

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 970 156**

51 Int. Cl.:

A61K 35/19 (2015.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/078 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.11.2019 PCT/EP2019/081257**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2020 WO20099530**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2019 E 19800906 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2024 EP 3880217**

54 Título: **Métodos para preparar un liberado de plaquetas**

30 Prioridad:

14.11.2018 EP 18206107

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

27.05.2024

73 Titular/es:

**ONDERZOEKS EN ONTWIKKELINGSFONDS
RODE KRUIS-VLAANDEREN (100.0%)
Motstraat 40
2800 Mechelen, BE**

72 Inventor/es:

**FEYS, HENDRIK, B;
VANDEKERCKHOVE, PHILIPPE y
COMPERNOLLE, VEERLE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 970 156 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

Métodos para preparar un liberado de plaquetas

5 Campo de la invención

La invención se refiere a sistemas y métodos para preparar productos derivados de plaquetas y a usos de productos derivados de plaquetas para la preparación de productos derivados de plaquetas.

10 Antecedentes de la invención

En laboratorios especializados, las células y/o tejidos se cultivan en medios de crecimiento. El medio de crecimiento se diseña específicamente para favorecer el crecimiento de las células y comprende, además de nutrientes y minerales, también una mezcla compleja de (bio)moléculas, tales como hormonas, factores de crecimiento y factores de unión. Históricamente el suero, y especialmente el suero fetal bovino (FBS), ha sido un componente crucial de los medios de crecimiento, como proveedor de estas (bio)moléculas, así como de numerosos nutrientes de bajo peso molecular. La aparición del cultivo de células de mamíferos a escala industrial para la producción de productos farmacéuticos a base de proteínas aumentó enormemente el consumo de suero. Se estima que cada año se aíslan aproximadamente 800 000 litros de FBS procedente de más de un millón de fetos bovinos para satisfacer la demanda de suero en cultivos de células y/o tejidos en todo el mundo.

La medicina regenerativa, que incluye la terapia celular y el trasplante de tejidos de ingeniería, es un campo emergente de la medicina. En medicina regenerativa, se regeneran o reemplazan células humanas o tejidos completos para restaurar o establecer una función normal. Con estos avances en la medicina, se requiere un mayor enfoque en el desarrollo de métodos de cultivo seguros y sin contaminantes para células humanas que estén exentos de productos derivados de animales, ya que los productos derivados de animales pueden causar reacciones inmunitarias hacia factores extraños, así como infecciones por patógenos entre especies.

En la búsqueda por sustituir el FBS usado convencionalmente como suplemento de crecimiento en medios de cultivo celular, investigaciones recientes se han centrado en la aplicación de un lisado de plaquetas (PL) que se puede producir a partir de un concentrado de plaquetas mediante lisis, o de un liberado de plaquetas (PR) que se puede producir a partir de un concentrado de plaquetas mediante activación plaquetaria. Se ha sugerido el PL como una alternativa viable para el FBS en el cultivo *ex-vivo* de células para terapia humana.

