o células monomorfonucleares (linfocitos y monocitos): carecen de gránulos de citoplasma y tienen un núcleo redondo.

El término "libre de glóbulos rojos y libre de glóbulos blancos" se refiere a que el plasma no contiene glóbulos rojos ni glóbulos blancos o contiene cantidades muy bajas de los mismos.

- 20 En una realización particular, el plasma obtenido no contiene glóbulos rojos ni contiene glóbulos blancos o contiene menos del 5% en peso, menos del 4% en peso, menos del 3% en peso, menos del 2% en peso, menos del 1% en peso de cada uno de glóbulos rojos y glóbulos blancos con respecto al peso total del plasma.

- 25 El plasma libre en glóbulos rojos y glóbulos blancos contiene una concentración plasmática similar a la de los niveles basales de la sangre. Por lo tanto, en una realización particular, el plasma libre de glóbulos rojos y glóbulos blancos obtenido tras la centrifugación contiene una concentración plaquetaria de entre 100.000 y 400.000 plaquetas por microlitro de sangre (pl/ μ l), más concretamente de entre 150.000 y 350.000 plaquetas por microlitro de sangre
- 30 (pl/ μ l).

- El plasma libre de glóbulos rojos y libre de glóbulos blancos se obtiene mediante la centrifugación de la misma manera que para obtener el plasma libre de glóbulos rojos, pero en este caso recogiendo solo la capa superior, es decir, no recogiendo la capa leucocitaria ni
- 35 la capa inferior.

En un segundo paso ii), el método de la invención comprende concentrar mediante evaporación las plaquetas y moléculas plasmáticas presentes en el plasma obtenido en el primer paso i).

- 5 La evaporación puede realizarse mediante i) aumento de la temperatura, ii) disminución de la presión, iii) o por la combinación de ambos efectos, aumento de la temperatura y disminución de la presión; opcionalmente mientras se centrifuga el plasma.

10 Para la concentración por aumento de la temperatura, se pueden utilizar diversos medios conocidos por un experto en la materia entre los que se encuentran, sin limitación, baños de agua u otras fuentes de calor.

15 Para la evaporación por disminución de la presión, se puede introducir el plasma en un desecador de vacío, en presencia de una sustancia o agente desecante, métodos alternativos conocidos en el campo técnico también estarían contemplados en la presente invención.

20 La evaporación por combinación de aumento de la temperatura y disminución de la presión se puede efectuar por evaporación en estufas de vacío que disponen de un regulador de temperatura así como una conexión para el vacío, tal como en un rotoevaporador o en un evaporador centrífugo.

25 Más preferiblemente, la evaporación por combinación de aumento de la temperatura y disminución de la presión se efectúa por evaporación rotativa, es decir, utilizando un rotoevaporador o evaporador rotativo. A través de esta técnica, la evaporación tiene lugar a presión reducida, producida normalmente por una bomba de vacío, y a temperaturas moderadas, logrando así la eliminación de vapores por calentamiento y aplicación simultánea de vacío. La evaporación rotativa es esencialmente una destilación a presión reducida: una solución (en este caso el plasma) en un matraz de fondo, en particular redondo, se coloca en
30 un baño de agua del evaporador rotativo y el matraz se gira mientras el sistema está parcialmente evacuado (mediante un aspirador de agua o una bomba de vacío). La presión reducida en el aparato hace que ciertos componentes del plasma, tal como el agua, hiervan a una temperatura inferior a la normal, y la rotación del matraz aumenta la superficie del líquido y, por lo tanto, la velocidad de evaporación. El vapor de la sustancia evaporada se condensa
35 cuando entra en contacto con un condensador de agua y gotea en un matraz receptor. Cuando se retira la sustancia evaporada, el plasma concentrado se deja en el matraz. Una diferencia

entre la destilación y la evaporación rotativa es que el destilado se retiene con mayor frecuencia en la destilación, mientras que es el residuo el que se retiene en la evaporación rotativa.

- 5 Un evaporador centrífugo es un evaporador que se utiliza para concentrar soluciones proporcionando fuerza centrífuga. El evaporador centrífugo se basa en centrifugación, temperatura y vacío. La solución que se quiere evaporar (en este caso el plasma) se coloca en el evaporador centrífugo y se aplica la temperatura y la velocidad de centrifugación deseada. La fuerza centrífuga generada por el giro del rotor de la centrífuga crea un gradiente
- 10 de presión en el plasma en los tubos o viales, lo que significa que las muestras hierven de arriba a abajo, lo que ayuda a prevenir una ebullición violenta que puede producir sacudidas. Luego se establece un vacío. Esto elimina el aire y sobre todo reduce la presión en el dispositivo y por lo tanto la temperatura de ebullición de ciertos componentes del plasma, tal como el agua. Cuando la presión es tan baja que la temperatura de ebullición cae por debajo
- 15 de la temperatura del recipiente, el plasma comienza a evaporarse. El proceso se mantiene hasta que se haya evaporado el plasma hasta el volumen deseado.

En una realización preferida, la evaporación se realiza por evaporación rotativa.

- 20 Para ello, se introduce el plasma en un recipiente o matraz para proceder a la evaporación con el rotavapor. Se ajusta la temperatura del baño lleno de agua del rotavapor y se introduce en él el recipiente o matraz con el plasma haciéndolo girar para que la muestra se distribuya por toda la superficie del mismo consiguiendo evaporar más rápido la muestra. Finalmente, para poder proceder a la evaporación, se aplica un vacío. El proceso se mantiene hasta que
- 25 se concentre la muestra al volumen deseado.

En una realización particular, durante la evaporación, preferiblemente rotativa, se somete el plasma a una temperatura de entre 30°C y 45°C, de entre 33°C y 40°C, más preferiblemente a 37°C.

- 30 En otra realización particular, durante la evaporación, preferiblemente rotativa, se somete el plasma a un vacío aplicado de entre 250 y 1000 milibares (mbar), más preferiblemente entre 300 y 1000 mbar, más preferiblemente entre 400 y 1000 mbar, entre 500 y 1000 mbar, entre 600 y 1000 mbar, entre 700 y 1000 mbar, entre 800 y 1000 mbar, entre 900 y entre 1000 mbar,
- 35 más preferiblemente a un vacío de aproximadamente 920 mbar.

El término “vacío aplicado” se refiere a la reducción de presión con respecto a la presión atmosférica. Así, si la presión atmosférica es de 1000 mbar, un vacío aplicado de 920 mbar resultaría en una presión de 80 mbar.

- 5 En una realización particularmente preferida, la temperatura de evaporación, preferiblemente rotativa, arriba indicada se combina con cada uno de estos rangos de vacío de evaporación rotativa.

- 10 En una realización particular, la evaporación, preferiblemente rotativa, se realiza durante, al menos 1 minuto. En otra realización, durante un periodo de entre 1 minuto y 30 minutos, durante 1 minuto y 25 minutos, durante 1 minuto y 20 minutos, durante 1 minuto y 15 minutos, durante 1 minuto y 10 minutos, o durante 1 minuto y 5 minutos. Más particularmente, se realiza durante al menos un minuto y un máximo de 30 minutos. Generalmente, a los 3-5 minutos la muestra estará concentrada a la mitad de su volumen inicial, por ejemplo de 12 mL a 6 mL.
- 15 El tiempo del proceso se puede aumentar o disminuir para obtener un menor o mayor volumen final, con mayor o menor concentración. En una realización, el volumen del plasma se reduce entre un 10 y un 90%, más particularmente entre un 30 y 70%, más particularmente aún entre un 40 y 60%.

- 20 Una vez finalizado el proceso de evaporación se recoge la muestra de plasma concentrado.

El método de la invención comprende un tercer paso iii) que comprende medir y ajustar el pH del plasma concentrado.

- 25 La muestra de plasma concentrado obtenido en la etapa ii) se recoge y se mide el pH. La medición del pH es una labor rutinaria que se realizará por medios sobradamente conocidos por cualquier experto en la técnica.

