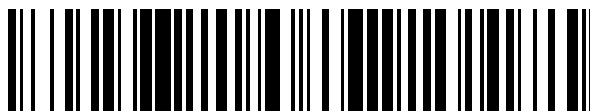


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 896 338**

51 Int. Cl.:

A61K 35/16 (2015.01)

A61L 27/36 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.02.2014** **PCT/US2014/015962**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.08.2014** **WO14126970**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2014** **E 14707886 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.08.2021** **EP 2956150**

54 Título: **Fracción de suero de fibrina rica en plaquetas**

30 Prioridad:

12.02.2013 US 201361763504 P

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

24.02.2022

73 Titular/es:

LACERTA TECHNOLOGIES INC. (100.0%)

176 Mine Lake Court Suite 100

Raleigh NC 27616-6417, US

72 Inventor/es:

LACZA, ZSOMBOR y

VACZ, GABRIELLA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 896 338 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

Fracción de suero de fibrina rica en plaquetas

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a un procedimiento de preparación de una fracción de suero aislada de fibrina rica en plaquetas y su uso médico. La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

10 ANTECEDENTES

Las plaquetas o trombocitos en los mamíferos son pequeños compartimentos similares a células conformados de forma irregular en la sangre sin núcleo, que se derivan de megacariocitos precursores. Las plaquetas desempeñan un papel fundamental en la hemostasia. Las plaquetas aisladas de sangre periférica son una fuente autóloga de factores de crecimiento. En la técnica, se han usado diversos concentrados de plaquetas para acelerar la cicatrización de tejidos blandos y la consolidación de tejidos duros.

Los concentrados de plaquetas son productos derivados de la sangre usados tradicionalmente, por ejemplo, para tratar las consecuencias de la trombopenia. Durante mucho tiempo se ha reconocido que varios componentes en la sangre forman parte del proceso de reparación natural y pueden acelerar la reparación cuando se añaden a sitios quirúrgicos.

Se forma pegamento de fibrina polimerizando fibrinógeno con trombina y calcio. Originalmente se preparaba usando plasma de donantes; sin embargo, debido a la baja concentración de fibrinógeno en el plasma, la estabilidad y la calidad del pegamento de fibrina eran bajas.

El plasma rico en plaquetas (PRP), en determinado sentido, es una modificación autóloga del pegamento de fibrina, que se ha descrito y usado en diversas aplicaciones con aparente éxito clínico. Se usa PRP obtenido de sangre autóloga para administrar factores de crecimiento en altas concentraciones al sitio de la lesión ósea o a una región que requiera aumento. El plasma rico en plaquetas (PRP) es una fuente fácilmente accesible de factores de crecimiento para reforzar la consolidación ósea y la cicatrización de tejidos blandos. Se obtiene por procedimientos que concentran plaquetas autólogas y se añade a heridas quirúrgicas o injertos y a otras lesiones que necesiten reparación reforzada o acelerada. Un coágulo sanguíneo es el foco central de iniciación de cualquier cicatrización de tejidos blandos y regeneración ósea. En todas las heridas naturales, se forma un coágulo sanguíneo y comienza el proceso de cicatrización. El PRP es una estrategia simple para concentrar plaquetas o enriquecer un coágulo sanguíneo natural, que se forma en heridas quirúrgicas normales, para iniciar un proceso de cicatrización más rápido y completo. Un coágulo sanguíneo natural contiene un 95 % de glóbulos rojos, un 5 % de plaquetas, menos de un 1 % de glóbulos blancos y numerosas cantidades de filamentos de fibrina. Un coágulo sanguíneo de PRP contiene un 4 % de glóbulos rojos, un 95 % de plaquetas y un 1 % de glóbulos blancos.

Aunque el uso de PRP en la consolidación ósea tiene una base científica sólida, su aplicación solo parece beneficiosa cuando se usa en combinación con andamios osteoconductores. Es posible que las técnicas de procesamiento agresivas y las concentraciones muy altas de PRP no mejoren los resultados de reparación. Además, existen muchas otras variables en la preparación y uso de PRP que influyen en su eficacia; el efecto de estas variables se debe entender cuando se considere el PRP como medida terapéutica.

La fibrina rica en plaquetas (FRP) pertenece a una nueva generación de concentrados de plaquetas que permiten un procesamiento y manipulación simplificados. La membrana de FRP de polimerización lenta es, en particular, favorable para reforzar el proceso de cicatrización, sin embargo, la biología detrás del efecto de la FRP todavía es, en gran medida, desconocida y solo se sugiere que el efecto se debe a que determinadas moléculas solubles muy probablemente estén atrapadas en las mallas de fibrina de FRP. También se usa FRP en combinación con aloinjerto óseo liofilizado para potenciar la regeneración ósea en la elevación del piso del seno.

Están disponibles varias técnicas para concentrados de plaquetas y su aplicación puede ser confusa porque cada procedimiento da lugar a un producto diferente con diferentes usos potenciales y en biología.

El documento WO2010/089379A1 describe la combinación de plasma rico en plaquetas (PRP) anticoagulado (soluble) con un factor de coagulación para activar el PRP cuando la combinación se administra a un paciente.

El documento US2009/0047242A1 describe una composición sanguínea acondicionada que se prepara incubando sangre en un recipiente que tiene un área de superficie específica para inducir factores y citocinas, tales como interleucina 6.

El documento WO2010/02047A1 describe un producto sanguíneo que comprende fibrina, trombocitos y leucocitos, que se obtiene por activación superficial de la coagulación sanguínea.

En el documento WO2000/062828 se describe la formación de un sellante bioadhesivo autólogo que comprende etapas de formar un plasma rico en plaquetas o plasma pobre en plaquetas que contiene un anticoagulante. No se divulga ninguna preparación de una fracción de suero líquida de FRP.

- 5 El documento WO2007/127834A2 divulga una composición de trombina obtenida poniendo en contacto sangre completa, un componente de la misma o una fracción de la misma con un agente de activación por contacto, conteniendo dicha composición de trombina un agente estabilizante, tal como etanol.

10 La terminología de estos concentrados de plaquetas, incluyendo PRP, FRP, gel de plaquetas, pegamento de fibrina y también plasma pobre en plaquetas (PPP) sigue siendo dudosa y su efecto, a pesar de los varios resultados positivos obtenidos en determinadas situaciones, es controvertido. Se sugiere una clasificación general de estos productos por Dohan *et al.* (Curr Pharm Biotechnol., junio de 2012;13(7):1131-7.).

- 15 La idea de preparación de un coágulo de fibrina rica en plaquetas (FRP) por una técnica de centrifugación provino de Choukroun y colaboradores en el año 2000 [véase Dohan *et al.*, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006; 101: E37-44 como una descripción clásica del procedimiento].

20 El procedimiento de Choukroun fue un avance importante en el campo del uso de concentrados de suero aplicados en cirugía, ya que era una matriz de fibrina natural preparada sin adición de anticoagulantes u otros materiales exógenos. En el procedimiento de Choukroun, la fibrina rica en plaquetas se prepara a 700 g o a una menor fuerza g, típicamente a 400 g [Dohan, D.M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S.L., Dohan, A.J., Mouhyi, J., y Gogly, B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 101, e37, 2006.]

- 25 El estudio de los exudados y liberados de FRP ha comenzado mucho más tarde.

30 De acuerdo con Burnouf *et al.* ["Human blood-derived fibrin releasates: Composition and use for the culture of cell lines and human primary cells", Biologicals (2012) 40(1), páginas 21-30] la centrifugación de las muestras de sangre se llevó a cabo a 700 g durante 12 minutos y el coágulo de fibrina (denominado "fibrina rica en plaquetas" se obtuvo en el medio de los tubos. En esta publicación, se prepara un liberado de FRP apretando los coágulos usando un material estéril impermeable no absorbible.

- 35 Kang, Young-Ho *et al.* ["Platelet-Rich Fibrin is a Bioscaffold and Reservoir of Growth Factors for Tissue Regeneration", TISSUE ENGINEERING: Part A, 17(3) and (4), (2011), página 349] divulgan FRP usando el protocolo de Choukroun y las muestras de sangre se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos.

40 Chien *et al.* ["Incorporation of exudates of human platelet-rich fibrin gel in biodegradable fibrin scaffolds for tissue engineering of cartilage", Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials 100B(4), página 948] usaron muestras de sangre tomadas sin anticoagulante y se centrifugaron inmediatamente a aproximadamente 400 g durante 10 min. Los exudados del coágulo de fibrina, rico en plaquetas, así obtenidos se liberaron después de colocar el coágulo sobre una superficie plana; es decir, en este caso, aparentemente no se aplicó ningún apretón ni prensado.

- 45 Cada uno de estos autores ha trabajado con el procedimiento de Choukroun en el que la fuerza de centrifugación era baja y se consideraba importante.

En la técnica no se ha propuesto ninguna aplicación de mayor fuerza g y su efecto sobre el uso y las características del producto.

- 50 La isquemia ósea o necrosis ósea isquémica (necrosis avascular, osteonecrosis, infarto óseo, necrosis aséptica) es una enfermedad en la que la muerte celular (necrosis) de los componentes óseos se debe a una interrupción del riego sanguíneo del tejido óseo. Como resultado, el tejido óseo muere; esta necrosis de la célula toca, en primer lugar, las células hematopoyéticas. Si la enfermedad afecta los huesos de una articulación, probablemente dé lugar a la destrucción de las superficies articulares de la articulación. La necrosis ósea isquémica puede estar provocada, por ejemplo, por lesión traumática, fractura o dislocación de los huesos, cadera dislocada o consumo de alcohol en exceso o uso de esteroides.

60 Tras la reperusión, se produce la reparación del hueso isquémico. Al principio, las células mesenquimales y los macrófagos migran desde el tejido óseo vivo, crecen hacia los espacios de la médula ósea muerta y, a continuación, las células mesenquimales se diferencian en osteoblastos y fibroblastos.

El posible tratamiento incluye el reemplazo del tejido muerto y/o el uso de compuestos, lo que puede reducir la tasa de degradación ósea. Sin embargo, todavía existe la necesidad de obtener materiales que faciliten la regeneración ósea después del acontecimiento isquémico.

65

Los recientes avances en la medicina regenerativa arrojan luz sobre las capacidades de diversos factores de crecimiento, que tienen efectos notables como inductores de la formación de hueso. Además de las proteínas morfogénicas óseas, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento y transformación beta (TGF-beta), factor de crecimiento insulínico (IGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) también tienen un efecto positivo sobre la regeneración ósea. Los tratamientos con un único factor están disponibles como productos recombinantes, actualmente BMP-2, -7 y PDGF tienen aprobación de comercialización, o como extractos naturales típicamente aislados de sangre venosa.

Los efectos positivos del PRP en la reparación del tejido dental y en otros casos maxilofaciales se ponen en práctica ampliamente. El PRP también se aplica para el tratamiento de otras patologías, tales como artrosis, tendinitis y lesiones nerviosas y está ganando terreno como "panacea" para muchas enfermedades del aparato locomotor. Sin embargo, el modo de acción exacto es desconocido y la percepción general del PRP es que tanto los protocolos como los resultados son altamente variables.

SUMARIO DE LA INVENCION

Un objetivo de la invención es proporcionar una preparación sanguínea mejorada, en particular, para reforzar la reparación de acontecimientos isquémicos óseos.

El objetivo se resuelve por el objeto de las invenciones como se define en las reivindicaciones adjuntas.