Los métodos actuales para preparar productos derivados de plaquetas se dividen en dos categorías principales: (i) congelación y descongelación (para preparar un PL) y (ii) activación plaquetaria (para preparar un PR). En el primer método (i), una composición rica en plaquetas se somete repetidamente a ciclos de congelación y descongelación. Esto lisa eficazmente las plaquetas, pero no elimina el fibrinógeno que lleva a la coagulación cuando se usa como tal en medios de cultivo. Este tipo de soluciones actualmente requieren la adición de heparina para evitar la coagulación, aunque la heparina en sí misma procede de animales no humanos, lo que anula la ventaja de usar un PL con respecto al FBS. Además, este método requiere mucho tiempo y trabajo. El método de activación plaquetaria (ii) utiliza activadores plaquetarios, como la trombina. Sin embargo, el uso de trombina actualmente no está aprobado para uso clínico posterior en humanos. En la mayoría de los casos, la trombina también es de naturaleza no humana (por ejemplo, bovina). Como alternativa, las plaquetas se pueden activar mediante la adición de al menos 15 μmol por ml de sales de calcio. Sin embargo, estas provocarán la precipitación del fosfato en el contexto de composiciones ricas en plaquetas que están suplementadas con soluciones aditivas de plaquetas usadas a menudo en los bancos de sangre de todo el mundo. El cultivo de tejidos se efectúa (generalmente) a un pH constante de 7,4 que se mantiene mediante un sistema tampón de carbonato en una incubadora humidificada de temperatura controlada. A este pH, el calcio y el fosfato tienen una solubilidad teórica combinada de 1,7 mM. Esto implica que cuando ambos iones (Ca^{2+} y HPO_4^{2-}) están presentes en solución a pH 7,4 en una concentración $\geq 1,7$ mM, es probable que se produzca la precipitación. De manera adicional, es probable que la precipitación también se produzca más rápido en soluciones que contienen iones carbonato. En la técnica anterior, en métodos para la preparación de liberados ricos en plaquetas se usa Ca^{2+} para activar las plaquetas y la concentración utilizada a menudo da como resultado una concentración final de Ca^{2+} en el medio de cultivo eventual por encima de 1,7 mM con fracciones normales de liberado rico en plaquetas del 10 % (v/v). Asimismo, cuando el liberado se prepara a partir de concentrados de plaquetas que se almacenan en modernas soluciones aditivas de plaquetas, también la concentración de HPO_4^{2-} excederá esta regla de solubilidad y se producirá la precipitación. Dicho complejo de calcio precipita células en estrés cultivadas en un medio de cultivo que comprende el PR obtenido mediante el método de activación plaquetaria (ii) usando al menos 15 μmol por ml de sales de calcio.

De manera adicional, es deseable limitar la cantidad de calcio ionizado en los medios de cultivo celular porque es bien conocido que los iones de calcio funcionan en vías de señalización y, por lo tanto, pueden influir en una variedad de funciones celulares en casi todas las células de los mamíferos. El calcio también actúa como cofactor crítico para muchas enzimas y participa en la secreción celular. Las concentraciones de Ca^{2+} extracelular, por lo tanto, están estrictamente reguladas. Las concentraciones de calcio total en plasma humano tienen un intervalo normal de 2,2 a 2,6 mM. El elemento está unido a varias proteínas plasmáticas, dejando una concentración de Ca^{2+} ionizado libre

estrechamente controlada de 1,1-1,4 mM. Estos niveles se mantienen activamente dentro de este estrecho margen y rara vez fluctúan más del 5 % a lo largo del tiempo (Atchison, D.K. y Beierwites, W. H. *European Journal of Physiology*, 2013;465(l):59-69). Desviaciones de la concentración del Ca^{2+} en la fisiología humana conducen a una hipocalcemia o a una hipercalcemia, y enfermedades concordantes. En consecuencia, Idealmente, la concentración de Ca^{2+} en medios de cultivo de tejidos se controla de manera similar. Por ejemplo, el cultivo *ex-vivo* de condrocitos requiere un control cuidadoso del Ca^{2+} para mantener el fenotipo (Gigout, A. *et al*, *Osteo Arthritis and Cartilage* 2005;13:1012e1024). Esta es la razón por la que los proveedores comerciales de medios de cultivo de tejidos proporcionan medios basales con (por ejemplo, Gibco Cat No 11960) y sin (por ejemplo, Gibco Cat No 21068) Ca^{2+} añadido.

Así, existe la necesidad de métodos nuevos, rápidos y clínicamente relevantes para preparar productos derivados de plaquetas.

Sumario de la invención

Tal como lo corrobora la sección experimental, que ilustra determinadas realizaciones representativas de la invención, los inventores han descubierto que se puede preparar un liberado o un lisado de plaquetas a partir de una muestra de una composición de sangre rica en plaquetas obtenida de un sujeto, tal como un concentrado de plaquetas humanas caducado, usando de 0,010 g a 0,60 g de partículas de vidrio por ml de dicha muestra y de 1,0 μmol a 12,0 μmol de una o más sales de calcio solubles en agua por ml de dicha muestra. El método actualmente reivindicado proporciona un medio para reducir al máximo la concentración de Ca^{2+} final. Los presentes inventores han calculado que una concentración de Ca^{2+} final de aproximadamente 0,8 mM en el liberado total de plaquetas (100%) permite que permanezca por debajo de la solubilidad del fosfato de calcio cuando se usa en una fracción del 10 % (v/v) en un medio de cultivo normal.