- 30 Posteriormente, se ajusta el pH del plasma concentrado a un pH de entre 6 y 7,6; de entre 6,5 y 7,5; de entre 7 y 7,4; más preferiblemente a un pH de 7,4. En una realización particular el ajuste del pH se realiza mediante la adición de un tampón de ácido clorhídrico 0.8 M en porcentaje de 2.3%. De acuerdo al conocimiento general común, cualquier tipo de buffer puede ser utilizado para acidificar el plasma obtenido. El ajuste del pH es necesario para que se dé la coagulación deseada fruto de la activación plaquetaria previa a la utilización de dicho
- 35 plasma.

En una realización preferida, el método de la invención comprende, adicionalmente, el paso de activar las plaquetas obtenidas en el plasma concentrado obtenido tras ajustar el pH.

La expresión “activación de las plaquetas” se refiere en el presente documento al proceso mediante el cual las plaquetas presentes en el plasma se agregan para dar lugar a la formación del coágulo y propiciar la hemostasia y cicatrización mediante, entre otros procesos, la secreción de los factores de crecimiento o mediadores intercelulares de los gránulos citoplasmáticos. Las plaquetas pueden ser activadas por un gran número de sustancias, a las cuales reaccionan en pocos segundos. Cuando son expuestas a estos agonistas, las plaquetas presentan diferentes respuestas, que se encuentran íntimamente asociadas in vivo, pero que, in vitro, pueden ser estudiadas separadamente: adhesión y cambio de forma, agregación, secreción y expresión de actividad procoagulante.

Las plaquetas activadas cambian su forma haciéndose más esféricas, y formando pseudopodos en su superficie. De esta forma toman una forma estrellada. Tras la activación se produce la secreción de gránulos. Las plaquetas contienen gránulos alfa y gránulos densos. Las plaquetas activadas excretan el contenido de estos gránulos dentro de sus sistemas canaliculares y en la sangre o plasma circundante. Existen dos tipos de gránulos: (i) gránulos densos (contienen ADP o ATP, calcio, y serotonina) y (ii) gránulos- α (contienen factor 4 plaquetario, factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF beta 1), factor de crecimiento derivado de plaquetas, fibronectina, B-tromboglobulina, FvW, fibrinógeno, y factores de coagulación (factor V y VIII), entre otros.

En una realización particular las plaquetas son activadas por una sustancia seleccionada de entre cloruro de calcio, trombina y colágeno. En otra realización las plaquetas se activan mecánicamente mediante el contacto con microesferas de vidrio.

En una realización particular las plaquetas son activadas por una sustancia seleccionada de entre cloruro de calcio, trombina y colágeno, preferiblemente cloruro de calcio. La activación de las plaquetas se lleva a cabo mediante la adición de esa sustancia al plasma obtenido tras ajustar el pH. En una realización más preferida la activación de las plaquetas se lleva a cabo mediante la adición de una solución, preferiblemente acuosa, de cloruro de calcio, de al menos el 5%, tal como del 5 al 30%, más preferiblemente del 10% en peso de cloruro de calcio relativo al volumen de la solución (p/v en g/100 mL). La solución de cloruro de calcio, en cualquiera de las mencionadas concentraciones, se añade preferiblemente en un volumen de

entre 0,05% y 1%, más preferiblemente en un volumen de aproximadamente 0,2%, con respecto al volumen del plasma obtenido tras ajustar el pH.

5 En una realización particular la activación de las plaquetas se realiza mediante la adición de una solución de CaCl_2 , tal y como se describió anteriormente, a una concentración de entre 20 $\mu\text{l/ml}$ de plasma y 60 $\mu\text{l/ml}$ de plasma, de entre 30 $\mu\text{l/ml}$ de plasma y 50 $\mu\text{l/ml}$ de plasma, más particularmente de aproximadamente 40 $\mu\text{l/ml}$ de plasma.

10 En una realización particular, tras la obtención del plasma libre de glóbulos rojos o libre de glóbulos rojos y blancos, pero antes de concentrar, se mide la concentración plaquetaria y de proteínas totales en dicho plasma libre de glóbulos rojos o libre de glóbulos rojos y blancos para comprobar que se mantienen en valores similares a los de la sangre anticoagulada a partir de la cual se obtiene dicho plasma. Por valor similar se entiende valores iguales a los de la sangre anticoagulada a partir de la cual se obtiene dicho plasma o que difiere hasta en 15 un 1%, en 2%, en un 3%, en un 4%, en un 5%, en un 6%, en un 7%, en un 8%, en un 9% o hasta en un 10% con respecto a los valores de la sangre anticoagulada a partir de la cual se obtiene dicho plasma.

20 Para obtener los factores de concentración de plaquetas y proteínas de PRP en relación con los niveles en sangre, se realizaron los respectivos análisis de muestras de sangre y sus correspondientes muestras de PRP después del procesado según la invención. La medición de la concentración de plaquetas se puede realizar mediante un analizador hematológico basado en tecnología de citometría de flujo de fluorescencia (Sysmex XS-1000i; Kobe, Japón). Las muestras se midieron utilizando "Complete Blood Count with Differential test". La 25 concentración de proteínas totales se puede medir con un analizador Cobas c 501 (Roche, Basilea, Suiza).

En otra realización particular, una vez obtenido el plasma concentrado tras el proceso de evaporación, se mide la concentración plaquetaria y de proteínas totales de dicho plasma 30 concentrado. La medición de la concentración plaquetaria y de proteínas totales se realiza como se ha indicado anteriormente. El objetivo de dicha medición es comprobar que la concentración plaquetaria y de proteínas totales ha aumentado con respecto a la concentración plaquetaria medida en el plasma libre de glóbulos rojos o libre de glóbulos rojos y glóbulos blancos anterior a la concentración o con respecto a la sangre anticoagulada a 35 partir de la cual se obtiene dicho plasma.

En otra realización las plaquetas se activan mecánicamente mediante el contacto con microesferas de vidrio.

En una realización, el método de la invención no comprende ninguna etapa de liofilización.

5

Plasma enriquecido

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un plasma enriquecido en plaquetas y en moléculas plasmáticas obtenido mediante el método del primer aspecto de la invención.

10

En una realización particular, la concentración de plaquetas y de proteínas totales del plasma enriquecido es de al menos 1,5 veces superior a la de la muestra de sangre anticoagulada de un sujeto en la etapa i) del método de la invención.

15 El plasma obtenido mediante el método de la invención contiene una concentración plaquetaria superior a la de la sangre anticoagulada de un sujeto en la etapa i) del método de la invención. En una realización particular, el plasma obtenido mediante el método de la invención, contiene una concentración plaquetaria de entre 1,2 y 5 veces superior a la de la sangre anticoagulada de un sujeto en la etapa i) del método de la invención. En otra
20 realización particular, el plasma obtenido mediante el método de la invención contiene una concentración plaquetaria de entre 1,5 y 3, de entre 1,6 y 2 veces superior a la de los niveles en sangre anticoagulada de un sujeto en la etapa i) del método de la invención.

En una realización particular la concentración de plaquetas en el plasma enriquecido es de
25 entre 200.000 y 600.000 plaquetas por microlitro de plasma (pl/μl), de entre 225.000 y 550.000 plaquetas por microlitro de plasma (pl/μl), de entre 250.000 y 500.000 plaquetas por microlitro de plasma (pl/μl), de entre 300.000 y 450.000 plaquetas por microlitro de plasma (pl/μl), más preferiblemente de entre 225.000 y 525.000 plaquetas por microlitro de plasma (pl/μl).

30 El plasma obtenido mediante el método de la invención contiene una concentración de proteínas totales superior a la de la sangre anticoagulada de un sujeto en la etapa i) del método de la invención. En una realización particular, la concentración de proteínas totales del plasma obtenido mediante el método de la invención es de entre 1,2 y 5 veces superior al de la sangre anticoagulada de un sujeto en la etapa i) del método de la invención, de entre
35 1,5 y 3 veces superior a la de la sangre anticoagulada de un sujeto en la etapa i) del método

de la invención, de entre 1,7 y 2 veces la de la sangre anticoagulada de un sujeto en la etapa i) del método de la invención.

La cantidad de proteínas totales puede variar según el sujeto, pero, de forma general el rango de proteínas totales varía entre 6 y 8,3 g/mL.

En una realización preferida, el plasma obtenido por el método de la invención contiene:

- una concentración plaquetaria entre 1,2 y 5, particularmente entre 1,5 y 3, más particularmente entre 1,6 y 2 veces la de la muestra de sangre anticoagulada del paso i); y
- una concentración de proteínas totales entre 1,2 y 5, particularmente entre 1,5 y 3, más particularmente entre 1,7 y 2 veces la de la muestra de sangre anticoagulada de la etapa i).