De acuerdo con la divulgación, en el presente documento se divulga un procedimiento de preparación de una fracción de suero aislada de fibrina rica en plaquetas (FRP), que comprende las etapas de

- a. proporcionar plasma rico en plaquetas (PRP) sin la adición de un anticoagulante;
- b. coagular el PRP para obtener un coagel de FRP; y
- c. separar el coagel para aislar la fracción de suero que comprende un liberado de plaquetas activadas.

Específicamente, las etapas del procedimiento a. y b. se pueden llevar a cabo en un procedimiento de una única etapa, por ejemplo, en el que el PRP se produce de una muestra de sangre por fraccionamiento durante el que se forma el coagel, por ejemplo, por la activación activa de la coagulación o autoactivación de la coagulación. Más específicamente, las etapas del procedimiento a., b. y c. se pueden llevar a cabo en un procedimiento de una única etapa, por ejemplo, en un sistema cerrado.

Específicamente, el PRP se prepara separando la fracción de glóbulos rojos de una muestra de sangre venosa, preferentemente en la que el PRP se coagula durante su preparación.

Específicamente, el PRP se emplea sin anticoagulantes exógenos que se usan comúnmente cuando se prepara PRP, de este modo, se obtiene una activación eficaz de plaquetas y un contenido de un liberado de plaquetas activadas en la fracción de suero aislada de acuerdo con la invención.

Específicamente, el PRP se coagula espontáneamente durante su preparación centrifugando una muestra de sangre, preferentemente acelerada tras el contacto con superficies cargadas negativamente y sin añadir activadores de coagulación exógenos.

En la técnica anterior, el PRP típicamente se producía como preparación anticoagulada, por ejemplo, de sangre o PRP extraído con anticoagulantes, tales como heparina, citrato, ácido-citrato-dextrosa (ACD) y citrato-teofilina-adenosina-dipiridamol (CTAD). Se sabía que dichos anticoagulantes preservaban las plaquetas manteniendo la integridad de las estructuras plaquetarias. Por el contrario, la presente invención se basa en la activación de plasma PRP, PRP que no contiene dichos anticoagulantes, reforzando la producción eficaz de factores de crecimiento y citocinas inestimables que se liberan por las plaquetas activadas de acuerdo con el procedimiento de la presente divulgación.

Específicamente, el coagel se separa presando, apretando, filtrando y/o centrifugando el coagel para aislar la fracción de suero que contiene la fracción líquida de FRP.

La fracción de suero de la divulgación, a continuación, en el presente documento también denominada SFRP (suero de FRP), puede incluir el sobrenadante del coagel, por ejemplo, obtenible por centrifugación, y/o la fracción líquida obtenida del coagel, por ejemplo, SFRP que consiste esencialmente en la fracción líquida. Por ejemplo, dicha fracción de suero que consiste esencialmente en la fracción líquida de FRP se prepara tras fraccionar la FRP para aislar la fracción líquida de FRP, por ejemplo, separando el coagel sólido que consiste principalmente en gel de fibrina y plaquetas. Específicamente, tras la coagulación del PRP y la formación de la FRP, el sobrenadante acelular o claro de la FRP se puede aislar o se puede retirar antes de fraccionar la FRP para aislar la fracción líquida de FRP. Dicha fracción líquida de FRP resultó que contenía la concentración más alta de liberado de plaquetas activadas y factores de crecimiento contenidos en la misma.

Específicamente, el PRP se puede obtener de una muestra de sangre de un único donante o de múltiples donantes y mezclar entre sí para obtener una única muestra de sangre. De acuerdo con un aspecto específico, el PRP se obtiene de sangre venosa extraída de un único donante.

- 5 Además, la muestra de sangre se puede obtener del mismo individuo que recibirá la fracción de suero. Por tanto, la fracción de sangre y de suero puede ser autóloga para con el receptor. Específicamente, se puede usar sangre venosa o PRP autólogo.

- 10 La muestra de sangre también se puede obtener de un individuo o donante no autólogo o de múltiples donantes. Además, la muestra de sangre se puede obtener de un individuo o donante heterólogo o de múltiples donantes. Por tanto, la muestra de sangre se puede obtener de uno o más individuos. La fracción de suero de la invención que es heteróloga se puede tratar específicamente para inactivar o retirar los virus de transmisión hemática posiblemente presentes por procedimientos de inactivación o agotamiento de virus convencionales, incluyendo el tratamiento con disolvente y detergente, pH bajo y/o nanofiltración. De forma alternativa y/o adicionalmente, la
- 15 seguridad con respecto al virus se puede garantizar seleccionando donantes adecuados que se haya determinado que no están infectados con patógenos de transmisión hemática.

- Típicamente, el volumen de dicha muestra de sangre varía entre 1 ml a 100 ml, preferentemente entre 10 ml a 40 ml, más preferentemente entre 15 ml a 35 ml.

- 20 De acuerdo con un aspecto específico, la muestra de sangre se extrae en un dispositivo de coagulación, tal como un tubo de coagulación o una jeringuilla de coagulación, opcionalmente en el que el PRP se prepara y coagula para obtener el coagel, por ejemplo, un tubo o jeringuilla de activación de coagulación, que típicamente está equipado con iniciadores o aceleradores de coagulación apropiados, denominados en el presente documento "activadores de coagulación". Por ejemplo, los tubos de coagulación típicos pueden proporcionar una superficie de
- 25 contacto cargada negativamente, tal como vidrio, que aceleraría la coagulación espontánea del PRP durante la separación de la fracción de glóbulos rojos.

- El dispositivo no solo se puede usar para extraer la sangre, sino también para preparar el PRP, por ejemplo, por centrifugación de la muestra de sangre en una o más etapas consecutivas.

- El dispositivo también puede ser adecuado para separar productos sanguíneos específicos además de la separación fisicoquímica, por ejemplo, por filtración o asignando fracciones de separación sanguínea específicas a otra cámara o cilindro del dispositivo. Opcionalmente, el PRP se prepara y coagula en o por medio de dicho
- 35 dispositivo para obtener el coagel.

- Los activadores por contacto específicamente preferentes son activadores por contacto inorgánicos, físicos y/o biológicos. De acuerdo con un aspecto específico, la coagulación se acelera o activa a través de la vía de activación por contacto, específicamente tres entrar en contacto con superficies cargadas negativamente, preferentemente
- 40 vidrio, por ejemplo, silicato, borosilicato; calomelano, polímeros de tierra de diatomeas con estructura polar, por ejemplo, acrilatos, carbonatos o poliácridamidas, específicamente aquellos que son activadores por contacto físico.

- Los activadores alternativos pueden ser biológicos o químicos, como colágeno, CaCl_2 , Ca-gluconato, MgCl_2 , tromboxano A2, ADP, trombina, D-glucosa, dextrano, glicerol. Estos activadores pueden estar presentes como un recubrimiento, microesfera o esponja porosa. El activador también puede ser una enzima o aminoácido, como
- 45 trombina, tromboplastina o factores de coagulación, por ejemplo, FIIa, FXa, FVIIa, FIXa, FXIa, FXIIa, FXIVa.

- De acuerdo con modos de realización específicos, es preferente preparar la fracción de suero por coagulación endógena del PRP, es decir, por contacto físico únicamente con superficies adecuadas, evitando, de este modo, aditivos exógenos que posiblemente contaminarían la preparación sérica. Dicha coagulación endógena proporcionaría las plaquetas activadas de forma endógena, permitiendo la extracción y el aislamiento de la fracción
- 50 líquida de FRP o la fracción de suero de la invención que contiene el liberado de plaquetas activadas obtenido de dichas plaquetas activadas sin contaminantes exógenos. Específicamente, en dicho modo de realización se evita la adición de trombina u otros factores de coagulación exógenos.

- De acuerdo con un aspecto específico, la fracción de suero está preparada recientemente sin añadir conservantes, tales como etanol, y, por ejemplo, se prepara sin ninguna etapa de almacenamiento o congelación/descongelación intermedia. Típicamente, el procedimiento de preparación se llevaría a cabo durante un corto periodo de tiempo para obtener una fracción de suero preparada recientemente, por ejemplo, un periodo de hasta 10 horas,
- 60 específicamente menos de 6 horas.

- Dicha fracción de suero está preparada, por ejemplo, lista para su uso, con el propósito de tratar a un paciente sin usar un conservante. Por tanto, se evitan los agentes estabilizantes, tales como altas concentraciones de alcohol u otros conservantes. Sin embargo, la fracción de suero preparada recientemente es estable en almacenamiento a menores temperaturas y se puede almacenar a temperaturas de refrigeración o congelar durante un periodo de
- 65

tiempo más largo, por ejemplo, a 2 °C - 12 °C durante hasta 1-24 meses, o a de -80 °C a -25 °C durante hasta 0-5 años.

Por ejemplo, una fracción de suero de la divulgación, por ejemplo, una preparación autóloga, puede estar preparada recientemente empleando procedimientos a pie de cama para extraer sangre de pacientes individuales, seguido de concentración y activación de plaquetas a través de la activación de la coagulación.

De acuerdo con un ejemplo específico, la activación de la coagulación, en el presente documento también llamada "activación de PRP", se efectúa por una etapa de incubación durante la que se forma el coagel, por ejemplo, donde se deja reposar el PRP a temperatura ambiente hasta 37 °C, preferentemente a aproximadamente 18-25 °C, durante aproximadamente 1-8 h, preferentemente aproximadamente 2-6 h.

De acuerdo con un aspecto específico, la fracción de suero comprende un liberado de plaquetas a partir de plaquetas activadas.

De acuerdo con un aspecto específico, el liberado de plaquetas está enriquecido con factores plaquetarios liberados a partir de las plaquetas activadas en comparación con el PRP. Entre los factores plaquetarios existe específicamente una serie de factores de crecimiento, citocinas, interleucinas, quimiocinas y proteínas relacionadas con la angiogénesis o factores de crecimiento.

Preferentemente, la fracción de suero contiene factores específicos y típicamente está caracterizada por un perfil específico de dichos factores, entre ellos, factores de crecimiento y citocinas. Por ejemplo, la fracción de suero contiene al menos una de las proteínas relacionadas con la angiogénesis o factores de crecimiento seleccionadas del grupo que consiste en activina-A, ADAMTS-1, angiogenina, CXCL16, DPPIV, endoglin, endostatina/colágeno XVII, FGF-4, GM-CSF, HB-EGF, HGF, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IL-1 β , IL-8, LAP (TGF β -1), leptina, MCP-1, MMP-8, MMP-9, NRG1- β 1, pentraxina-3, PD-ECGF, PDGF-AB/PDGF-BB, PIGF, prolactina, TIMP-4, trombospondina-1, uPA, por ejemplo, a un nivel similar (tal como una diferencia de un 10 %, un 15 % o menos de un 20 %) o diferente (tal como un cambio de al menos un 20 %) en comparación con PRP o sangre completa, por ejemplo, medidas por una matriz de Proteome Profiler, ELISA o ensayos similares. Específicamente, al menos 2 de estos factores están presentes, o al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, o incluso más, al menos 15, 20, 25 o hasta todos estos factores están presentes.

Específicamente, uno o más de estos factores están enriquecidos en la fracción de suero de la invención. El enriquecimiento de los factores específicos típicamente se determina si la concentración se incrementa en al menos un 20 %, 30 %, 40 % o 50 %, o incluso se incrementa al menos un 100 %, o al menos 2 veces, al menos 3 veces, o al menos 4 veces, en comparación con PRP o sangre completa.