Adicionalmente, los presentes inventores han desarrollado un sistema cerrado, estéril, para preparar un liberado de plaquetas o un lisado de plaquetas. Además, los presentes inventores han descubierto que el liberado de plaquetas obtenido de este modo se puede usar en un cultivo celular o un cultivo de tejidos como sustituto de aditivos séricos tales como el suero fetal bovino (FBS). Se ha encontrado que los liberados de plaquetas enseñados en el presente documento no inducen precipitaciones en el medio de crecimiento. Adicionalmente, los liberados o lisados de plaquetas enseñados en el presente documento también se pueden usar en el tratamiento de lesiones de tejidos duros y blandos, enfermedades inflamatorias, enfermedades óseas, enfermedades degenerativas de las articulaciones, discopatías degenerativas, afecciones cutáneas, alopecia areata, enfermedad endometrial, atrofia vaginal, enfermedad de la superficie ocular, síndrome del túnel carpiano, trastornos neurodegenerativos, arteriopatía periférica y dolor, y para mejorar el aspecto de la piel y/o del cabello.

Por consiguiente, la invención proporciona los siguientes aspectos:

Aspecto 1. Uso de una cantidad de una o más sales de calcio solubles en agua y una cantidad de partículas de vidrio para preparar un liberado de plaquetas a partir de una muestra de una composición de sangre rica en plaquetas obtenida de un sujeto, en donde dicha cantidad de partículas de vidrio es de 0,010 g por ml a 0,60 g por ml de dicha muestra y dicha cantidad de la una o más sales de calcio solubles en agua es de 1,0 μmol por ml a 12,0 μmol por ml de dicha muestra.

Aspecto 2. Un sistema para preparar un liberado de plaquetas que comprende

- un primer contenedor (1) que tiene un primer espacio contenedor (1') en donde dicho primer espacio contenedor (1')

- está configurado para recibir una cantidad (Q_{bc}) de una composición de sangre rica en plaquetas comprendida en un segundo espacio contenedor (2') de un segundo contenedor (2);

- contiene una cantidad (Q_{gp}) de partículas de vidrio (3); y

- contiene una cantidad (Q_{cc}) de una o más sales de calcio solubles en agua (4) o está configurado para recibir una cantidad (Q_{cc}) de una o más sales de calcio solubles en agua (4) contenidas en un tercer espacio contenedor (5') de un tercer contenedor (5);

en donde la relación Q_{gp}/Q_{bc} es de 0,010 a 0,60 g por ml de dicha muestra y la relación $Q_{cc}:Q_{bc}$ es de 1,0 a 12,0 μmol por ml de dicha muestra.

Aspecto 3. El sistema de acuerdo con el aspecto 2, que comprende además un primer tubo cuyo extremo proximal está sujeto por una primera abertura en el primer espacio contenedor (1') y el extremo distal está sujeto por una abertura en el tercer espacio contenedor (5'), en donde el tubo está configurado para conectar el primer contenedor (1) al tercer contenedor (5) y para poner el primer espacio contenedor (1') en comunicación fluida con el tercer espacio contenedor (5').

Aspecto 4. El sistema de acuerdo con el aspecto 3, en donde el primer tubo comprende medios para interrumpir de

manera reversible la comunicación fluida entre el primer espacio contenedor (1') y el tercer espacio contenedor (5'), preferentemente en donde dichos medios son una abrazadera externa o una válvula.

5 Aspecto 5. El sistema de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 2 a 4, en donde el primer espacio contenedor (1') comprende además

- una segunda abertura configurada para conectarse a una abertura del segundo espacio contenedor (2') de un segundo contenedor (2); y
- 10 - una tercera abertura configurada para conectarse a una abertura de un cuarto espacio contenedor de un cuarto contenedor, en donde el cuarto espacio contenedor está configurado para recibir y/o contener el liberado de plaquetas preparada usando el sistema.