En una realización, la proporción entre la concentración de plaquetas y la concentración de proteínas totales (siendo la concentración de proteínas totales representativa de la concentración de proteínas plasmáticas) en el plasma obtenido por el método de la invención mantiene el equilibrio de la muestra de sangre anticoagulada del paso i), es decir, la proporción entre la concentración de plaquetas y la concentración de proteínas totales en el plasma obtenido mediante el método de la invención difiere de la misma proporción en la muestra de sangre anticoagulada del paso i) en no más del 20 %, preferiblemente no más del 10 %, más preferiblemente no más del 5%.

El plasma obtenido mediante el método de la invención contiene una concentración de albúmina superior a la de la sangre anticoagulada de un sujeto en la etapa i). Más concretamente, el plasma obtenido mediante el método de la invención contiene una concentración de albúmina de entre 1,2 y 5 veces superior a la de la sangre anticoagulada de un sujeto en la etapa i) del método de la invención, de entre 1,5 y 3 veces superior a la de la sangre anticoagulada de un sujeto en la etapa i) del método de la invención, de entre 1,7 y 2 veces superior a la de la sangre anticoagulada de un sujeto en la etapa i) del método de la invención.

El plasma obtenido mediante el método de la invención presenta un nivel del factor plasmático IGF-I superior al de la sangre anticoagulada de un sujeto en la etapa i) del método de la invención. En otra realización particular, el plasma obtenido mediante el método de la invención presenta un nivel del factor plasmático IGF-I de al menos de entre 1,2 y 5 veces superior, de al menos de entre 1,5 y 3 veces superior al de la sangre anticoagulada de un

sujeto de la etapa i) del método de la invención, de entre 1,8 y 2,2 veces superior al de la sangre anticoagulada de un sujeto de la etapa i) del método de la invención.

5 El rango IGF-1 en sangre varía según la edad del sujeto. Teniendo en cuenta todas las edades, el rango de IGF-1 en sangre varía entre 30 y 640 ng/mL.

10 En el contexto de la presente invención, la expresión “superior” se refiere siempre a una concentración de los compuestos que se analizan superior a la de la sangre de un sujeto control, que corresponde a la sangre anticoagulada del mismo sujeto en la etapa i) del método de la invención. Los diferentes métodos de preparación de PRPs tienen un impacto sobre la capacidad de preservación y concentración de los diferentes componentes de la sangre anticoagulada. En este sentido, se ha observado que el plasma obtenido según la presente invención posee niveles sorprendentemente elevados de ciertos factores de crecimiento, como es el caso de la IGF-I.

15 El término IGF-I se refiere al factor de crecimiento insulínico tipo 1, también conocido como somatomedina C o factor de crecimiento mecano (MGF). En una realización particular, el IGF-I es la proteína codificada por el gen humano que se muestra en la base de datos del conjunto con el número de acceso ENSG00000017427 (versión 106 de Ensembl, abril de 2022). La
20 proteína codificada por este gen es similar a la insulina en función y estructura y es miembro de una familia de proteínas implicadas en la mediación del crecimiento y el desarrollo. La proteína codificada se procesa a partir de un precursor, se une a un receptor específico y se secreta.

25 Las mediciones anteriores de proteínas totales se realizan antes de la activación y desgranulación de las plaquetas. Por lo tanto, los valores anteriores se refieren únicamente al contenido de proteínas plasmáticas y no al contenido de proteínas plasmáticas más plaquetas.

30 La concentración de moléculas específicas, sean plaquetarias o plasmáticas, como IGF-1, HGF y PDGF-AB, se puede analizar de la siguiente manera. Primero, las muestras de plasma se activan agregando una solución acuosa al 10% de CaCl_2 en una proporción de 40 μL por 1 mL de plasma. Luego, la concentración de esas moléculas se mide mediante un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) comercialmente disponible siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, EE. UU.).

Usos médicos

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un plasma enriquecido en plaquetas y moléculas plasmáticas de acuerdo al segundo aspecto de la invención (a partir de ahora “plasma de la invención”) para su uso en medicina.

5

Como se mencionó anteriormente, el plasma obtenido por el método de la presente invención, posee tanto niveles concentrados de plaquetas (y por lo tanto factores de crecimiento de plaquetas) como de biomoléculas no plaquetarias, especialmente de factores de crecimiento no plaquetarios, entre los que destaca el elevado contenido en IGF-I, que tiene propiedades relacionadas con el crecimiento celular, la proliferación y la diferenciación de las células mesenquimales que crean los tejidos conectivos (músculo, vasos sanguíneos, cartílago, hueso, etc.).

10

La mayor concentración de plaquetas mejora las propiedades curativas del plasma con respecto a los plasmas en los que las plaquetas no están concentradas, como el plasma aislado directamente de la sangre.

15

En relación al plasma de la invención, los inventores han descubierto sorprendentemente que al concentrar también biomoléculas no plaquetarias, especialmente factores de crecimiento tal como el IGF-I, mediante el método de la invención, se potencia el potencial regenerativo del plasma.

20

Así, en otro aspecto más, la presente invención se refiere a un plasma enriquecido en plaquetas y moléculas plasmáticas de acuerdo al segundo aspecto de la invención para uso en medicina regenerativa.

25

El uso en medicina regenerativa se refiere más particularmente al tratamiento de tejido lesionado en un sujeto.

La presente invención se refiere igualmente a un método de tratamiento de tejido lesionado en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto plasma de la invención.

30

La presente invención se refiere igualmente al uso del plasma de la presente invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de tejidos lesionados.

35

Tal como se usa en el presente documento, el término "tratar" (o "tratar" o "tratamiento") se refiere a procesos que implican ralentizar, interrumpir, controlar, detener, reducir o revertir la progresión o la gravedad de un síntoma, trastorno, afección o enfermedad existente, pero no implica necesariamente la eliminación total de todos los síntomas, condiciones o trastornos relacionados con la enfermedad. El tratamiento de un trastorno o enfermedad puede, por ejemplo, detener la progresión del trastorno o enfermedad (p. ej., sin deterioro de los síntomas) o retrasar la progresión del trastorno o enfermedad (en caso de que la interrupción de la progresión es de naturaleza transitoria solamente). El "tratamiento" de un trastorno o enfermedad también puede conducir a una respuesta parcial (p. ej., mejora de los síntomas) o una respuesta completa (p. ej., desaparición de los síntomas) del sujeto/paciente que padece el trastorno o la enfermedad. En consecuencia, el "tratamiento" de un trastorno o enfermedad también puede referirse a una mejora del trastorno o enfermedad, que puede, por ejemplo, detener la progresión del trastorno o enfermedad o retrasar la progresión del trastorno o enfermedad. Tal respuesta parcial o completa puede ser seguida por una recaída. Debe entenderse que un sujeto/paciente puede experimentar una amplia gama de respuestas a un tratamiento.

Como se usa en el presente documento, el término "lesionado" se usa en su sentido ordinario para referirse a cualquier daño tisular, pero preferiblemente se refiere a una herida, traumatismo o úlcera.

En una realización preferida, el tejido lesionado es tejido musculoesquelético.

En una realización particular, el tejido lesionado es hueso o cartílago.

En otra realización particular, el tejido lesionado es tejido blando. El tejido blando se refiere a todo el tejido del cuerpo que no está endurecido por los procesos de osificación o calcificación como en los huesos y los dientes. En una realización más particular, el tejido lesionado se selecciona del grupo que consiste en tejido conectivo, músculo cardíaco, músculo esquelético, tejido cerebral, tejido corneal, tejido nervioso y tejido vascular.

Ejemplos de estados patológicos específicos que pueden tratarse con el plasma de la presente invención son la lesión del cartílago articular, lesión del músculo esquelético, lesión del ligamento, osteoporosis, desgaste relacionado con la edad o distrofia muscular.

En otra realización particular, el plasma de la presente invención se emplea en odontología, en particular después de una cirugía oral.

5 El plasma enriquecido en plaquetas y en moléculas plasmáticas puede funcionar como un andamio y puede usarse como un implante *per se*, para proporcionar soporte mecánico a un sitio defectuoso o lesionado *in situ* y/o para proporcionar una matriz dentro de la cual puedan proliferar y se diferenciarse las células del sitio defectuoso o lesionado.