Específicamente, la fracción de suero está enriquecida con al menos una de las proteínas relacionadas con la angiogénesis o factores de crecimiento seleccionadas del grupo que consiste en factor plaquetario 4, serpin E1 o TIMP-1, en comparación con PRP o sangre completa, por ejemplo, medidas por una matriz de Proteome Profiler, ELISA o ensayos similares. Específicamente, la fracción de suero está enriquecida con uno, dos o los tres de estos factores seleccionados.

De acuerdo con otro modo de realización específico, la fracción de suero está caracterizada específicamente por una concentración de factor plaquetario 4 incrementada en comparación con PRP o sangre completa, por ejemplo, enriquecida al menos 2 veces, preferentemente al menos 3 veces, al menos 4 veces o 5 veces, medida por un Proteome Profiler, ELISA o ensayos similares.

Específicamente, uno o más de estos factores están agotados en la fracción de suero de la invención, es decir, se reduce el contenido o concentración. Específicamente, la fracción de suero está agotada en al menos una de las proteínas relacionadas con la angiogénesis o factores de crecimiento seleccionadas del grupo que consiste en SDF-1, angiopoyetina-1, EGF, PDGF, VEGF, en comparación con PRP o sangre completa, por ejemplo, medidas por una matriz de Proteome Profiler, ELISA o ensayos similares.

De acuerdo con un modo de realización específico, la fracción de suero está caracterizada por una concentración disminuida de factor derivado de células estromales 1 (SDF-1, CXCL 12) en comparación con PRP o sangre completa. Específicamente, la concentración de SDF-1 medida es menor de 350 pg/ml, preferentemente menor de 275 pg/ml medida por ELISA.

De acuerdo con otro modo de realización específico, la fracción de suero está caracterizada por una concentración de angiopoyetina-1 disminuida en comparación con PRP o sangre completa.

De acuerdo con otro modo de realización específico, la fracción de suero está caracterizada por una concentración de factor de crecimiento epidérmico (EGF) disminuida en comparación con PRP o sangre completa.

De acuerdo con otro modo de realización específico, la fracción de suero está caracterizada por una concentración de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) disminuida en comparación con PRP o sangre completa.

5 De acuerdo con otro modo de realización específico, la fracción de suero está caracterizada por una concentración de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) disminuida en comparación con PRP o sangre completa.

Específicamente, la fracción de suero está caracterizada por el agotamiento o reducción de dos, tres, cuatro o los cinco de estos factores agotados, por ejemplo, en la que uno de estos es al menos SDF-1 o sangre completa.

10 El agotamiento, es decir, la disminución o reducción de los factores específicos típicamente se determina, si el contenido o concentración es menor de un 50 %, o menor de un 40 %, o menor de un 30 %, o menor de un 20 %, o menor de un 10 %, o menor de un 5 % (p/p) de la concentración o contenido en comparación con PRP o sangre completa, por ejemplo, medido por un Proteome Profiler, ELISA o ensayos similares.

15 Específicamente, la fracción de suero está agotada o libre de glóbulos rojos, por ejemplo, carece sustancialmente de glóbulos rojos, de modo que se retira más de un 75 %, preferentemente más de un 95 %, en comparación con la sangre completa.

20 De acuerdo con un modo de realización específico, la fracción de suero está caracterizada además por un contenido reducido de plaquetas en comparación con sangre completa, por ejemplo, reducido 10 veces, preferentemente 20 veces. Tras la separación de la coagel, la fracción de suero típicamente contiene menos de 50×10^9 g/l plaquetas, preferentemente menos de 10×10^9 g/l.

25 De acuerdo con un modo de realización específico, la fracción de suero está caracterizada además por un contenido reducido de fibrinógeno (por ejemplo, determinado por el contenido de fibrinógeno más fibrina) en comparación con sangre completa, por ejemplo, menor de un 20 %, o menor de un 10 %, o menor de un 5 % (p/p). Tras la separación del coagel, la fracción de suero típicamente contiene menos de 1,5 g/l de fibrinógeno + fibrina, preferentemente menos de 0,5 g/l. Típicamente, la fracción de suero es una solución transparente u opaca sin masa sólida, por ejemplo, sin un coágulo de fibrina visible a simple vista.

30 De acuerdo con un aspecto específico, la fracción de suero está preparada recientemente y lista para su uso, opcionalmente en la que la fracción de suero se proporciona en un dispositivo de aplicación, específicamente una jeringuilla. Los modos de realización específicos se refieren a una fracción de suero autóloga, es decir, una fracción de suero preparada de sangre o PRP de un único donante individual, que está lista para su uso para su administración al mismo individuo. La fracción de suero se puede preparar convenientemente en un dispositivo de preparación apropiado para la extracción aséptica de sangre, preparando el PRP, coagulando el PRP (por ejemplo, iniciando activamente la coagulación o por autoactivación), separando el coagel y opcionalmente separando además la FRP sólida para aislar la fracción de suero con o sin la fracción líquida de FRP, o para aislar la fracción de suero del coagel de FRP. Específicamente, el dispositivo de preparación es adecuado para la extracción aséptica de sangre y la preparación del PRP mientras se autoactiva, después de lo que se forma un coagel, y, a continuación, se separa el coagel de FRP y se obtiene el sobrenadante del coagel conjuntamente con la fracción líquida de la FRP.

45 La fracción de suero aislada se puede producir en el dispositivo de aplicación de manera aséptica y convenientemente se puede administrar directa e inmediatamente al individuo, por ejemplo, por un aplicador conectado de forma aséptica al dispositivo de preparación, o por un dispositivo de aplicación o kit separado que permita la transferencia aséptica de la fracción de suero preparada al dispositivo de aplicación y/o administrar la preparación al individuo.

50 De acuerdo con la divulgación, se proporciona específicamente la fracción de suero para su uso en la fabricación de un producto farmacéutico o medicinal autólogo. Dicho producto puede estar en forma de preparación farmacéutica o preparación para dispositivo médico.

55 Específicamente, la fracción de suero se proporciona para el tratamiento del donante de la fracción de suero. Específicamente, es preferente el uso autólogo de la fracción de suero.

Específicamente, la divulgación proporciona el uso medicinal, por ejemplo, para su uso medicinal plástico, reconstructivo o regenerativo, específicamente para su uso en el tratamiento ortopédico, quirúrgico y/o cosmético.

60 Específicamente, la fracción de suero se usa para tratar a un paciente que padece osteonecrosis, por ejemplo, cabeza del fémur, Köhler I y II, Perthes, Schlatter-Osgood o Scheuermann, artrosis, osteoartrosis, necrosis ósea, tendinosis, por ejemplo, epicondilitis, fascitis plantar o tendinosis rotuliana, isquemia crítica de las extremidades, enfermedad de Buerger, síndrome de pinzamiento, por ejemplo, del hombro o la cadera, o un paciente que está sometido a tratamiento para el relleno dérmico, rejuvenecimiento de la cresta nasolabial o cualquier otra arruga facial, implante o injerto óseo.

65

La fracción de suero induciría específicamente la proliferación después de la isquemia en explantes de material osteonecrótico humano. Específicamente, cuando la fracción de suero se mezcla con injertos óseos *in vitro* o *in situ*, se podría determinar la regeneración del material óseo.

5 Específicamente, la divulgación proporciona el uso de la fracción de suero autóloga, por ejemplo, extrayendo una muestra de sangre de un paciente que padece o ha padecido un trastorno o afección, y a quien se administra la preparación.

10 En términos generales, la invención proporciona específicamente la fracción de suero de la invención para su uso médico. En consecuencia, la divulgación se refiere además a un procedimiento de tratamiento de un paciente que lo necesita con una cantidad eficaz de la fracción de suero. Dicha cantidad eficaz típicamente es una cantidad suficiente para tratar, reparar o aumentar células o tejidos, por ejemplo, tratamiento local o tópico en un sitio diana que necesita proliferación o regeneración celular, por ejemplo, piel, una herida, una lesión, una incisión o un sitio quirúrgico.

15 Específicamente, se proporciona la fracción de suero para su uso en el tratamiento de un paciente que padece o ha padecido isquemia ósea o una enfermedad ósea relacionada, incluyendo necrosis ósea, osteoartritis u artritis, u otra enfermedad ósea degenerativa. Específicamente, se proporciona la fracción de suero para su uso para facilitar o acelerar la propagación de las células del tejido óseo y, de este modo, la regeneración del tejido óseo
20 después de isquemia ósea, o para su uso en el tratamiento de isquemia ósea o cualquier enfermedad relacionada o una enfermedad que sea consecuencia de isquemia ósea o una enfermedad mediada por isquemia ósea.

25 En consecuencia, la divulgación proporciona además un procedimiento para el tratamiento de un paciente que padece o ha padecido artritis, osteoartritis, necrosis ósea, isquemia ósea o una enfermedad como se define en el presente documento, que comprende las etapas de administrar una fracción de suero a dicho paciente.

30 Específicamente, la divulgación proporciona un procedimiento para facilitar o promover la propagación de las células del tejido óseo y, de este modo, la regeneración del tejido óseo, que comprende las etapas de administrar la fracción de suero a un tejido óseo con o que haya sufrido isquemia ósea, opcionalmente a un paciente que padece o ha padecido artritis, osteoartritis, necrosis ósea o isquemia ósea.

35 De acuerdo con la divulgación, se proporciona además un procedimiento de promoción de la proliferación *in vitro* de células poniendo en contacto una fracción de suero con dichas células e incubando dichas células durante un periodo de tiempo suficiente para promover el crecimiento o la regeneración celular, específicamente en el que las células son células epiteliales, células madre o células óseas, por ejemplo, osteocitos, osteoclastos, osteoblastos o células derivadas de la médula ósea, tales como células madre mesenquimales y células progenitoras derivadas de ellas. Dicho tratamiento *in vitro* es específicamente útil para preparar material óseo autógeno o aloinjertos.

40 Específicamente, la fracción de suero se proporciona para su uso *in vitro* como aditivo de cultivo celular o para preparar huesos o implantes, por ejemplo, implantes metálicos, específicamente por tratamiento o recubrimiento superficial. Por ejemplo, se usa la fracción de suero en la preparación de soportes para injertos óseos dentales.

45 Los procedimientos de tratamiento específicos de acuerdo con la divulgación, *in vitro* o bien *in vivo*, se referirían a restaurar la capacidad de proliferación del hueso posisquémico, promover eficazmente la vascularización y/o angiogénesis en el tejido en regeneración, o promover la migración y/o infiltración del componente de cicatrización de heridas endógena, tal como, por ejemplo, incluir células periosteogénicas, células angiogénicas, células estromales, células mesenquimales, células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteoclastos o plaquetas. Los procedimientos de tratamiento específicos se refieren a hueso, periostio, tendón, músculo, fascia, tejido nervioso, tejido vascular y combinaciones de los mismos.

50 De acuerdo con la divulgación, se proporciona además una preparación farmacéutica que comprende la fracción de suero y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 Específicamente, la preparación farmacéutica comprende además una sustancia activa adicional y/o dispositivo para promover la cicatrización de heridas, proliferación o regeneración celular.