Aspecto 6. El sistema de acuerdo con el aspecto 5, que comprende además

- 15 - un segundo tubo cuyo extremo proximal está sujeto por la segunda abertura en el primer espacio contenedor (1') y el extremo distal se puede conectar al segundo espacio contenedor (2'), en donde el segundo tubo está configurado para conectar el primer contenedor (1) al segundo contenedor (2) y para poner el primer espacio contenedor (1') en comunicación fluida con el segundo espacio contenedor (2');
- 20 - un tercer tubo cuyo extremo proximal está sujeto por la tercera abertura en el primer espacio contenedor (1') y el extremo distal se puede conectar a un cuarto espacio contenedor de un cuarto contenedor, en donde el tubo está configurado para conectar el primer contenedor (1) con el cuarto contenedor, y para poner el primer espacio contenedor (1') en comunicación fluida con el cuarto espacio contenedor; y
- 25 - opcionalmente medios de filtración (7) que están situados entre la tercera abertura en el primer espacio contenedor (1') y el cuarto espacio contenedor.

Aspecto 7. El sistema de acuerdo con el aspecto 6, en donde el extremo distal del segundo tubo se puede conectar al segundo espacio contenedor (2') y/o el extremo distal del tercer tubo se puede conectar al cuarto espacio contenedor mediante soldadura.

30 Aspecto 8. El sistema de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 2 a 7, en donde la relación $Q_{gp}:Q_{bc}$ es de 0,10 a 0,40 g por ml de dicha muestra y la relación $Q_{cc}:Q_{bc}$ es de 3,0 a 8,0 μmol por ml de dicha muestra.

Aspecto 9. Uso del sistema de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 2 a 8, para producir un liberado de plaquetas o un lisado de plaquetas.

35 Aspecto 10. Un método para preparar un liberado de plaquetas a partir de una muestra de una composición de sangre rica en plaquetas obtenida de un sujeto que comprende las etapas de:

- 40 a) poner en contacto dicha muestra con una cantidad de 0,010 g a 0,60 g de partículas de vidrio por ml de dicha muestra y una cantidad de 1,0 μmol a 12,0 μmol de una o más sales de calcio solubles en agua por ml de dicha muestra, y obtener así una mezcla;
- b) dejar que la mezcla obtenida en la etapa a) coagule obteniendo así un coágulo y un liberado de plaquetas; y
- c) recuperar de la mezcla el liberado de plaquetas obtenido en la etapa b).

45 Aspecto 11. El uso de acuerdo con el aspecto 1 o el método de acuerdo con el aspecto 10, en donde dicha muestra se pone en contacto con una cantidad de 0,10 g a 0,40 g de partículas de vidrio por ml de dicha muestra y una cantidad de 3,0 μmol a 8,0 μmol de una o más sales de calcio solubles en agua por ml de dicha muestra.

50 Aspecto 12. El uso de acuerdo con el aspecto 1, el sistema de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 2 a 8, o el método de acuerdo con el aspecto 10 u 11, en donde dichas partículas de vidrio tienen un diámetro promedio de 1,0 mm a 5,0 mm, preferentemente de 2,0 mm a 4,0 mm.

55 Aspecto 13. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 1, 11 o 12, el sistema de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 2 a 8 o 12, o el método de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 10 a 12, en donde dichas partículas de vidrio son partículas de vidrio a base de sílice, preferentemente partículas de vidrio de sílice sódico-cálcico o vidrio sódico-cálcico, partículas de vidrio de borosilicato de sodio, partículas de vidrio de aluminosilicato, partículas de vidrio de óxido de plomo o partículas de vidrio de sílice fundida.

60 Aspecto 14. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 1 u 11 a 13, el sistema de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 2 a 8, 12 o 13, o el método de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 10 a 13, en donde dicha una o más sales de calcio solubles en agua se seleccionan entre el grupo que consiste en cloruro de calcio, hidróxido de calcio, acetato de calcio, carbonato de calcio, bicarbonato de calcio, clorato de calcio, perclorato de calcio, sulfato de calcio, nitrato de calcio, nitrito de calcio, lactato de calcio, glucobionato de calcio, gluceptato de calcio y gluconato de calcio, o mezclas de estos, preferentemente cloruro de calcio.

65 Aspecto 15. El método de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 10 a 14, en donde en la etapa c) dicho liberado

de plaquetas obtenido en la etapa b) se recupera de la mezcla haciendo pasar la mezcla a través de al menos un filtro.