10 El plasma de la invención puede administrarse en cualquier dosis adecuada. En algunas realizaciones, la dosis puede estar entre 1 ml y 20 ml. La dosis generalmente se determina de acuerdo con el procedimiento médico específico seguido, la condición tratada y el perfil del paciente.

15 El plasma de la invención puede administrarse por vía oral y parenteral, como intravenosa (iv), intraperitoneal (ip), subcutánea (se), intramuscular (im), rectal, tópica, oftálmica, nasal y transdérmica. El plasma de la invención puede administrarse a un sujeto que lo necesite mediante inyección utilizando una jeringa o un catéter. El plasma de la invención también puede administrarse a través de un parche dérmico, un dispositivo de pulverización o en combinación con un ungüento o injerto óseo. También se puede usar como recubrimiento en
20 suturas, stents, tornillos, placas o algún otro dispositivo médico implantable. El plasma de la invención formulado como geles u otros fluidos viscosos puede ser difícil de administrar a través de una aguja o jeringa. Por tanto, en variaciones en las que se desee el uso de una aguja o jeringa, puede ser deseable añadir un agente gelificante y/o endurecedor al plasma de la invención *in situ*.

25 El sitio de administración de la composición de PRP es típicamente el sitio del daño tisular o cerca del mismo. El sitio del daño tisular se determina mediante métodos bien establecidos que incluyen estudios de imágenes y comentarios del paciente o una combinación de los mismos. En algunos ejemplos, el plasma de la invención puede administrarse al tejido
30 conjuntivo dañado en o alrededor de las articulaciones afectadas.

Asimismo, las plaquetas desempeñan un papel regulador central en todas las fases de la inflamación y posterior cicatrización mediante la liberación, tras la estimulación, de todos estos factores de sus gránulos α . En contraste con los agentes α granulares, los mediadores
35 liberados de los cuerpos densos ejercen efectos que están más restringidos a la fase inicial de la inflamación. Por otro lado el IGF-I, que se encuentra especialmente concentrado en el

plasma de la invención, ha demostrado gran utilidad en patologías inflamatorias, tal como la osteoartritis (Wen C et al., 2021, Arthritis Research and Therapy, col 23, 277, and Mullen LM et al., 2015, Journal of materials science. Materials in medicine vol. 26,1 (2015): 5325).

- 5 Así, en otro aspecto, la invención se refiere al plasma de la invención para su uso en el tratamiento de patologías inflamatorias.

Ejemplos de patologías inflamatorias específicas que pueden tratarse con el plasma de la presente invención son la artrosis, la artritis, la tendinitis, fibrosis, bursitis, entre otras.

- 10 La presente invención se refiere igualmente a un método de tratamiento de patologías inflamatorias en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto plasma de la invención.

- 15 La presente invención se refiere igualmente al uso del plasma de la presente invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de patologías inflamatorias.

- En una realización particular, el plasma que se somete al método de la presente invención se administra al mismo paciente del que proviene la muestra de sangre anticoagulada de un sujeto de la etapa i) a partir del cual se obtuvo dicho plasma enriquecido. Dicho de otro modo, 20 en una realización particular el plasma que se somete al método de la presente invención y luego se administra al sujeto es autólogo.

- En una realización particular, el plasma que se somete al método de la presente invención se administra al diferente paciente del que proviene la muestra de sangre anticoagulada de un sujeto de la etapa i) a partir del cual se obtuvo dicho plasma enriquecido. Dicho de otro modo, 25 en una realización particular el plasma que se somete al método de la presente invención y luego se administra al sujeto procede de un donante, es alogénico.

- En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso cosmético de un plasma obtenido por el método de la presente invención. Los usos cosméticos particulares son el tratamiento de 30 arrugas de la piel, estrías u ojeras.

- El plasma de la presente invención se puede agregar a una amplia variedad de productos para aplicación cosmética, que incluyen maquillaje, cremas para limpiar, proteger, tratar o 35 cuidar la piel, en particular, la cara, las manos y los pies (por ejemplo, día y cremas de noche,

cremas desmaquillantes, cremas base y protectores solares), bases líquidas, lociones desmaquillantes, lociones corporales protectoras o para el cuidado de la piel, lociones de protección solar, lociones para el cuidado de la piel, geles o espumas, tales como limpiadores, protectores solares y bronceadores artificiales lociones, preparaciones para el baño, composiciones desodorantes, geles o lociones para después del afeitado, cremas depilatorias y composiciones para picaduras de insectos y contra el dolor. El plasma de la invención puede adoptar una amplia variedad de formas e incluir, por ejemplo, apósitos, lociones, soluciones, aerosoles, cremas, geles, ungüentos o similares.

El método de tratamiento descrito aquí es ventajoso porque requiere una preparación mínima para su uso por parte del médico.

La invención se describirá a través de los siguientes ejemplos que deben considerarse meramente ilustrativos y no limitativos del alcance de la invención.

EJEMPLOS

Descripción técnica del proceso

Para desarrollar este producto se ha seguido el siguiente proceso:

1. Se realizó una extracción de sangre del paciente utilizando tubos para extracción de volumen de 9 mL con citrato sódico al 3,8% como anticoagulante. El número de tubos depende del volumen de producto que se quiera obtener. Por ejemplo, si se quiere 6mL de plasma concentrado se necesitarán 12mL de plasma inicial y para obtener 12mL de plasma serán necesarios de 24 mL de sangre (3 tubos).
2. Los tubos de sangre se centrifugaron a 1200xg durante 8 minutos.
3. Se recogió toda la fracción de plasma sin incluir ni los glóbulos blancos ni los glóbulos rojos.
4. Se midió la concentración plaquetaria tanto en sangre como en plasma para comprobar que se mantienen en valores similares.

5. Se introdujo el plasma en un recipiente (matraz) para proceder a la evaporación con el rotavapor. Se ajustó la temperatura del baño (recipiente lleno de agua) del rotavapor a 37°C y se introdujo en él el matraz haciéndolo girar para que la muestra se distribuyera por toda la superficie y conseguir así evaporar más rápido la muestra. Finalmente, para poder proceder a la evaporación, se aplicó un vacío de -920 mbar. Tras 3-5 minutos la muestra se concentró a la mitad de su volumen inicial (de 12 mL a 6 mL). Se puede obtener un menor o mayor volumen final a mayor o menor concentración aumentando o disminuyendo el tiempo del proceso.

6. Se recogió la muestra de plasma concentrado por rotavapor (PC-RV), y se midió el número de plaquetas para calcular su concentración respecto al valor basal y confirmar que se ha duplicado la concentración plaquetaria. Además, se observó que al evaporar el agua del plasma se basificó el plasma a un pH de 8,6, en comparación con el pH fisiológico (7,4), presumiblemente por concentraron también de iones que hay en el plasma tales como sodio, calcio, magnesio, cloro, fósforo y potasio, entre otros.

7. Se ajustó el pH del plasma concentrado a pH 7,4 añadiendo un tampón de ácido clorhídrico (HCl) 0,8M en porcentaje de 2,3% (puede usarse cualquier otro tampón que acidifique la muestra). Se descubrió que ajustar el pH es imprescindible para que se dé la coagulación deseada fruto de la activación plaquetaria previa al tratamiento, y por tanto para obtener una superior proliferación celular. La cantidad de CaCl₂ empleada para la activación de la cascada de coagulación fue de 40 µL/1 mL de PC-RV.

Análisis técnico del producto obtenido

Para poder verificar que el plasma concentrado según la invención (denominado PC-RV) tiene propiedades en la regeneración tisular, se realizaron diferentes experimentos para ver si se consigue una mejoría en el tratamiento respecto a PRPs convencionales. En concreto se ha realizado una comparativa con:

1. un PRP convencional/standard denominado sPRP, obtenido mediante centrifugación y que duplica la concentración plaquetaria respecto a la sangre pero en el que la concentración de proteínas (moléculas) plasmáticas es la misma que la de la sangre.
2. un PRP enriquecido en proteínas y moléculas plasmáticas del estado de la técnica, en concreto, corresponde al divulgado en por documento WO2018206756A1, al que se ha denominado en el presente documento como PRP-MT.