60 Específicamente, la sustancia activa adicional es un hidrogel, un sellante tisular o un componente activo del mismo, por ejemplo, un agente de gelificación que forma un hidrogel tras el contacto con la fracción de suero de la invención, un componente de sellante tisular que comprende fibrinógeno y/o colágeno, y/o un componente sellante tisular que comprende trombina o protrombina en combinación con un activador de protrombina para generar trombina. Específicamente, el dispositivo es un biomaterial sólido o semisólido o similar a gel adecuado para su uso en seres humanos (resorbible o no resorbible), por ejemplo, un material de injerto óseo, por ejemplo, incluyendo material óseo autógeno, aloinjertos, tales como material óseo liofilizado desmineralizado, o aloplastos, tales como hidroxiapatita y fosfato tricálcico de origen sintético o natural.

65

Específicamente, la preparación farmacéutica se proporciona lista para su uso, por ejemplo, contenida en un dispositivo de aplicación, en particular, una jeringuilla.

De acuerdo con la divulgación, se proporciona además un kit de aplicación que comprende los componentes

- a. la fracción de suero y
- b. un dispositivo de aplicación, específicamente una jeringuilla.

Específicamente, el kit puede incluir otros componentes o combinaciones, por ejemplo, como otro componente.

- c. un material de injerto óseo, un agente gelificante, un sellante tisular o un componente activo del mismo; y
- d. opcionalmente un dispositivo para mezclar los componentes a. y c. para obtener una mezcla lista para su aplicación.

FIGURAS

Figura 1. Protocolo de isquemia simulada y reperfusión en explantes de hueso humano. Se aislaron fragmentos de tejido óseo el día 0 en procedimientos de artroplastia total de cadera y se mantuvieron en cultivo durante 3 días. Las células se sometieron a daño a través de privación de oxígeno y glucosa (POG) durante 7 horas el día 3, seguido del reemplazo del medio de células madre normal y un retorno de los niveles de oxígeno a la normalidad. Se añadieron fracciones de suero a los cultivos sometidos a explante justo antes de la POG y se reemplazaron en los cambios de medio cuando fue necesario hasta el final del experimento. La viabilidad celular se midió al 6.º o bien 9.º día reemplazando los tejidos en un pocillo nuevo y midiendo, por tanto, solo las células en la matriz ósea.

Figura 2. Efecto del tratamiento con PRP sobre explantes óseos después de POG. Los paneles A y B muestran que ni PRP ni PRP heparinizado tienen ningún efecto sobre la viabilidad celular después de 3 o 6 días de reperfusión (n=24/grupo). El panel C muestra que el incremento de la concentración de PRP al nivel máximo técnicamente factible sin afectar a la preparación natural todavía no tiene ningún efecto sobre la proliferación. El PRP activado por diferentes maneras, tales como añadir calcio, calcio + trombina, o someter a la preparación a 3 ciclos de congelación y descongelación tampoco tuvo efecto (panel D). Los datos se presentan como promedio $\pm$ EEM.

Figura 3. Efecto de SFRP sobre explantes óseos después de POG. El panel A muestra que no existe ningún efecto inmediatamente después de 7 horas de POG (n=18-24/grupo), pero las células comenzaron a proliferar significativamente mejor después de 6 días. El panel B muestra el efecto del pretratamiento con SFRP cuando la fracción de suero estaba presente en el medio desde el día 0 (n=24/grupo). Los datos se presentan como promedio $\pm$ EEM, ** representa $p < 0,01$, *** representa $p < 0,001$.

Figura 4. Constituyentes de fracciones de suero medidos por la matriz de Proteome Profiler. Los niveles de proteína se miden por la intensidad de los puntos en unidades arbitrarias, comparadas entre SFRP y PRP. Los datos se dividen entre los paneles A y B para mayor legibilidad. Los datos se presentan como promedio $\pm$ EEM, n=3 sujetos, cada punto se mide por duplicado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

El término "coagulación", como se usa en el presente documento en relación con la coagulación sanguínea, se entiende en el presente documento de la siguiente manera. La activación de plaquetas y posterior desgranulación y agregación desempeñan un papel fundamental en la coagulación sanguínea. La coagulación se puede activar a través de la "vía de activación por contacto" o intrínseca que se inicia cuando el factor XII de coagulación sanguínea entra en contacto con superficies cargadas negativamente en una reacción que implica un cininógeno de alto peso molecular y calicreína plasmática. Se puede activar FXII por los llamados "activadores por contacto", por ejemplo, los constituyentes macromoleculares biológicos de la matriz subendotelial, tales como glucosaminoglucanos y colágenos, sulfátidos, nucleótidos y otros polianiones solubles o material no fisiológico, tal como vidrio o polímeros, en particular, superficies cargadas negativamente artificiales, tales como microesferas de vidrio. Además, la cascada de coagulación refuerza el proceso de coagulación sanguínea. La cascada de coagulación implica una serie de reacciones, es decir, una cascada, en las que se activa un zimógeno, por ejemplo, por enzimas soportadas por cofactores, para convertirse en una enzima activa que, a continuación, cataliza la siguiente reacción en la cascada de reacciones, lo que, a la postre, da como resultado la formación de un coágulo de fibrina, que fortalece el agregado plaquetario. Los zimógenos también son conocidos como factores de coagulación.

Como resultado de la activación de la coagulación, se forma un coágulo sanguíneo, que en el presente documento se denomina "coagel". Un coagel se entiende específicamente como la fase coagulada de la sangre, es decir, la masa blanda, coherente y gelatinosa que resulta de la conversión de fibrinógeno en fibrina que consiste principalmente en fibras de fibrina asociadas para formar un gel o coágulo de fibrina. El coagel como se describe en el presente documento específicamente atrapa plaquetas y otros componentes del plasma coagulado.

El coagel emanado del PRP se entiende específicamente como fibrina rica en plaquetas (FRP) que puede incluir específicamente fibrina agregada y glóbulos sanguíneos, tales como plaquetas, glóbulos blancos y/o glóbulos rojos.

En el presente documento se entiende que el coagel de FRP está compuesto por dos fracciones, la fracción líquida y la fracción sólida, que se pueden separar físicamente para aislar la fase líquida y descartar la masa sólida.

- 5 La coagulación se activa específicamente en un recipiente adecuado, tal como un recipiente de coagulación o un recipiente de activación de coagulación, por ejemplo, un tubo. El recipiente es adecuadamente un recipiente de vidrio o de plástico, con o sin medios adicionales para iniciar o acelerar la coagulación, por ejemplo, tubos de extracción de sangre usados, en general, en la práctica médica.
- 10 En particular, el recipiente de coagulación no contiene ningún anticoagulante, y se usa sin añadir anticoagulantes, para así reforzar la coagulación *in situ*. De acuerdo con un modo de realización específico, el recipiente de coagulación está adecuadamente equipado con superficies de activación por contacto para activar la vía de coagulación intrínseca.
- 15 En el presente documento se entiende que el término "plasma rico en plaquetas" o PRP como un volumen de plasma que tiene una concentración de plaquetas por encima del valor de referencia. Los recuentos plaquetas normales en sangre varían entre 150.000/microlitro y 350.000/microlitro. La concentración de plaquetas se incrementa específicamente por centrifugación y/o de otro modo fraccionamiento o separación de la fracción de glóbulos rojos, por ejemplo, centrifugación de sangre completa, en primer lugar, por un centrifugado suave, tal como 8 min a 460 g, y la capa leucocítica se usa o sedimenta además por un centrifugado fuerte a mayores valores de g. El PRP típicamente comprende una concentración de plaquetas incrementada, que es aproximadamente un incremento de 1,5 - 20 veces en comparación con la sangre venosa.
- 20 Dicha centrifugación y/o fraccionamiento separará los glóbulos rojos de la sangre y separará además la fracción rica en plaquetas (PRP) que incluye plaquetas, con o sin glóbulos blancos conjuntamente con algunos glóbulos rojos del plasma pobre en plaquetas. El PRP se puede concentrarse además por ultrafiltración, donde el contenido de proteínas del plasma rico en plaquetas se concentra de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 20 %.
- 25 El PRP se puede activar por el procedimiento que se describe en el presente documento, en particular, por coagulación, que activa específicamente las plaquetas contenidas en el PRP en ausencia de aditivos anticoagulantes exógenos. La presente invención proporciona específicamente la activación de PRP, por ejemplo, de modo que la mayoría de las plaquetas se activen. Por tanto, al menos un 50 % de las plaquetas en el PRP se activan a través de la activación de la coagulación.
- 30 El término "administración" como se usa en el presente documento incluirá vías de introducción o aplicación de una preparación activada, tal como la fracción de suero de la invención, a un sujeto que lo necesite para realizar su función pretendida.
- 35 Las vías de administración preferentes son local, incluyendo aplicación tópica o mucosa, o aplicación al sitio de una herida o a un sitio de intervención (quirúrgica), tal como usando un líquido, pulverizador, hidrogel, crema o pomada, o por cualquier otra vía conveniente, incluyendo administración sistémica, por ejemplo, inyecciones, tales como inyecciones subcutáneas o intrarticulares, por inyección en las capas de la piel, por debajo de la piel en la epidermis, en el panículo adiposo, músculos de diversos tejidos blandos, en el hueso trabecular y médula ósea,
- 40 pulverizada sobre superficies tisulares, mezclada con líquidos corporales, etc.
- 45 Se pueden usar diversos sistemas de administración conocidos, incluyendo jeringuillas, agujas, tubos, bolsas, etc. Los sistemas de administración específicos emplean parches para administración tópica o implantes. Son específicamente preferentes las preparaciones de liberación lenta, por ejemplo, en forma de un hidrogel, un gel semisólido o sólido o formulaciones y sistemas de administración para proporcionar el tratamiento de acción prolongada.
- 50 La fracción de suero se puede administrar sola o en combinación o junto con otro agente o bien cualquier otro tratamiento terapéutico usado en la indicación, por ejemplo, usado para tratar pacientes que padecen artrosis, osteoartritis, necrosis ósea o isquemia ósea. La fracción de suero se puede administrar antes de la administración del otro agente, simultáneamente con el agente, o después de la administración del agente. Un sistema de administración alternativo proporciona la fracción de suero asociada o unida a un material vehículo, por ejemplo, un gel o un implante.
- 55 El término "aislada", como se usa en el presente documento con respecto a una fracción de suero, se referirá a dicha fracción de sangre, plasma o suero que se ha separado lo suficiente de otras fracciones o hemoderivados con los que se asociaría naturalmente. En particular, la fracción de suero de la invención se aísla para separarla del coagel de FRP y/o de la fracción sólida del coagel de FRP. "Aislada" no significa necesariamente la exclusión de mezclas artificiales o sintéticas con otras fracciones, compuestos o materiales, o la presencia de impurezas que no interfieran con la actividad fundamental. En particular, las sustancias activas y los materiales quirúrgicos se pueden combinar con la fracción de suero aislada de la invención.
- 60
- 65

El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento se referirá específicamente a todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles con una fracción de suero proporcionada por la invención. Otros ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen agua estéril, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de cualquiera de los mismos. En uno de dichos aspectos, una fracción de suero se puede combinar con uno o más vehículos apropiados para una vía de administración deseada. Dichos vehículos y modos de administración son bien conocidos en las técnicas farmacéuticas. Un vehículo puede incluir un gel o hidrogel, o agente de gelificación o agente gelificante, un material de liberación controlada o un material con retardo temporal, u otros materiales bien conocidos en la técnica.