5 Aspecto 16. El método de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 10 a 15, en donde en la etapa b) se deja que dicha mezcla coagule durante un período de 1 hora a 20 horas, preferentemente durante un periodo de 2 a 6 horas, más preferentemente durante un periodo de 2 a 4 horas.

10 Aspecto 17. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 1 u 11 a 14, o el método de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 10 a 16, en donde dicha composición de sangre rica en plaquetas se selecciona entre un concentrado de plaquetas, plasma y sangre entera, preferentemente un concentrado de plaquetas.

Aspecto 18. El método de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 10 a 17, que comprende además una etapa de lisis de las plaquetas presentes en el coágulo obtenido y/o el liberado de plaquetas obtenido en la etapa b), obteniendo así un lisado de plaquetas.

15 Aspecto 19. Un liberado de plaquetas obtenido mediante el método de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 10 a 17, preferentemente en donde tal liberado tiene una concentración final de iones calcio (Ca^{2+}) de menos de 0,8 mM en el liberado total de plaquetas (100 %).

20 Aspecto 20. Un lisado de plaquetas obtenido mediante el método de acuerdo con el aspecto 18, preferentemente en donde tal liberado tiene una concentración final de iones calcio (Ca^{2+}) de menos de 0,8 mM en el liberado total de plaquetas (100 %).

25 Aspecto 21. Una composición farmacéutica que comprende el liberado de plaquetas de acuerdo con el aspecto 19 o el lisado de plaquetas de acuerdo con el aspecto 20.

Aspecto 22. Una composición cosmética que comprende el liberado de plaquetas de acuerdo con el aspecto 19 o el lisado de plaquetas de acuerdo con el aspecto 20.

30 Aspecto 23. Una composición que comprende una composición de sangre rica en plaquetas, de 1,0 mM a 12,0 mM de iones Ca^{2+} , además de los iones Ca^{2+} presentes en la composición de sangre rica en plaquetas, y de 0,010 g a 0,60 g de partículas de vidrio por ml de dicha composición de sangre rica en plaquetas.

Aspecto 24. Un contenedor que comprende la composición de acuerdo con el aspecto 23.

35 Aspecto 25. El liberado de plaquetas de acuerdo con el aspecto 19, el lisado de plaquetas de acuerdo con el aspecto 20 o la composición farmacéutica de acuerdo con el aspecto 21 para su uso en medicina.

40 Aspecto 26. El liberado de plaquetas de acuerdo con el aspecto 19, el lisado de plaquetas de acuerdo con el aspecto 20 o la composición farmacéutica de acuerdo con el aspecto 21 para su uso en el tratamiento de lesiones de tejidos duros y blandos, enfermedades inflamatorias, enfermedades óseas, enfermedades degenerativas de las articulaciones, discopatías degenerativas, afecciones cutáneas, alopecia areata, enfermedad endometrial, atrofia vaginal, enfermedad de la superficie ocular, síndrome del túnel carpiano, trastornos neurodegenerativos, arteriopatía periférica y dolor, que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz del liberado de plaquetas, el lisado de plaquetas o la composición farmacéutica.

45 Aspecto 27. Uso del liberado de plaquetas de acuerdo con el aspecto 19, el lisado de plaquetas de acuerdo con el aspecto 20 o la composición cosmética de acuerdo con el aspecto 22 para mejorar el aspecto de la piel y/o del cabello.

50 Aspecto 28. Uso del liberado de plaquetas de acuerdo con el aspecto 19 o del lisado de plaquetas de acuerdo con el aspecto 20 en un cultivo celular o un cultivo de tejidos.

Estos y otros aspectos y realizaciones preferentes de la invención se describen en las siguientes secciones y en las reivindicaciones adjuntas. La materia objeto de las reivindicaciones adjuntas se incorpora en el presente documento específicamente en esta memoria descriptiva.

55 **Descripción de los dibujos**

60 **Figura 1.** (A) Coagulación de un concentrado de plaquetas (PC) que contiene un 30 % (v/v) de plasma con CaCl_2 , solo o combinado con perlas de vidrio. (B) Coágulo obtenido combinando CaCl_2 15 mM y 40 ml de PC (recuadro izquierdo) o combinando 10 g de perlas de vidrio, CaCl_2 4 mM y 40 ml de PC (recuadro derecho).