A continuación se describen los experimentos realizados.

1. Datos comparativos PC-RV versus sPRP

5

Concentración de plaquetas, proteínas totales y albumina

Se ha verificado que al concentrar la muestra de plasma, se han concentrado aproximadamente el doble tanto las plaquetas, las proteínas totales y la albumina respecto a niveles basales en sangre.

10

El concentrado de plaquetas es importante para poder confirmar la obtención de un plasma rico en plaquetas. Por otro lado, la concentración de proteínas totales y albumina indica si se ha podido concentrar al doble los factores de crecimiento plasmáticos de interés.

15

En la Figura 1 se puede ver la relación de concentración de plaquetas, proteínas totales y albumina en los plasmas concentrados respecto a niveles basales en sangre.

Concentración de iones

20

Se ha visto que tener una concentración de sales/iones elevada en la muestra de plasma hace que aumente el pH y esto impide iniciar la cascada de coagulación, a no ser que se ajuste el pH y se añada el doble de concentración de CaCl_2 . En la Figura 2 se puede ver la relación de los niveles de iones que hay en PC-RV respecto al sPRP.

25

Concentración de los factores de crecimiento (ELISAs)

Con el análisis de proteínas totales se ha podido verificar que es posible concentrar el doble las proteínas presentes en el plasma. Para verificar la concentración de algunas de las proteínas de interés específicamente, se ha realizado el análisis mediante el uso de la técnica ELISA.

30

En la Figura 3 se puede ver la relación de la concentración de los diferentes factores de crecimiento respecto a valores en sPRP tras la activación plaquetaria mediante CaCl_2 .

Observando los resultados obtenidos, se concluye que el nuevo PRP, PC-RV, muestra diferencias en los niveles de factores plasmáticos con respecto al sPRP.

35

Viabilidad celular

Con el objetivo de ver si el PRP enriquecido en factores plasmáticos tiene una mayor
 5 respuesta en la proliferación celular respecto al PRP convencional/standard (sPRP), se han
 suplementado medios celulares con un 10% del suero proveniente de las diferentes
 formulaciones, tras su activación con CaCl_2 . En la Figura 4 se pueden observar una curva de
 crecimiento de fibroblastos dérmicos cultivados in vitro con medios suplementados con los
 diferentes sueros, sPRP o PC-RV. Las mediciones se realizaron cada 24h durante un total de
 10 72h. Para ello, se ha utilizado un método de medición de viabilidad celular basado en la
 luminiscencia.

En base a los resultados, se puede concluir con significancia estadística que el PC-RV
 promueve mayor crecimiento celular que el sPRP sobre los fibroblastos dérmicos. Este
 15 experimento se realizó en 5 donantes distintos, obteniendo resultados similares en todos ellos.
 Incluso en individuos que fueron malos respondedores se observó que los sueros
 concentrados presentaban una mejoría en cuanto a la proliferación (Figura 4).

A modo de validación de esto resultados, se realizaron tinciones inmunohistoquímicas para
 20 evaluar la densidad celular en las diferentes condiciones. En la Figura 5 se pueden ver varias
 imágenes en las que se han teñido fibroblastos dérmicos tras ser cultivados en medio con los
 diferentes sueros durante 72h. La tinción se ha realizado con faloidina (tinción de
 citoesqueleto) y Hoechst (tinción nuclear). En las imágenes se puede percibir mayor densidad
 celular en las células cultivadas con el PC-RV respecto al control negativo de medio sin suero
 25 y sPRP.

2. Datos comparativos PC-RV versus PRP-MT*Concentración de plaquetas, proteínas totales y albumina*

30 El PC-RV se trata de un plasma rico en plaquetas (PRP), con una concentración plaquetaria
 media de 1,7 veces (rango 1,25 - 2,53) con respecto a niveles en sangre (Figura 6). Si
 comparamos estos resultados con los obtenidos por el dispositivo más próximo en el estado
 del arte, que corresponde a un plasma enriquecido en plaquetas y en moléculas plasmáticas
 35 divulgado en la solicitud de patente WO2018/206756A1 (WO'756) y cuyo plasma hemos

denominado PRP-MT, encontramos niveles similares de plaquetas, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos sistemas.

5 Por otra parte, se han medido los niveles de proteínas totales y albúmina, siendo esto indicativo de la concentración de los factores de crecimiento plasmáticos de interés, aunque esto se confirmará mediante test específicos de ELISA, que se muestran más adelante.

10 En la Figura 7 se puede ver la relación de concentración de proteínas totales y albúmina en PC-RV con respecto a niveles basales en sangre. En este caso, el documento (WO'756) no aporta datos describiendo este aspecto.

Concentración de iones

15 En la Figura 8 se puede ver la relación de los niveles de iones que hay en el PC-RV con respecto a sangre. Así, se ha visto que el nivel de sales aumenta en tras la rotaevaporación. Sin embargo, este problema es solventado a lo largo del procesamiento de la muestra, ya que el pH del plasma rotavaporado (pH 8,4) se corrige mediante un tampón ácido, devolviéndolo al pH basal del plasma (pH 7.4). En este caso, se ha utilizado HCl 0,8M pero podría usarse cualquier otro que tampona la muestra en ese mismo rango. Además, la adición de 20% de 20 CaCl_2 permite el desencadenamiento del proceso de coagulación.

Concentración de los factores de crecimiento (ELISAs)

25 Con el análisis de proteínas totales se ha podido verificar que es posible concentrar al doble las proteínas presentes en el plasma. Para verificar la concentración de algunas de las proteínas de interés específicamente, se ha realizado el análisis de diferentes factores de crecimiento mediante la técnica ELISA. Por un lado, siendo el PC-RV un PRP, es decir, una formulación que concentra al doble las plaquetas, se quiso verificar que los factores plaquetarios se duplicaban en comparación con niveles basales. Para ello, se optó por la 30 medición del factor plaquetario PDGF-AB. Este aumentó de manera proporcional al nivel de concentración de las plaquetas.

Tras esta confirmación, se midieron dos factores plasmáticos (IGF-I y HGF) para confirmar que se concentran mediante este procesamiento, a diferencia de los PRPs convencionales, 35 donde solo se concentran los factores plaquetarios.

En la Figura 9 se puede ver la relación de la concentración de los factores de crecimiento en los diferentes sistemas (PRP-MT y PC-RV) relativos a niveles basales. IGF-I se concentró en ambos sistemas de forma proporcional al volumen de agua eliminado. Sin embargo, en PC-RV este aumento en la concentración fue estadísticamente superior. En el caso de HGF, los resultados mostraron diferencias significativas entre los dos sistemas, ya que en WO'756 se concentraban en proporción al volumen de agua eliminado y, sin embargo, en PC-RV no hubo concentración de este factor.

Estos resultados confirman que PRP-MT y PC-RV son dos productos con diferente composición, que podría generar diferencias en su bioactividad, lo cual se verificó mediante un estudio in vitro donde se midió su impacto sobre la proliferación celular.

Viabilidad celular

Con el objetivo de analizar si el PC-RV tiene una mayor respuesta en la proliferación celular respecto a PRP-MT, se suplementaron los medios celulares con un 10% del suero proveniente de las diferentes formulaciones, tras su activación con CaCl_2 . En la siguiente gráfica se puede observar el ratio de crecimiento de fibroblastos dérmicos cultivados in vitro con medios suplementados con PRP-MT y PC-RV. Las mediciones se realizaron a 0, 48 y 72h. Así, se expresaron los resultados en ratios de proliferación celular, es decir, la densidad celular a tiempo 48 o 96h frente a tiempo cero. En base a los resultados, se puede concluir que el PC-RV promueve claramente un mayor crecimiento celular que WO'756 sobre los fibroblastos dérmicos (Figura 10).

A modo de validación de esto resultados, se realizaron tinciones de inmunofluorescencia para evaluar la densidad celular en las diferentes condiciones. En la Figura 11 se pueden ver varias imágenes en las que se han teñido fibroblastos dérmicos tras ser cultivados en medio con los diferentes sueros durante 72h. La tinción se ha realizado con faloidina (tinción de citoesqueleto) y Hoechst (tinción nuclear). En las imágenes se puede observar el aumento de densidad celular en las células cultivadas con el PC-RV tras 72h (B) con respecto al inicio (A).