Son conocidos en la técnica vehículos farmacéuticamente aceptables adicionales y se describen, por ejemplo, en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES. Las formulaciones líquidas pueden ser soluciones, emulsiones o suspensiones y pueden incluir excipientes tales como agentes de suspensión, solubilizantes, tensioactivos, conservantes, agentes gelificantes y quelantes. Se pueden proporcionar formulaciones ejemplares, por ejemplo, como un hidrogel que incluya más de un 50 % de agua en peso.

En un modo de realización, la fracción de suero de la presente divulgación es el único agente terapéuticamente activo administrado a un sujeto, por ejemplo, como monoterapia que modifica o previene una enfermedad.

En otro modo de realización, la fracción de suero de la presente divulgación se combina con otros agentes activos o materiales, por ejemplo, combinados en una mezcla o kit de partes.

La fracción de suero de la presente divulgación se puede administrar en combinación con uno o más de otros agentes activos o pautas terapéuticas o profilácticas, incluyendo, pero sin limitarse al tratamiento estándar, por ejemplo, antibióticos, inhibidores de la inflamación esteroideos y no esteroideos, agentes antiinflamatorios, vitaminas o minerales.

El término "sujeto" o "individuo" como se usa en el presente documento se referirá a un mamífero de sangre caliente, en particular, a un ser humano. En particular, el uso médico de la invención o el respectivo procedimiento de tratamiento se aplica a un sujeto que necesita profilaxis o tratamiento de un trastorno o afección, por ejemplo, asociado con tejido dañado, una herida, una lesión, una quemadura, una incisión o un acontecimiento isquémico, tal como artrosis, osteoartritis, necrosis ósea o isquemia ósea, o que padece dicha enfermedad. El término "paciente" incluye seres humanos y otros sujetos mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o bien terapéutico. Por tanto, el término "tratamiento" pretende incluir tanto el tratamiento profiláctico como terapéutico, en particular, para tratar, reparar o aumentar un tejido en un sitio diana.

Las propiedades biológicas de la fracción de suero o las respectivas preparaciones farmacéuticas de la divulgación pueden estar caracterizadas *ex vivo* en experimentos con células, tejidos y organismos completos. Como se sabe en la técnica, los fármacos a menudo se someten a prueba *in vivo* en animales, incluyendo, pero sin limitarse a, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y monos, para medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento frente a una enfermedad o modelo de enfermedad, o para medir la farmacocinética, farmacodinámica, toxicidad y otras propiedades de un fármaco. Los animales se pueden denominar modelos de enfermedad. La fracción de suero y las respectivas composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden someter a prueba además en seres humanos para determinar su eficacia terapéutica o profiláctica, toxicidad, inmunogenicidad, farmacocinética y/u otras propiedades clínicas.

Se contemplan otros procedimientos de tratamiento de células *ex vivo* o *in vivo* que comprenden un cultivo celular y una etapa de incubación, por ejemplo, en solución o en un soporte sólido, por ejemplo, un implante o material de injerto óseo. Dicho cultivo o tratamiento celular se realiza específicamente de la siguiente manera: Las células se cultivan en condiciones de cultivo celular regulares y se añade al medio la fracción de suero de la invención. La adición de la fracción de suero induce específicamente la proliferación celular, previene la muerte o daño celular y puede inducir la diferenciación en tipos celulares específicos. La proliferación celular típicamente se mide por recuento celular o procedimientos sustitutos.

Se descubrió de forma inesperada que determinadas preparaciones derivadas de sangre aceleran y mejoran la proliferación celular, la regeneración y reparación del tejido, en particular, el material osteoartítico o el tejido óseo después de un daño óseo isquémico.

Los glóbulos sanguíneos, tras la activación por lesión, secretan una gran cantidad de factores de proliferación en el suero. Esto plantea la posibilidad de usar productos séricos para dianas terapéuticas distintas de la lesión aguda, aplicando, por tanto, una mezcla de factores de crecimiento más fisiológica que la monoterapia de proteínas recombinantes. Se realizaron investigaciones de PRP y fracciones de suero relacionadas en un modelo *ex vivo* de isquemia ósea. Se aislaron pequeños fragmentos de hueso de 10 mm³ de las cabezas del fémur descartadas durante las operaciones de artroplastia de cadera. Los explantes se cultivaron en cultivo durante 3 días, a

continuación, se sometieron a privación de oxígeno y glucosa (POG) transitoria para simular la isquemia. La mayoría de las células en los explantes óseos murieron y los supervivientes no proliferaron. La adición de PRP que sea natural o bien anticoagulado (heparinizado) o bien activado por medios químicos o físicos no tuvo ningún efecto sobre las células posisquémicas. Sin embargo, la fracción de suero de la invención, en particular, que contiene la fracción líquida del coagel de FRP, en particular, el suero prensado de fibrina rica en plaquetas (SFRP), indujo la proliferación celular de los osteoblastos posisquémicos. El análisis con Proteome Profiler mostró que PRP y SFRP tienen perfiles de factores de crecimiento divergentes, siendo el factor plaquetario 4 uno clave que tiene una mayor concentración en SFRP que en PRP. Otra diferencia significativa es la carencia de fibrina o fibrinógeno en SFRP porque la coagulación es espontánea y el PRP se activa instantáneamente después de extraer sangre. Se concluye que la fracción de suero de la invención, en particular, el SFRP, es un derivado de la sangre que puede restaurar las capacidades de proliferación celular, por ejemplo, del hueso posisquémico y, por tanto, puede ser una nueva herramienta terapéutica, con un uso específico en las enfermedades óseas degenerativas.

La fracción de suero de la divulgación se proporciona específicamente para tratar artrosis, osteoartrosis, necrosis ósea o isquemia ósea, para implantes o injertos óseos autólogos para prevenir o tratar la isquemia después del implante o para incrementar la proliferación de células después de un episodio isquémico.

La isquemia ósea o necrosis avascular (NAV), por ejemplo, de la cabeza del fémur, todavía presenta un desafío para los cirujanos ortopédicos, principalmente por los caracteres progresivos de la enfermedad y la relativa corta edad de los pacientes. Los tratamientos específicos y eficaces disponibles actualmente son:

- descompresión del núcleo
- descompresión del núcleo
- hueso autólogo
- matriz ósea desmineralizada
- BMP (proteínas morfogénicas óseas)
- osteotomía
- aplicación de agentes promotores de sangre humana, por ejemplo, PRP
- cualquier combinación de los anteriores.

Se estableció un modelo humano *in vitro* y se sometieron a prueba los efectos de las preparaciones derivadas de plasma sanguíneo en el mecanismo patológico de isquemia ósea.

Se llevaron a cabo experimentos con diversas fracciones de plasma y, de forma sorprendente, se descubrió que se pueden obtener preparaciones que son eficaces para acelerar y facilitar la regeneración ósea después de isquemia ósea.

Los resultados *ex vivo* mostraron que la preparación derivada de suero de la divulgación induce directamente la proliferación de células óseas incluso después de una isquemia grave. Se ha descubierto que la proliferación de células se mejora significativamente por la fracción líquida de FRP, que comprende o consiste en el contenido líquido en FRP, pero no por PRP de la técnica anterior.

Los resultados experimentales fueron sorprendentes en vista de la técnica anterior. Fue especialmente sorprendente que el material de partida, que es PRP sin adición de anticoagulantes, y la coagulación de acuerdo con la invención afecten al resultado final. Específicamente, la fracción de suero preparada recientemente de la invención se podría proporcionar como un material mejorado para su uso médico.

La fibrina activada tiene un efecto proinflamatorio fuerte que es beneficioso en caso de lesiones agudas, pero puede ser perjudicial en casos crónicos donde la regeneración de los tejidos se inhibe por la inflamación persistente. Por lo tanto, es necesario hacer coincidir la clase correcta de mezcla de factores de proliferación con una determinada patología para desarrollar un protocolo clínico fiable. En el presente estudio, se usó un modelo humano *ex vivo* novedoso de isquemia ósea, que se asemeja estrechamente a los estados tisulares de hueso trasplantado o tejido dañado por enfermedades degenerativas en fase terminal. Se analizaron los constituyentes de diversas fracciones de suero ricas en plaquetas y se investigaron sus efectos como factores de proliferación sobre explantes de hueso humano posisquémicos para confirmar los efectos positivos de la fracción de suero de la invención.

Sin quedar ligado a ninguna teoría, posiblemente este es el mecanismo detrás de la observación clínica de que los injertos óseos aumentados con PRP tienen un resultado a los 6 años notablemente mejor que el tratamiento de descompresión en la necrosis de la cabeza del fémur.

Las etapas del procedimiento específicas aplicables en la presente divulgación son las siguientes:

1. Obtener sangre venosa. No son necesarios aditivos, por ejemplo, anticoagulantes.
2. Retirar los glóbulos rojos.
3. Obtener fibrina rica en plaquetas (un coágulo amarillento flota sobre la fracción de glóbulos rojos).

4. Separar la fracción líquida y la matriz (fracción sólida) de la FRP. Esto se puede hacer prensado (apretando) la FRP o por centrifugación a una fuerza apropiada incrementada.

En un modo de realización preferente, el centrifugado se lleva a cabo dentro de los 20 minutos, preferentemente dentro de los 15, 10, 5 minutos o un periodo más corto desde la obtención de sangre venosa.

Preferentemente, la centrifugación se lleva a cabo a de 1000 a 5000 g, preferentemente a de 2000 a 4000 g, más preferentemente a aproximadamente 3000 g. Preferentemente, la centrifugación se lleva a cabo durante de 2 a 20 minutos, preferentemente durante de 4 a 15 minutos, muy preferentemente a aproximadamente 10 minutos (+/-2 minutos).

El coágulo obtenido (es decir, el coagel) se puede retirar por cualquier procedimiento apropiado, por ejemplo, por filtrado u otros medios físicos. En un modo de realización preferente, se aplica centrifugación continua y el coágulo se retira en una abertura en la pared del espacio de centrifugación.

La fracción líquida del coágulo se puede retirar apretando, prensando, filtrando, filtrando a vacío o cualquier otro procedimiento apropiado.

La fracción es, en particular, útil para ayudar, facilitar o permitir la regeneración del tejido óseo de un sujeto. El tejido óseo se puede dañar de forma aguda, tal como en el caso de un traumatismo o cirugía, o se puede deteriorar de forma crónica, por ejemplo, en el caso de enfermedades óseas degenerativas, tales como osteoartritis, necrosis ósea o isquemia ósea. Como ejemplo, puede estar presente isquemia durante el trasplante de tejido óseo u órganos que contienen hueso, tales como trombos osteocondrales. Los procedimientos específicos, que se pueden mejorar usando la fracción de suero de la divulgación, por ejemplo, son procedimientos para aplicar preparaciones plasmáticas en cirugía, tal como se enseña en las siguientes publicaciones.

Jun Araki *et al*: Optimized Preparation Method of Platelet-Concentrated Plasma and Noncoagulating Platelet-Derived Factor Concentrates: Maximization of Platelet Concentration and Removal of Fibrinogen (Tissue Eng Part C Methods., marzo de 2012;18(3):176-85).

Dohan D. M. E *et al*.: Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;101:E37-44.