65 **Figura 2.** Sistema de preparación de un liberado de plaquetas humanas (hPR) en un sistema cerrado. (A) El PC se transfiere desde el espacio contenedor (2') de una bolsa de PC (2) al espacio contenedor (1') de una bolsa de transferencia (1) que comprende perlas de vidrio (3) y CaCl_2 (4). Después de la transferencia del PC al espacio contenedor (1'), la solución se deja que coagule. La bolsa de transferencia puede estar acoplada a medios de filtración (7) para separar el liberado de plaquetas obtenido tras la coagulación en las perlas de vidrio, del coágulo y

opcionalmente de desechos y material en partículas. La bolsa de transferencia se puede eluir a un recipiente (6). (B) El PC se transfiere desde el espacio contenedor (2') de una bolsa de PC (2) al espacio contenedor (1') de una bolsa de transferencia (1) que comprende perlas de vidrio (3). El espacio contenedor (1') de la bolsa de transferencia (1) está unido al espacio contenedor (5') de una bolsa (5) que comprende CaCl_2 (4) que está sellada por una válvula de ruptura. Después de la transferencia del CaCl_2 al espacio contenedor (1') de una bolsa de transferencia (1) que comprende el PC y las perlas de vidrio, la solución se deja que coagule. La bolsa de transferencia puede estar acoplada a medios de filtración (7) para separar el liberado de plaquetas obtenido tras la coagulación en las perlas de vidrio, del coágulo y opcionalmente de desechos y material en partículas. La bolsa de transferencia se puede eluir a un recipiente (6).

Figura 3. Coágulo obtenido mediante los métodos enseñados en el presente documento en una bolsa de transferencia (A) y retirado de la bolsa (B).

Figura 4. Velocidad de retracción con diferentes pesos de perlas de vidrio y diferentes concentraciones de Ca^{2+} .

Figura 5. (A) Rendimiento de liberado en un PC (40 ml) coagulado con pesos variables de perlas de vidrio y concentraciones variables de Ca^{2+} . (B) Rendimiento de liberado en un PC (350 ml) coagulado con CaCl_2 15 mM por ml de PC o con CaCl_2 4 mM y 0,20 g de perlas de vidrio por ml de PC.

Figura 6. La concentración remanente de Ca^{2+} en el liberado de plaquetas obtenido una vez completada la coagulación. Esto se determina en un analizador de gases en sangre que utiliza un electrodo selectivo de iones Ca^{2+} .

Figura 7. Efecto de la adición de un 10 % (v/v) de liberado de plaquetas humanas obtenido a partir de un concentrado de plaquetas que comprende un 65 % de una solución aditiva de plaquetas usando CaCl_2 15 mM sin perlas de vidrio (recuadro izquierdo) o efecto de la adición de suero fetal bovino (FBS) (recuadro derecho) a un medio de cultivo celular Eagle modificado por Dulbecco (DMEM).

Figura 8. Efecto de la adición de un liberado de plaquetas humanas al medio de cultivo celular DMEM. (A) medio de crecimiento con un 10 % (v/v) de hPR preparado con CaCl_2 15 mM; (B) medio de crecimiento sin hPR; (C) medio de crecimiento con un 10 % (v/v) de hPR preparado sin calcio; (D) medio de crecimiento con un 10 % (v/v) de hPR preparado con CaCl_2 4 mM y 0,20 g/ml de perlas de vidrio; y (E) medio de crecimiento con un 10 % (v/v) de hPR preparado con CaCl_2 5 mM y 0,20 g/ml de perlas de vidrio.

Figura 9. Tiempo de duplicación celular de células madre mesenquimatosas (MSC) derivadas de tejido adiposo cultivadas en medio de crecimiento DMEM suplementado con diferentes tipos de hPR al 10 % (v/v). El hPR "estándar" se produjo mediante dos ciclos de congelación y descongelación con centrifugación posterior. El hPR con " CaCl_2 + perlas de vidrio" se preparó con CaCl_2 5 mM y 0,2 g de perlas de vidrio sódico-cálcico por ml de PC. Se incluyeron tres competidores comerciales, el FBS se incluyó como producto de referencia.