REIVINDICACIONES

1. Método "*in vitro*" para producir un plasma enriquecido en plaquetas y en moléculas plasmáticas que comprende:
 - i) obtener un plasma libre de glóbulos rojos a partir de una muestra de sangre anticoagulada de un sujeto, en donde el plasma comprende plaquetas y moléculas plasmáticas;
 - ii) concentrar las plaquetas y moléculas plasmáticas presentes en el plasma obtenido en el paso i) mediante evaporación;
 - iii) ajustar el pH del plasma concentrado obtenido en el paso ii) a un valor de entre 6 y 7,6, preferiblemente de entre 6,5 y 7,5; más preferiblemente a un pH de 7,4.
2. Método según la reivindicación 1, en donde en el paso i) se obtiene un plasma libre de glóbulos rojos y libre de glóbulos blancos a partir de sangre anticoagulada de un sujeto.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la evaporación se realiza por evaporación rotativa.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde durante la evaporación se somete el plasma a una temperatura de entre 30°C y 45°C, preferiblemente de entre 33°C y 40°C, más preferiblemente a 37°C.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde durante la evaporación se somete el plasma a un vacío aplicado de entre 250 y 1000 mbar, preferiblemente entre 500 y 1000 mbar, más preferiblemente de 920 mbar.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la evaporación se realiza durante un periodo de entre 1 minuto y 30 minutos.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 6, en donde el plasma libre de glóbulos rojos se obtiene mediante centrifugación a una velocidad de entre 700 y 1500 g durante entre 5 y 15 minutos de la muestra de sangre anticoagulada, y recogida del sobrenadante y de la capa leucocitaria de la muestra de sangre centrifugada.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde el plasma libre de glóbulos rojos y libre de glóbulos blancos se obtiene mediante centrifugación a una

velocidad de entre 700 y 1500 g durante entre 5 y 15 minutos de la muestra de sangre anticoagulada, y recogida del sobrenadante de la muestra de sangre centrifugada.

- 5 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende adicionalmente el paso de activar las plaquetas obtenidas en el plasma concentrado obtenido tras ajustar el pH.
- 10 10. Método según la reivindicación 9, en donde la activación de las plaquetas se realiza mediante la adición de un compuesto seleccionado de entre cloruro de calcio, trombina y colágeno.
- 15 11. Método según la reivindicación 10, en donde la activación de las plaquetas se realiza mediante la adición de cloruro de calcio.
- 15 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la concentración de plaquetas y de proteínas totales del plasma enriquecido es de al menos 1,5 veces superior a la de la muestra de sangre anticoagulada de un sujeto de la etapa i).
- 20 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la concentración de IGF-I es de al menos 1,5 veces superior a la de la muestra de sangre anticoagulada de un sujeto de la etapa i).
- 25 14. Plasma obtenido mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
- 25 15. Plasma definido en la reivindicación 14 para su uso en medicina.
- 30 16. Plasma para su uso de acuerdo con la reivindicación 15 para su uso en medicina regenerativa.
- 30 17. Plasma para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el plasma se utiliza en el tratamiento de tejidos lesionados.
- 35 18. Plasma para su uso de acuerdo con la reivindicación 15 para su uso en el tratamiento de patologías inflamatorias.
- 35 19. Plasma para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en donde el plasma se administra al mismo paciente del cual proviene la muestra de sangre anticoagulada de un sujeto de la etapa i) a partir de la cual se obtuvo dicho plasma.

- 5 20. Plasma para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en donde el plasma se administra a un paciente diferente del cual proviene la muestra de sangre anticoagulada de un sujeto de la etapa i) a partir de la cual se obtuvo dicho plasma.
21. Uso cosmético del plasma definido en la reivindicación 14.