La descripción anterior se entenderá más completamente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, dichos ejemplos son meramente representativos de procedimientos de puesta en práctica de uno o más modos de realización de la presente invención y no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: plasma rico en plaquetas como tratamiento adyuvante en la necrosis de la cabeza del fémur aséptica

En un estudio de observación clínico retrospectivo se compararon dos tratamientos quirúrgicos en cuanto a la necrosis de la cabeza del fémur avascular. Los pacientes del grupo de control (n=13) solo se trataron con descompresión del núcleo, en el grupo con PRP (n=19) la descompresión del núcleo se completó con impactación de esquirlas óseas autólogas mezcladas con PRP autólogo. En el estudio de observación clínico seis años después de la operación, el grupo con PRP tuvo una tasa de fracaso significativamente menor (un 21 % frente a un 67 %, $p<0,05$) indicada por el implante de prótesis.

Sin embargo, el papel y los mecanismos celulares exactos son desconocidos y son necesarios otros datos para probar el efecto del procedimiento.

Ejemplo 2: preparación de una composición de SFRP

Se preparó una preparación que estaba libre de plaquetas, pero era rica en factores derivados de plaquetas.

La descripción del procedimiento aplicado es como sigue:

1. Se extrajo sangre venosa en un tubo natural estándar sin ningún aditivo.
2. Se centrifugó instantáneamente, preferentemente en 3 minutos, en una centrifugadora a 1600-1700 g, durante 5-10 minutos.
3. Los glóbulos rojos se extrajeron en el fondo de los tubos, un coágulo amarillento flota sobre la fracción de glóbulos rojos en plasma transparente. Este coágulo (o coagel) se retiró con unas pinzas y se colocó en una placa de Petri limpia.

4. El coágulo se apretó cuidadosamente para obtener el líquido del coágulo: el líquido obtenido del coágulo es esencialmente la composición final de SFRP. Se estima que se pueden obtener 0,4 ml de producto final de 6 ml de sangre.

- 5 Para acelerar el mecanismo de coagulación, también se puede usar un tubo de extracción de sangre recubierto de sílice o un tubo de vidrio para extraer sangre.

Ejemplo 3: explantes óseos y privación de oxígeno y glucosa (POG)

10 En este estudio *in vitro*, se obtuvieron muestras óseas de la cabeza del fémur extraída durante artroplastia total de cadera para artrosis primaria. Se obtuvieron cabezas del fémur de pacientes que padecían coxartrosis y que estaban sometidos a cirugía de artroplastia de cadera, durante la que se extrae la cabeza del fémur en su totalidad y se descarta como desecho quirúrgico.

- 15
 - Se recogieron explantes con un peso de 0,004 g en promedio (n=40 fragmentos/paciente) de las cabezas del fémur
 - Los explantes se transportaron a condiciones de cultivo celular a 37 °C en medio Eagle modificado de Dulbecco que contenía 1 g/l de glucosa, penicilina-estreptomycin al 5 % y suero fetal bovino al 10 % (medio de células madre).

20 Después de una incubación de 3 días de las cabezas del fémur, se usó privación de oxígeno-glucosa (POG) para modelar la mala circulación de la cabeza del fémur. A nivel de tejido, la POG modela el daño celular y la regeneración deteriorada que es característica para enfermedades óseas degenerativas, tales como necrosis aséptica, osteocondrosis, osteoartritis, etc. Las cabezas del fémur se colocaron en un medio libre de glucosa y aminoácidos a un nivel de oxígeno de $O_2 < 0,5$ mmHg (reemplazado por gas N_2). Las pruebas se han continuado a las 1, 2,5, 3,5, 4, 5 y 7 horas después de lo que se restablecieron las condiciones de cultivo celular normales.

25 Para las pruebas cualitativas de la viabilidad celular, las células vivas y muertas se marcaron con los tintes fluorescentes calceína-AM (488 nm) y homodímero de etidio 2 (546 nm), a continuación, se evaluaron por microscopia confocal (microscopia confocal con ZEISS LSM, 20X).

30 Para el análisis cuantitativo de la viabilidad celular se usó el ensayo con metil-tiazol-tetrazolio (MTT) con los siguientes parámetros: 1 h de incubación en solución de MTT, 1 h de solubilización en isopropanol, medidas de absorbancia a 570 y 690 nm, corregidas con el peso seco de los huesos. El ensayo se llevó a cabo a 37 °C. En experimentos preliminares, se sometió a prueba la incubación durante 10 minutos, 1, 2, 5 horas y la solubilización en isopropanol se sometió a prueba durante 10 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 20 horas.

Ejemplo 4: preparación de una fracción de suero ejemplar (SFRP) y su caracterización

40 El plasma rico en plaquetas se aisló por el protocolo de doble centrifugación. Se extrajo sangre de donantes adultos sanos en tubos con EDTA (BD Vacutainer®, K2E EDTA) y se centrifugó a 1300 rpm (320 g) durante 12 minutos. Se retiró el sobrenadante y se centrifugó a 3000 rpm (1710 g) durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en medio de células madre a una proporción de 1:4 durante el tratamiento con POG y después de eso. Se creó PRP heparinizado añadiendo 100 µl de heparina fraccionada (Clexane 4000 NE/0,4 ml) a 1200 µl de PRP después del aislamiento. Se preparó fibrina rica en plaquetas por centrifugación sin anticoagulantes durante 5 minutos a 3000 rpm (1710 g). Se retiró un gel fibrinoso del tubo y se apretó cuidadosamente el líquido del gel para obtener SFRP aislado, que se añadió al medio de células madre en una proporción de 1:4. La concentración de suero fue de aproximadamente 1:500 en el caso de PRP (500 µl de producto final de 6 ml de sangre) y de aproximadamente 1:600 para SFRP (600-800 µl de producto final de 6 ml de sangre).

Ejemplo 5: efecto de las fracciones de suero en explantes óseos después de la privación de oxígeno y glucosa

55 Se recogieron explantes óseos de las cabezas del fémur descartadas de pacientes que estaban sometidos a artroplastia de cadera. Se extrajeron injertos óseos de aproximadamente 10 mm³ y se transfirieron inmediatamente a medio Eagle modificado de Dulbecco que contenía 1 g/l de glucosa, penicilina-estreptomycin al 1 % y suero fetal bovino al 10 %. Los explantes se cultivaron en este medio en condiciones de cultivo celular estándar en placas de 24 pocillos. Se realizó la privación de oxígeno-glucosa (POG) en un sistema de incubación Pecon (Erbach-Bach, Alemania) el tercer día después de la explante. Los fragmentos de hueso se transfirieron a un medio de células madre que carecía de glucosa y aminoácidos y se purgó el oxígeno con nitrógeno a un nivel de O_2 de un 0,5 % durante 7 horas. Después de completar la POG, se reemplazó el medio y los explantes se cultivaron en un 20 % de oxígeno y un 5 % de CO_2 . Se añadieron fracciones de sangre al medio en una proporción de 1:4 justo antes de la POG y se renovó con cambios de medio. Tanto el PRP como SFRP se prepararon recientemente justo antes de su uso y nunca se almacenaron ni congelaron.

65

Los injertos se incubaron en una mezcla diluida 1:9 de bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT, n.º M5655, Sigma) y medio de células madre a 37 °C durante 60 min y, a continuación, se diluyó con isopropanol. La absorbancia de la solución se midió por un espectrofotómetro PowerWave™ XS a 570 nm y el ruido se filtró midiendo la absorbancia a 690 nm. El ensayo con MTT se realizó el tercer y sexto día después de la POG.

Solo había unas pocas células vivas en las esquirlas óseas el día de la operación, y estas células estaban dañadas. Las muestras se obtuvieron de diferentes pacientes. Para conseguir que las diversas esquirlas óseas estuvieran en un estado similar, se incubaron en medio de células madre a 37 °C y un 5 % de CO₂ durante 3 días. Se detectó un número suficiente de células el 3.º día, por lo tanto, se comenzó POG para modelar la afección isquémica. En base a los datos de cuatro pacientes, se mostró una diferencia significativa por la prueba de la *t* entre la viabilidad celular de las esquirlas óseas el día de la cirugía y después de 3 días de incubación (81,75±47,72 frente a 106,28±55,24).

Para lograr el estado isquémico, se aplicó POG durante muchos intervalos diferentes. Se observaron muestras óseas durante una, dos y media, tres y media, cinco y siete horas de POG. Después del tratamiento con POG, que duró 5 horas, se determinó la viabilidad celular de los grupos tratados y no tratados con POG por el ensayo con MTT y se descubrió que 5 horas de tratamiento no son suficientes para dañar a las células (n=12 explantes/grupos, control: 50,36±6,66 frente a POG: 36,97±3,00, prueba de la *t*, no significativa). Antes de que las células adherentes sanas con POG se pudieran ver en verde, y al incrementar el tiempo de POG a 7 horas, estas células perdieron sus ramas, cambiaron su forma, se dañaron o destruyeron, por lo que su color se volvió rojo. Se mostró una diferencia significativa entre el grupo de control y el grupo tratado con POG por esta medición cuantitativa.

Durante el tratamiento con PRP, los explantes del grupo tratado recibieron una mezcla de PRP y medio de células madre a una proporción de 1:4.

El PRP no puede mejorar la viabilidad de las células después de la afección isquémica (fig. 2). Cuando se puso PRP en el medio de células madre, los glóbulos rojos en PRP se coagularon y la consistencia de la solución se volvió gelatinosa. Para evitar esta consistencia, se colocó heparina en la solución de PRP y se examinó la viabilidad celular en base al protocolo descrito anteriormente. Se observó un crecimiento tendencial en el 6.º día después de la POG en comparación con el grupo no tratado, pero esto no fue significativo. No se observó ninguna diferencia significativa después de someter a prueba el PRP en mayores y mayores concentraciones (fig. 2). Para activar las plaquetas, se probaron tres procedimientos: congelar y descongelar, añadir CaCl₂ o CaCl₂ y trombina, pero ninguno de ellos cambió los resultados anteriores (fig. 2).

Se examinó el efecto de SFRP durante la POG. Los explantes tratados se incubaron en medio de células madre que contenía SFRP a escala 1:4 durante 7 horas. En base al resultado del ensayo con MTT, se concluye que el grupo tratado con SFRP no tuvo una mayor viabilidad celular en comparación con el grupo no tratado. SFRP no puede proteger el efecto agudo inmediato de POG (datos de 2 pacientes, grupo de control: 70,18±6,64, grupo con POG: 24,85±2,49, grupo con SFRP: 26,78±3,49, diferencia no significativa).

Después eso, se examinó el efecto a largo plazo de SFRP. Los explantes se trataron durante la POG y continuamente durante 6 días después de la POG. El 3.º día se cambió el medio y se realizó el ensayo de viabilidad celular y se mostró un crecimiento tendencial en el grupo tratado con SFRP. Después de otros 3 días de incubación después de la POG, la diferencia fue significativa (fig. 3).

En los grupos pretratados, los explantes han recibido SFRP desde el día de la cirugía. En estos casos se puede afirmar el efecto positivo de SFRP, porque ya se detectó una diferencia significativa entre los grupos tratados y no tratados después de 3 días de POG (4 pacientes, n=24 explantes/grupos, **: *p* < 0,01), siendo la diferencia más pronunciada en el 6.º día después de la POG (4 pacientes, n=24 explantes/grupos, ***: *p* < 0,0001) (fig. 3).