Figura 10. Imágenes de microscopía de MSC cultivadas en medio de crecimiento DMEM suplementado con (A) un 10 % (v/v) de hPR preparado con CaCl_2 15 mM sin perlas de vidrio y (B) un 10 % (v/v) de hPR preparado con CaCl_2 4 mM y 0,20 g de perlas de vidrio por ml de PC.

Figura 11. Descripción esquemática de las condiciones experimentales y resultados del ejemplo 8. En la fila superior se indican las diferentes concentraciones de CaCl_2 , mientras que en la columna de la izquierda se indican los diferentes pesos y concentraciones de partículas de vidrio. La ausencia de retracción en menos de 3 h se indica con una "X", mientras que la retracción satisfactoria en menos de 3 h se indica con una "V".

Figura 12. Descripción esquemática de las condiciones experimentales y resultados del ejemplo 9. En la fila superior se indican las diferentes concentraciones de CaCl_2 , mientras que en la columna de la izquierda se indican los diferentes pesos y concentraciones de partículas de vidrio. La ausencia de retracción se indica con una "X", mientras que la retracción satisfactoria en menos de 3 h se indica con una "V". Un círculo abierto indica la retracción del coágulo en un periodo de entre 3 h y 21 h.

Figura 13. Concentración de Ca^{2+} (calcio ionizado) en liberados de plaquetas preparadas según la técnica anterior citada. En un experimento pareado se trataron concentrados de plaquetas en solución aditiva (PAS-plasma) o en plasma puro (Plasma) con el método reivindicado (TReC) o con los de los documentos de la técnica anterior.

Figura 14. Precipitación de complejos químicos de fosfato (PO_4^{3-} con calcio (Ca^{2+}) en medios de cultivo de tejidos.

Descripción detallada de la invención

Tal como se usan en el presente documento, las formas en singular "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen las referencias en singular y plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Los términos y expresiones "que comprende" o "que comprenden", "comprende", "compuesto por", "compuesta por",

tal como se usan en el presente documento, son sinónimos de "que incluye", "incluye" o "que contiene", "contiene", y son inclusivos o abiertos y no excluyen miembros, elementos o etapas de método adicionales no citados. Los términos y expresiones también abarcan "que consiste en", "que consisten en", "que consiste esencialmente en" y "que consisten esencialmente en", que gozan de significados bien establecidos en la terminología de patentes.

5 La enumeración de intervalos numéricos mediante valores extremos incluye todos los números y fracciones incluidos dentro de los intervalos respectivos, así como los valores extremos enumerados.

10 Los términos "sobre" o "aproximadamente", tal como se usan en el presente documento, cuando se refiere a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal y similares, pretenden abarcar variaciones de y desde el valor especificado, tales como variaciones de \pm un 10 % o menos, preferentemente \pm un 5 % o menos, más preferentemente \pm un 1 % o menos y todavía más preferentemente \pm un 0,1 % o menos de y desde el valor especificado, en la medida en que dichas variaciones sean adecuadas para aplicar en la invención divulgada. Debe entenderse que el valor al que se refiere el modificador "aproximadamente" también se divulga en sí mismo de forma específica y preferente.

15 Mientras que las expresiones "uno o más" o "al menos uno", tal como uno o más miembros o al menos uno o más miembros de un grupo de miembros, son claras *per se*, por medio de más ejemplos, las expresiones abarcan, entre otras cosas, una referencia a uno cualquiera de dichos miembros, o a dos cualquiera o más de dichos miembros, tal como, por ejemplo, 3 cualquiera o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, etc. de dichos miembros, y hasta la totalidad de dichos miembros. En otro ejemplo, "uno o más" o "al menos uno" puede referirse a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más.

20 La discusión de los antecedentes de la invención en el presente documento se incluye para explicar el contexto de la invención. Esto no debe considerarse como una admisión de que alguno de los materiales mencionados fuera publicado, conocido, o parte del conocimiento general común en cualquier país a partir de la fecha de prioridad de cualquiera de las reivindicaciones.

25 A lo largo de la presente divulgación se hace referencia a diversas publicaciones, patentes y memorias descriptivas de patente publicadas mediante una cita identificativa.