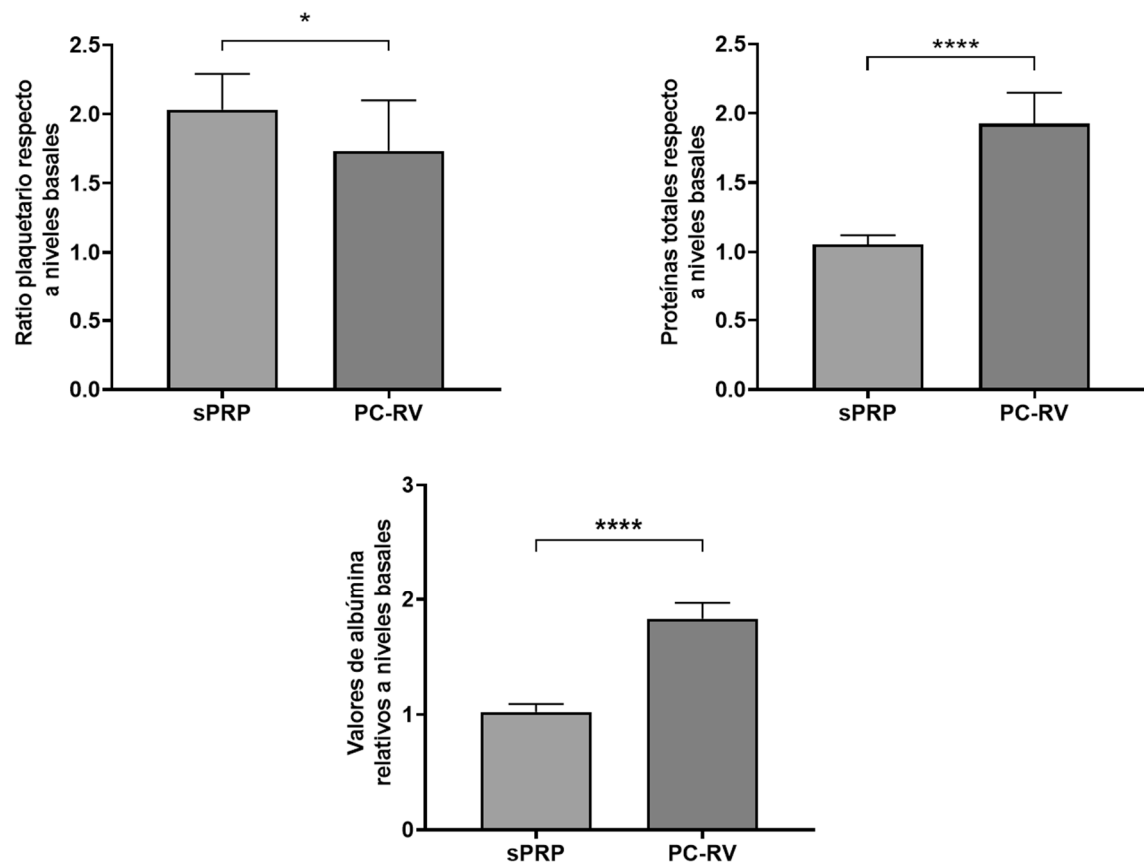


FIG. 1

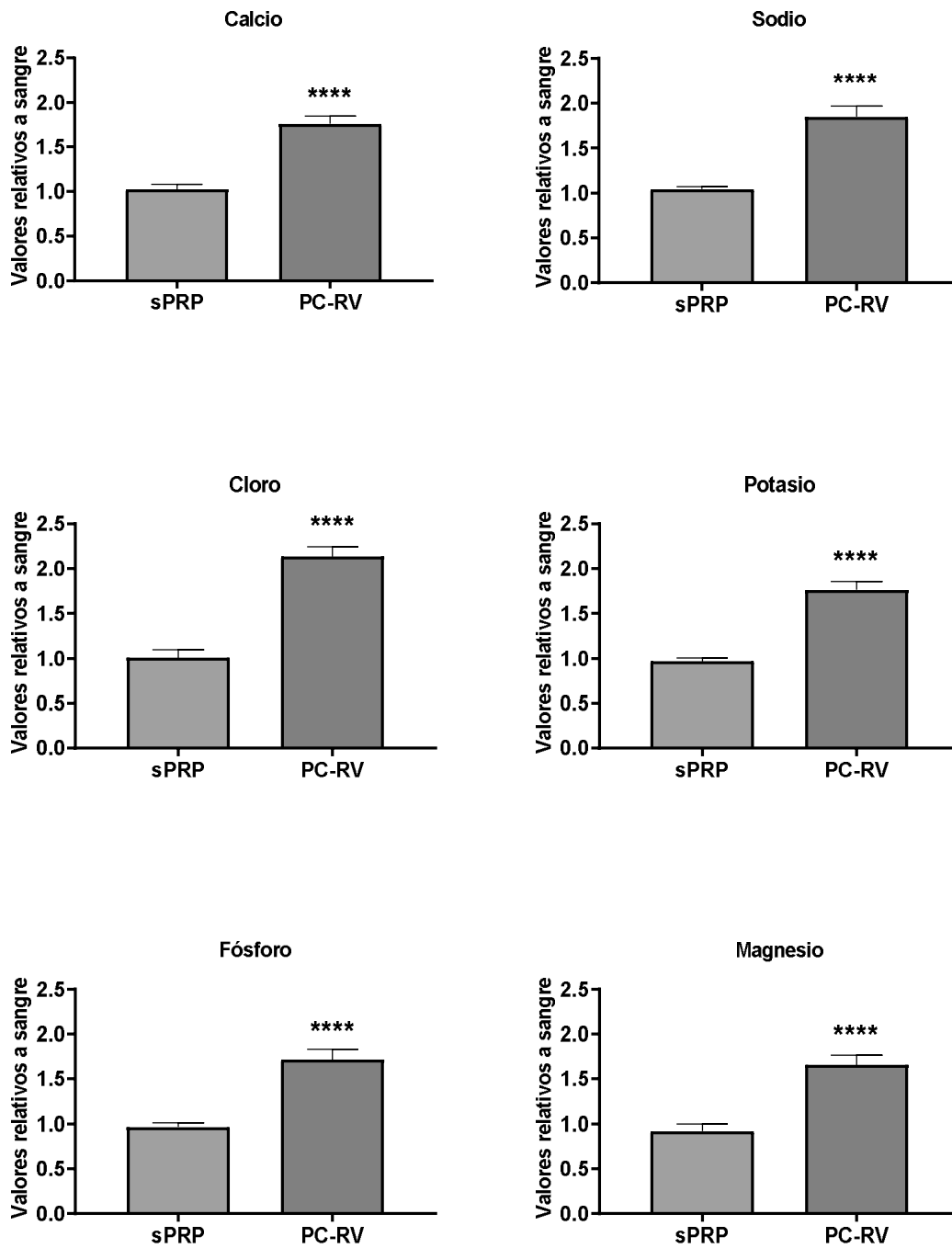


FIG. 2

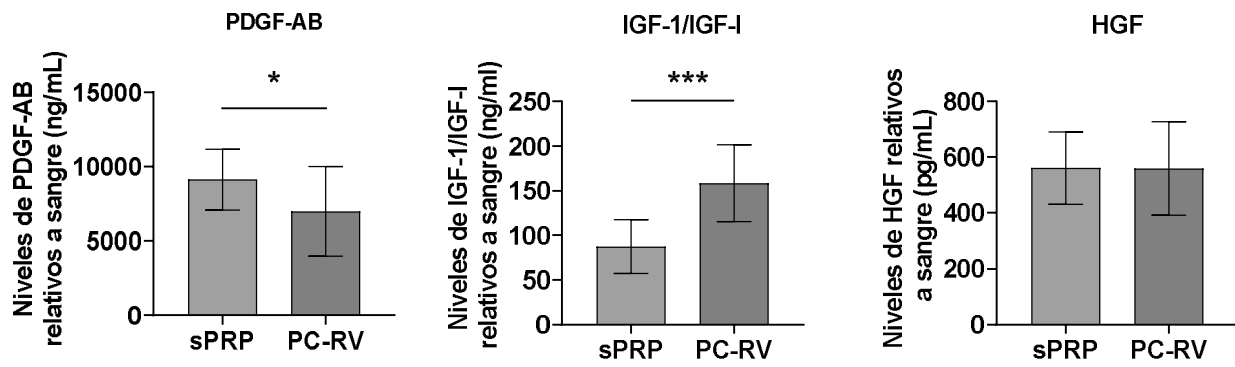


FIG. 3

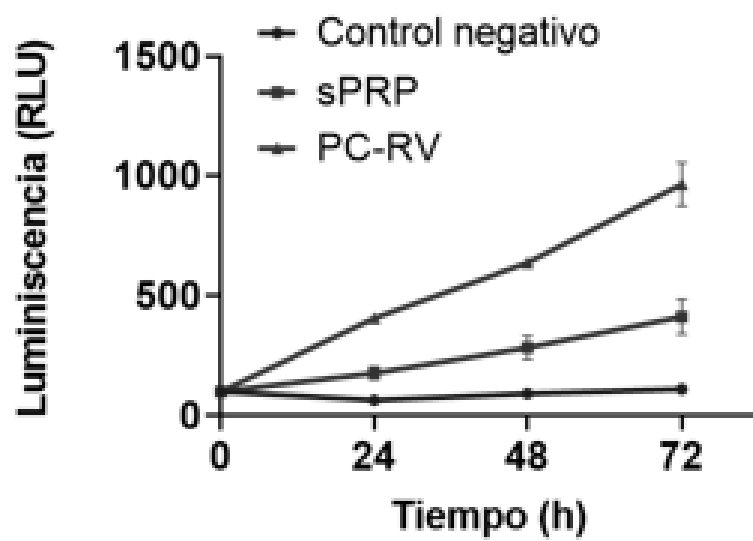


FIG. 4

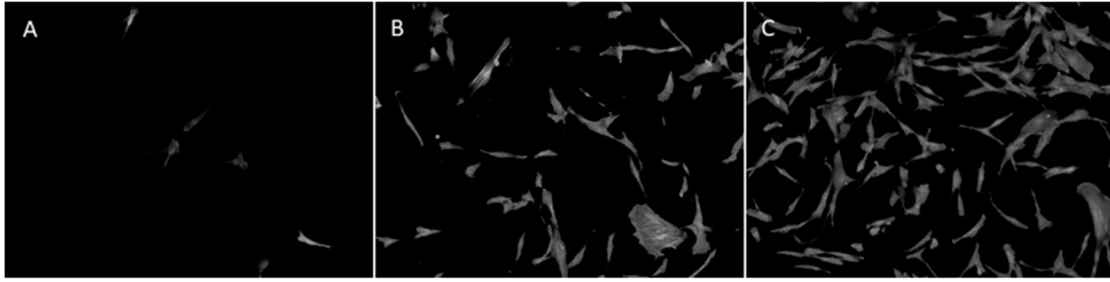


FIG. 5

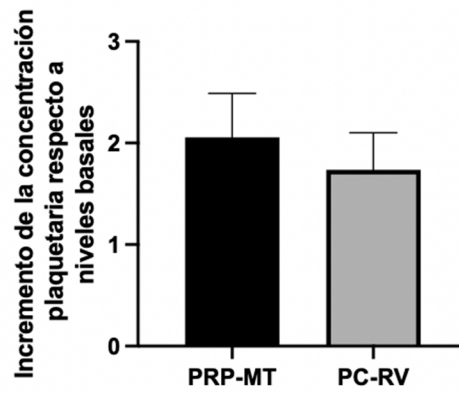


FIG. 6

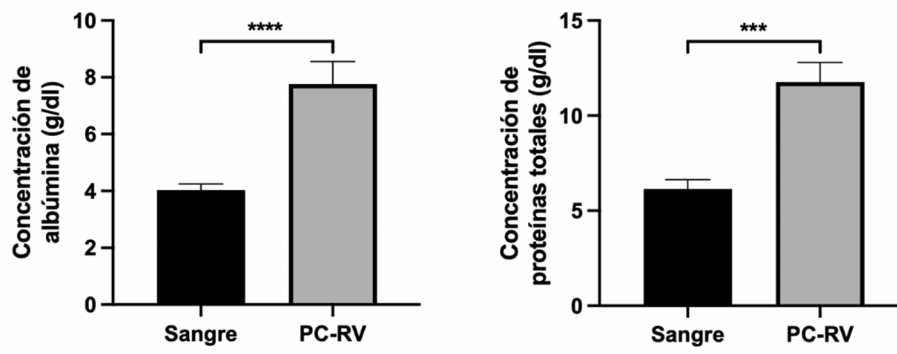


FIG. 7

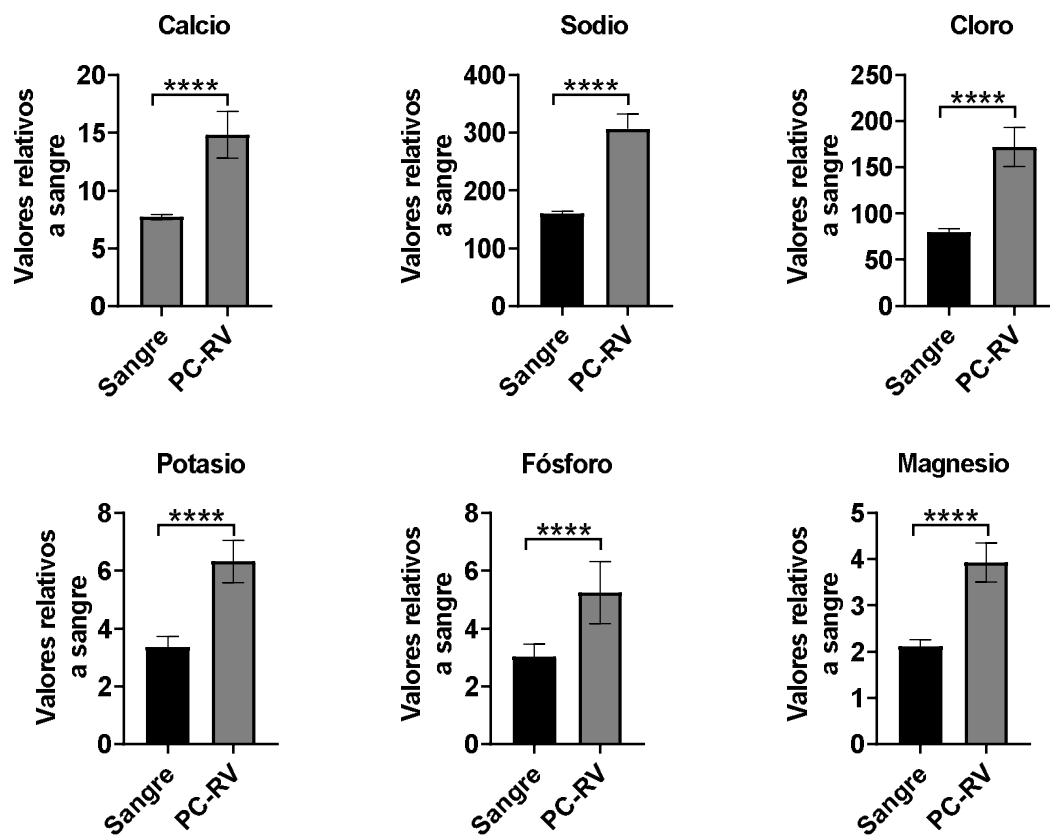


FIG. 8

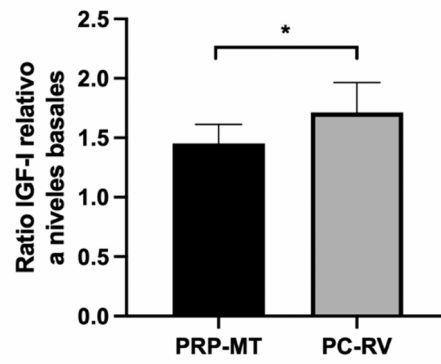


FIG. 9

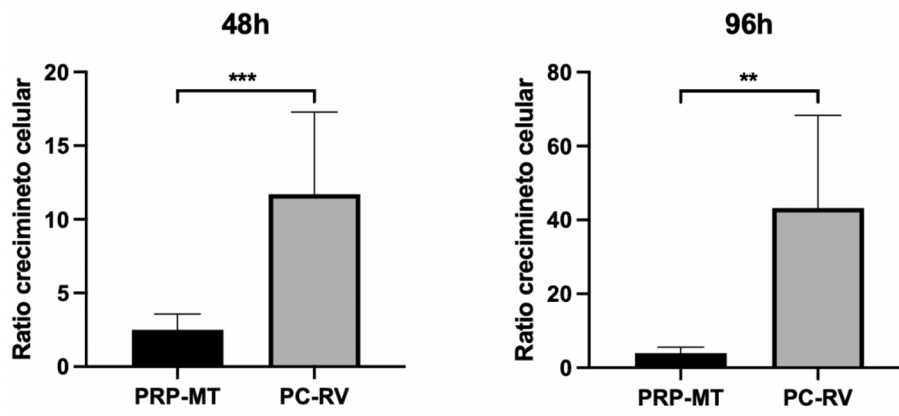


FIG. 10

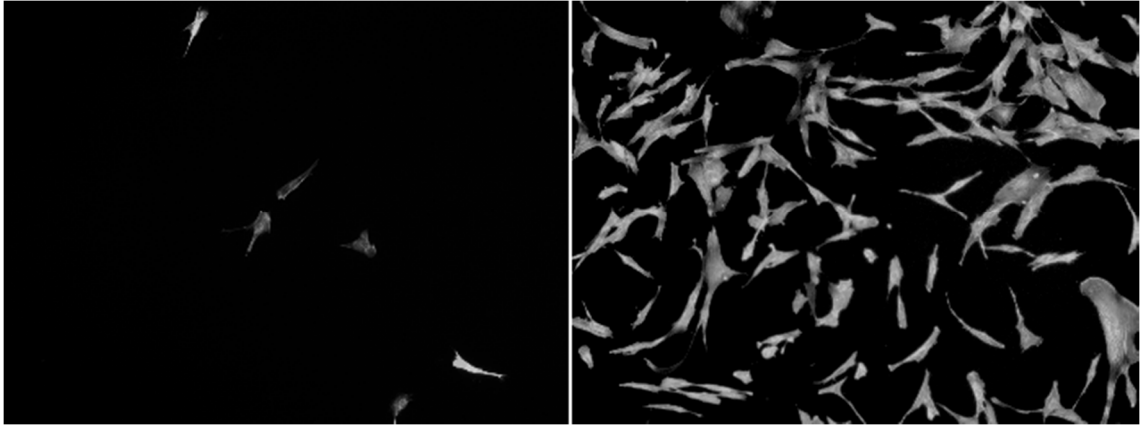


FIG. 11



- ②① N.º solicitud: 202330300
②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.04.2023
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. cl.: **A61K35/16** (2015.01)
A61K35/19 (2015.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 2020061260 A1 (ALVAREZ-PUEBLA RAMON ANGEL <i>et al.</i>) 27/02/2020, resumen; párrafos [0008]-[0027], [0080]- [0082], [0095], [0097], [0103], [0125]-[0127], [0129], [0130], [0132]-[0134], [0141], [0153], [0163]-[0174], [0195], [0210].	1-21
Y	TANG, S, S, <i>et al.</i> The effects of carbon dioxide tension and pH on platelet shape change and aggregation for human and rabbit platelet-rich plasma. Thrombosis Research. Enero 1977, Vol. 10, Nº 1, páginas 135-146, ISSN 0049-3848. Especialmente: página 135, último párrafo-página 136, primer párrafo.	1-21
A	DRAGO, L. <i>et al.</i> Plasma components and platelet activation are essential for the antimicrobial properties of autologous platelet-rich plasma: an <i>in vitro</i> study. PLoS One. Septiembre 2014, Vol. 9, Nº 9, artículo nº: e107813, ISSN 1932-6203 (print), ISSN 1932-6203 (electronic), <DOI: doi: 10.1371/journal.pone.0107813>. Especialmente: página 3, columna izquierda, tercer párrafo-página 3, columna derecha, primer párrafo; página 3, columna derecha, último párrafo- página 4, columna izquierda, primer párrafo; página 4, columna derecha, segundo párrafo.	1-21
A	WEIBRICH GERNOT <i>et al.</i> Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants. Enero-febrero 2005, Vol. 20, Nº 1, páginas 118 - 123, ISSN 0882-2786 (Print), <DOI: pubmed:15747683>. Especialmente: página 119, columna izquierda, tercer párrafo; página 119, columna derecha, segundo párrafo; página 119, columna derecha, tercer párrafo-página 120, columna izquierda, primer párrafo.	1-21

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
22.02.2024

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, NPL, INTERNET.