En este estudio se compararon dos fracciones de sangre bastante similares en un modelo de isquemia ósea. De forma inesperada, no se pudo observar un efecto positivo de PRP incluso a altas concentraciones, mientras que el SFRP mejoró significativamente la capacidad de proliferación de las células osteoblásticas dañadas por isquemia. También cabe señalar que el efecto proliferativo fue aditivo al efecto de FBS, un constituyente normal de los medios de cultivo de células madre, y solo se observó en el estado posisquémico.

Ejemplo 6: análisis de la composición de las fracciones de suero

Para la determinación de los factores de crecimiento y proteínas relacionadas con la angiogénesis en el SFRP y PRP, se aplicó el Proteome Profiler Human Angiogenesis Array Kit (R&D System, n.º ARY 007) y se usó Adobe Photoshop para la cuantificación de la expresión de proteínas. Para la determinación cuantitativa de plaquetas e iones en SFRP se usó Sysmex XT4000i y Beckman Coulter AU5800. Los resultados se expresan como media ± EEM. Las significaciones estadísticas se determinaron por la prueba de la *t* o ANOVA unidireccional con las pruebas *a posteriori* de Tukey según fuera apropiado con el programa informático Graphpad Prism. Se consideraron significativos los valores de significación de *p* < 0,05.

Tabla 1. Parámetros de laboratorio de fracciones de sangre. Las sales y proteínas se midieron por un dispositivo Sysmex XT4000i, los recuentos celulares se determinaron por un dispositivo Beckman Coulter AU5800. Los datos se presentan como promedio $\pm$ EEM, n=3.

	SFRP	PRP	PPP	intervalo normal en sangre completa	unidad
Sodio	141,00 $\pm$ 0,58	138,33 $\pm$ 0,67	139,00 $\pm$ 1,00	133-146	mmol/l
Potasio	4,04 $\pm$ 0,19	4,38 $\pm$ 0,26	3,90 $\pm$ 0,19	3,5-5,3	mmol/l
Calcio	2,31 $\pm$ 0,01	2,33 $\pm$ 0,04	2,30 $\pm$ 0,02	2,12-2,57	mmol/l
Magnesio	0,84 $\pm$ 0,01	0,88 $\pm$ 0,04	0,83 $\pm$ 0,00	0,6-1,1	mmol/l
Cloruro	105,67 $\pm$ 0,88	103,00 $\pm$ 0,58	102,67 $\pm$ 0,88	99-111	mmol/l
Fósforo	1,21 $\pm$ 0,08	1,31 $\pm$ 0,08	1,16 $\pm$ 0,08	0,87-1,45	mmol/l
Glucosa	5,36 $\pm$ 0,32	4,61 $\pm$ 0,34	5,26 $\pm$ 0,3	3,6-6,0	mmol/l
Proteína total	74,87 $\pm$ 1,53	75,77 $\pm$ 1,7	74,03 $\pm$ 2,4	60-80	g/l
Albúmina	49,67 $\pm$ 0,07	48,27 $\pm$ 0,33	47,57 $\pm$ 0,82	35-52	g/l
IgG	12,04 $\pm$ 1,34	10,22 $\pm$ 1,17	12,95 $\pm$ 1,17	6,9-14	g/l
Hemoglobina	0,00 $\pm$ 0,00	6,33 $\pm$ 0,88	0,33 $\pm$ 0,33	115-155	g/l
Fibrinógeno	0,00 $\pm$ 0,00	1,07 $\pm$ 0,09	0,00 $\pm$ 0,00	1,5-4	g/l
Glóbulos rojos	0,00 $\pm$ 0,00	0,28 $\pm$ 0,04	0,00 $\pm$ 0,00	4,2-6,1	g/l
Glóbulos blancos	0,01 $\pm$ 0,01	14,85 $\pm$ 2,61	0,01 $\pm$ 0,01	4,8-10,8	g/l
Plaquetas	1,33 $\pm$ 0,33	242,33 $\pm$ 75,9	16,00 $\pm$ 4,93	150-400	g/l

Existen varias diferencias clave entre PRP y SFRP medidos por el ensayo con matriz de Proteome Profiler (fig. 4). Las diferencias entre las dos fracciones están limitadas a un puñado de proteínas, y es una explicación sencilla que los factores que tienen mayores niveles en la fracción de SFRP sean responsables del efecto. Cabe señalar que se acaba de compilar el análisis proteómico completo de la liberación de plaquetas y contiene 3500 proteínas, significativamente más que las medidas por el ensayo con Proteome Profiler. Sin embargo, en estos análisis a menudo se pasan por alto dos proteínas importantes: albúmina y fibrina (tabla 1). Ambas proteínas son abundantes en suero y tienen efectos bastante bien descritos sobre la proliferación celular. Se describieron previamente los efectos de inducción ósea *in vitro* e *in vivo* de la seroalbúmina, lo que plantea la posibilidad de que la propia albúmina sea el factor activo en PRP y SFRP. Sin embargo, puesto que la albúmina está presente tanto en PRP como en SFRP en niveles comparables, además de que también se añade al medio de cultivo en forma de FBS, se concluye que no sería responsable de los efectos de SFRP observados en el estudio actual.

Una clara diferencia entre las preparaciones de PRP y SFRP es la presencia de fibrina (tabla 1). La fibrina o el fibrinógeno en forma inactivada es la segunda proteína más abundante en el suero y está presente tanto en PRP natural como heparinizado, mientras que está ausente en el SFRP. Varios estudios describieron que la fibrina tiene una reacción proinflamatoria muy fuerte al activar específicamente los macrófagos. La fibrina también es conocida como factor clave en el proceso de consolidación ósea después de una fractura como la primera etapa de formación de hueso cartilaginoso. Aunque no todos los detalles de las conexiones celulares de la fibrina están claros, es razonable barajar la hipótesis de que sea al menos parcialmente responsable de las diferencias en la acción proliferativa de SFRP frente a PRP. También es importante que el modelo usado en el presente estudio no esté diseñado para imitar la consolidación ósea en condiciones normales, sino más bien el potencial de regeneración de un tejido dañado. Aunque la respuesta inflamatoria durante una lesión aguda de un hueso sano roto puede ser beneficiosa, tiene un efecto opuesto en un tejido degenerativo donde la capacidad de remodelación de las células está deteriorada. Se cree que el modelo actual se asemeja a esta última situación al imitar un periodo isquémico. La observación de que las fracciones de suero no tuvieron ningún efecto sobre el estado "sano" de los explantes óseos, sino en el periodo posisquémico, también refuerza la idea de que el modelo actual, con sus limitaciones como sistema *ex vivo*, se asemeja más a los tejidos óseos degenerativos. Además, puesto que la reserva ósea eran cabezas del fémur sometidas a explante en los procedimientos de artroplastia total de cadera en la osteoartritis en fase terminal, los resultados actuales se deben interpretar en este contexto.

Se concluye que aislar suero de la fibrina rica en plaquetas tiene propiedades regenerativas únicas en los tejidos óseos dañados. El aislamiento de SFRP es un procedimiento simple que se puede realizar a pie de cama, proporcionando una mezcla autóloga de factores de crecimiento que incluso se pueden usar en enfermedades

óseas degenerativas. El hecho de que el SFRP esté desprovisto de fibrina y tenga, en general, menos constituyentes que el PRP, pero mejores efectos en este caso específico, es otra etapa en la estandarización de los productos séricos. En base al estudio en humanos *ex vivo* actual, la transición clínica del uso de SFRP se inicia en enfermedades óseas degenerativas e isquémicas.

La seguridad a corto plazo del PRP está bien establecida por numerosos estudios clínicos, sin embargo, han surgido inquietudes con respecto a su eficacia. Los intentos de compilar un metanálisis se enfrentan al problema de la nomenclatura no estandarizada, diversos protocolos de aislamiento y pautas de tratamiento. Incluso los estudios bien diseñados que se centran en una indicación de nicho luchan con la variación muy alta de los niveles de factores de crecimiento en PRP. Puesto que PRP es esencialmente una mezcla de agentes activos conocidos y aún desconocidos, no es evidente que se pueda usar como compuesto de referencia para la dosificación. Por lo tanto, actualmente la mejor manera de estandarización es definir el producto por el protocolo de aislamiento en lugar de sus constituyentes.

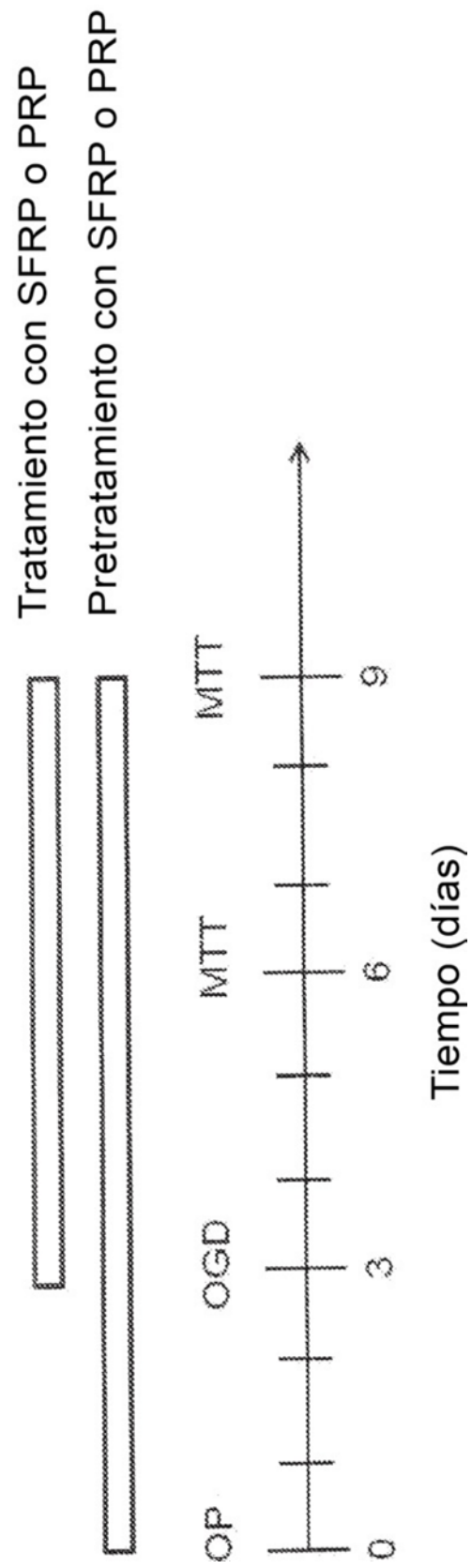
Ejemplo 7: determinación de SDF-1 en SFRP

SDF-1 (factor derivado de células estromales 1), también conocido como PBSF (factor estimulante del crecimiento de prelinfocitos B), es una proteína descubierta recientemente que pertenece a la familia de quimiocinas alfa (CXC) de citocinas. SDF-1 alfa y SDF-1 beta son las primeras citocinas identificadas inicialmente usando la estrategia de clonación de trampa de secuencia señal a partir de una línea de células estromales de médula ósea humana. SDF-1 tiene actividad quimiotáctica sobre los linfocitos T y monocitos en reposo. Los kits de ELISA (ensayo de inmunoadsorción enzimática) para SDF-1 [Sigma-Aldrich, kit de ELISA para SDF-1 alfa humano *RAB0123* y kit de ELISA para SDF-1 beta humano de SIGMA *RAB0124*] son ensayos de inmunoadsorción enzimática *in vitro* para la medición cuantitativa de SDF-1 humano en plasma (no se recomiendan las muestras de suero para su uso en este ensayo, ya que la concentración de SDF-1 humano es baja en el plasma normal, puede que no se detecte en este ensayo), sobrenadantes de cultivo celular y orina. Este ensayo emplea un anticuerpo específico para SDF-1 humano recubierto en una placa de 96 pocillos. Los patrones y las muestras se pipeteen en los pocillos y el SDF-1 presente en una muestra se une a los pocillos por el anticuerpo inmovilizado. Los pocillos se lavan y se añade el anticuerpo anti-SDF-1 humano biotinilado. Después de retirar por lavado el anticuerpo biotinilado no unido, se pipetea en los pocillos estreptavidina conjugada con HRP. Se lavan de nuevo los pocillos, se añade una solución de sustrato TMB a los pocillos y se revela el color en proporción a la cantidad de SDF-1 unido. La solución de detección cambia el color de azul a amarillo y la intensidad del color se mide a 450 nm. La curva de dilución estándar se preparó usando las siguientes concentraciones de SDF-1 (pg/ml): 6000, 3000, 1500, 750, 375, 187,5, 93,75.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de una fracción de suero aislada de fibrina rica en plaquetas (FRP), que comprende las etapas de:
 - (i) centrifugar sangre venosa durante 2-20 minutos a 1000-3000 g, con lo que se proporciona plasma rico en plaquetas (PRP) y se extrae la fracción de glóbulos rojos en ausencia de cualquier anticoagulante exógeno y en contacto con una superficie cargada negativamente; hasta que, por coagulación espontánea del PRP, se obtiene un coagel de FRP,
 - (ii) apretar el coagel de FRP obtenido para aislar su fracción de suero (es decir, un liberado de FRP), en el que el procedimiento se lleva a cabo en menos de 6 horas, en el que no se usan agentes conservantes y en el que la fracción de suero se prepara sin ninguna etapa de congelación/descongelación intermedia.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la sangre venosa se centrifuga a de 1000 a 2000 g durante 4 a 15 minutos.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la fracción de suero se prepara en un dispositivo de aplicación, en el que preferentemente el dispositivo de aplicación es una jeringuilla, y en el que la fracción de suero de FRP se obtiene filtrando y/o centrifugando el coagel.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra de sangre venosa se proporciona en un dispositivo de coagulación, tal como un tubo de coagulación o una jeringuilla de coagulación, y en el que el coagel se obtiene en una etapa por centrifugación de la muestra de sangre en dicho tubo.
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la fracción de suero se obtiene de sangre venosa extraída de un único donante.
6. Una fracción de suero aislada de fibrina rica en plaquetas (FRP) **obtenida** por el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. La fracción de suero de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la fracción de suero se proporciona en una jeringuilla.
8. La fracción de suero de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso en medicina regenerativa.
9. La fracción de suero de la reivindicación 6 para su uso en el tratamiento de isquemia ósea o una enfermedad mediada por isquemia ósea.
10. La fracción de suero de la reivindicación 6 para su uso en el tratamiento de un paciente que padece osteonecrosis, artrosis, osteoartritis, necrosis ósea, isquemia crítica de las extremidades, o para su uso en la promoción de implantes o injertos óseos.
11. Una preparación farmacéutica que comprende la fracción de suero de la reivindicación 6, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que dicha preparación farmacéutica está contenida en un dispositivo de aplicación, preferentemente una jeringuilla.
12. Uso *in vitro* de una fracción de suero de acuerdo con la reivindicación 6 para inducir la proliferación celular de los osteoblastos posisquémicos, preferentemente para inducir la proliferación después de isquemia en explantes de material osteonecrótico humano.
13. Uso *in vitro* de una fracción de suero de acuerdo con la reivindicación 6 como aditivo de cultivo celular.

Fig. 1



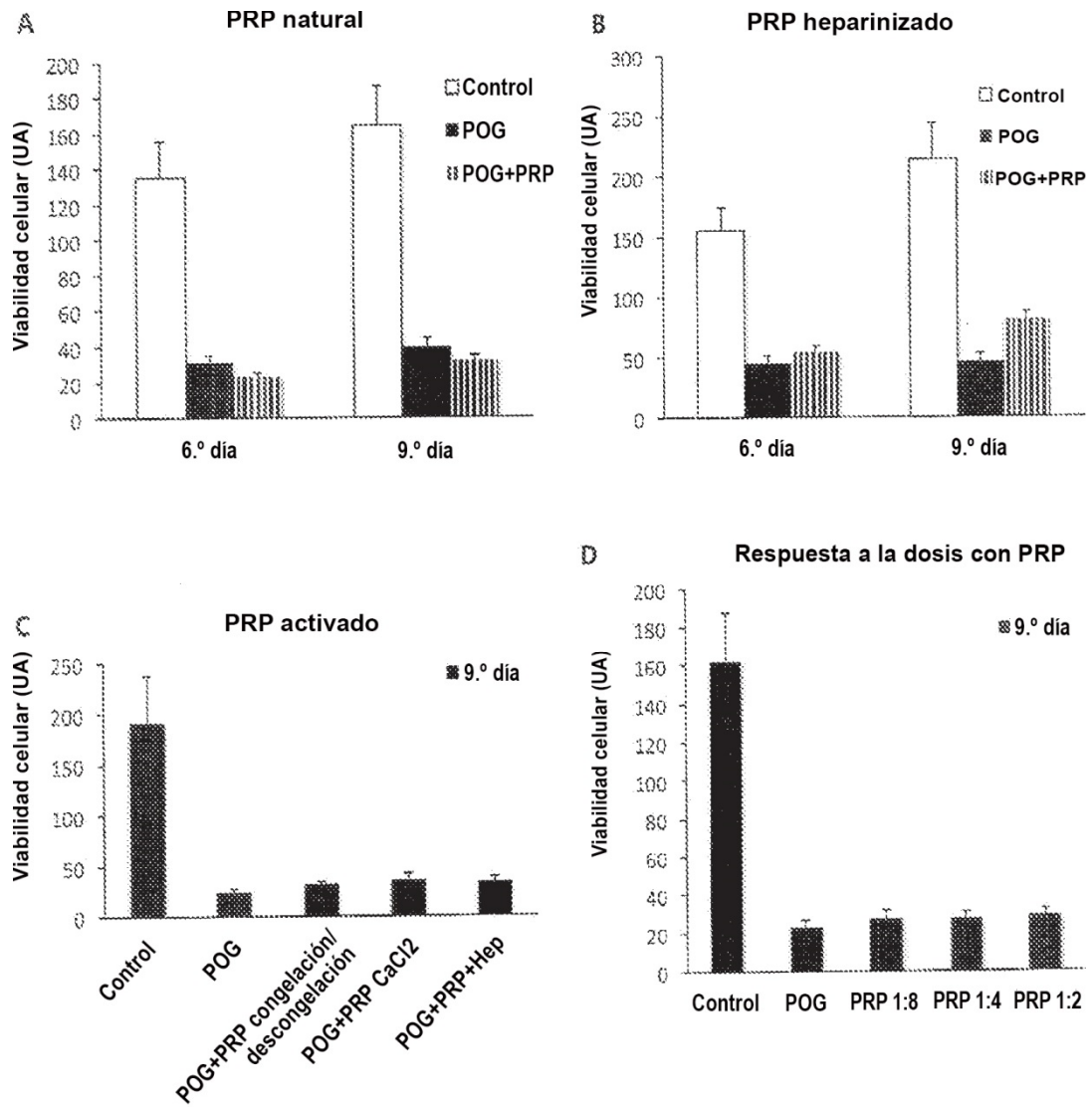


Fig. 2

Fig. 3

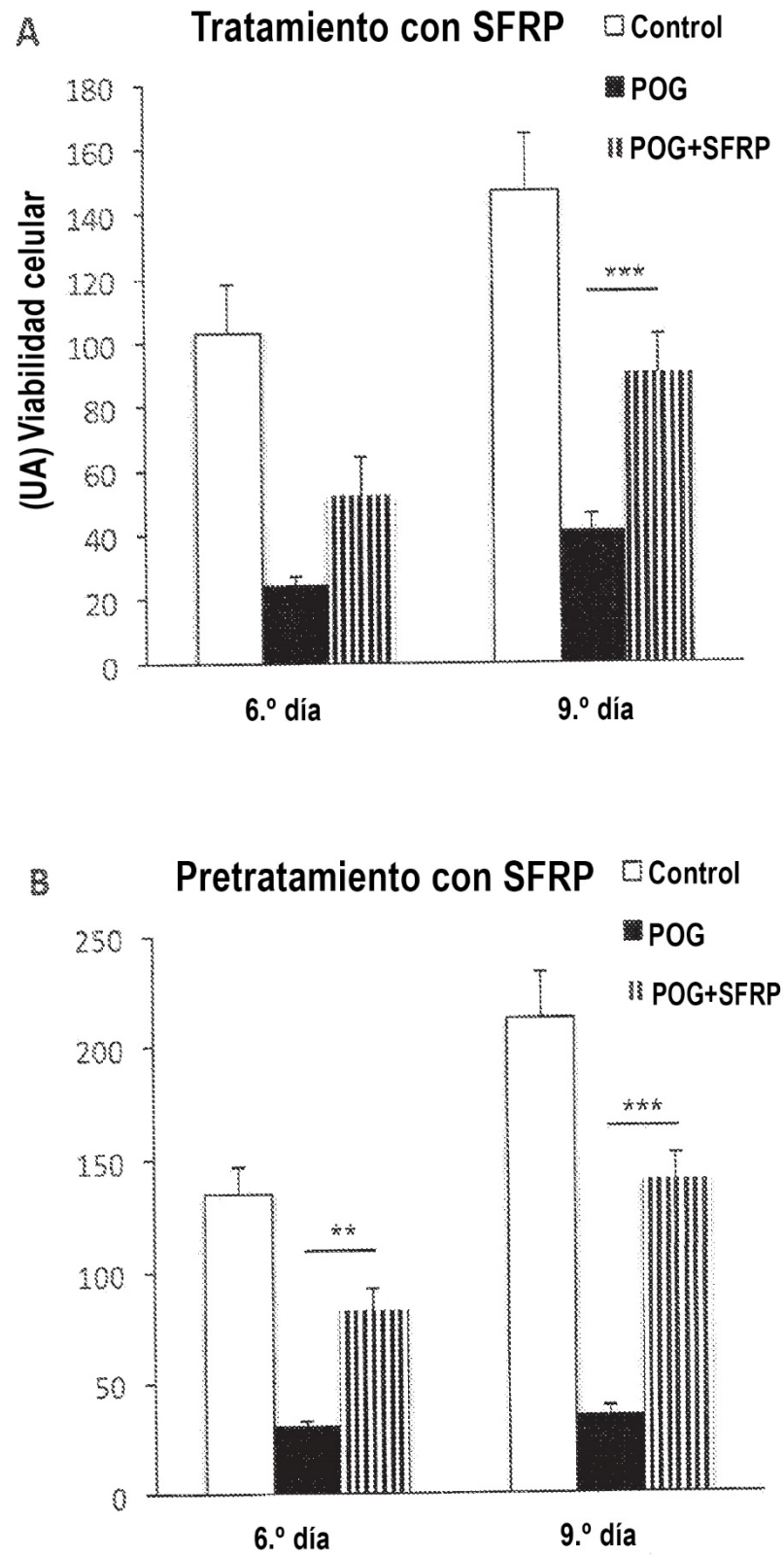


Fig. 4