30 A menos que se definan lo contrario, todos los términos usados para divulgar la invención, incluidos los términos técnicos y científicos, tienen el significado que entiende comúnmente un experto habitual en la materia a la cual pertenece la presente invención. Por medio de una guía adicional, se incluyen definiciones de términos y expresiones para apreciar mejor la enseñanza de la invención. Cuando se definen términos específicos con relación a un aspecto particular de la invención o una realización particular de la invención, dicha connotación debe aplicarse a lo largo de esta memoria descriptiva, es decir, también en el contexto de otros aspectos o realizaciones de la invención, salvo que se defina lo contrario.

35 En los siguientes pasajes, se definen diferentes aspectos o realizaciones de la invención con más detalle. Cada aspecto o realización así definido se puede combinar con cualquier otro aspecto o aspectos a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferente o ventajosa se puede combinar con cualquier otra característica o características indicadas como preferentes o ventajosas.

40 La referencia a lo largo de la presente memoria descriptiva a "una sola realización", "una realización" significa que una característica, estructura o rasgo particular descrito con respecto a la realización está incluido en al menos una realización de la presente invención. Así, las apariciones de las expresiones "en una sola realización" o "en una realización" en diversos lugares a lo largo de la presente memoria descriptiva no se refieren todas necesariamente a la misma realización, pero podrían. Además, las características, las estructuras o los rasgos particulares se pueden combinar de cualquier manera adecuada, como sería evidente para una persona experta en la técnica a partir de la presente divulgación, en una o más realizaciones. Además, aunque algunas realizaciones descritas en el presente documento incluyen algunos, pero no otros, rasgos incluidos en otras realizaciones, las combinaciones de características de diferentes realizaciones se entiende que se encuentran dentro del alcance de la invención y forman diferentes realizaciones, tal como entenderían los expertos en la materia. Por ejemplo, en las reivindicaciones adjuntas, cualquiera de las realizaciones reivindicadas se puede usar en cualquier combinación.

45 Tal como lo corrobora la sección experimental, que ilustra determinadas realizaciones representativas de la invención, los inventores han descubierto que se puede preparar un liberado de plaquetas a partir de una muestra de una composición de sangre rica en plaquetas obtenida de un sujeto, tal como un concentrado de plaquetas humanas caducado, usando de 0,010 g a 0,60 g de partículas de vidrio por ml de dicha muestra y de 1,0 μ mol a 12,0 μ mol de una o más sales de calcio solubles en agua por ml de dicha muestra. Además, los presentes inventores han descubierto que el liberado de plaquetas obtenido de este modo se puede usar en un cultivo celular o un cultivo de tejidos como sustituto de aditivos séricos tales como el suero fetal bovino (FBS). Se ha encontrado que los liberados de plaquetas enseñados en el presente documento no inducen precipitaciones en el medio de crecimiento. Adicionalmente, los liberados de plaquetas enseñados en el presente documento también se pueden usar en el tratamiento de lesiones de tejidos duros y blandos, enfermedades inflamatorias, enfermedades óseas, enfermedades

degenerativas de las articulaciones, discopatías degenerativas, afecciones cutáneas, alopecia areata, enfermedad endometrial, atrofia vaginal, enfermedad de la superficie ocular, síndrome del túnel carpiano, trastornos neurodegenerativos, arteriopatía periférica y dolor, y para mejorar el aspecto de la piel y/o del cabello.

5 De acuerdo con ello, un primer aspecto proporciona el uso de una cantidad de una o más sales de calcio solubles y una cantidad de partículas de vidrio para preparar un liberado de plaquetas a partir de una muestra de una composición de sangre rica en plaquetas obtenida de un sujeto, en donde dicha cantidad de partículas de vidrio es de 0,010 g a 0,60 g por ml de dicha muestra y dicha cantidad de la una o más sales de calcio solubles en agua es de 1,0 μmol a 12,0 μmol por ml de dicha muestra.

10 La expresión "liberado de plaquetas" o "secretoma de plaquetas" tal como se usa en el presente documento se refiere a una solución que comprende los contenidos granulares y exosomales secretados por una o más plaquetas activadas. Ejemplos no limitantes de los contenidos granulares y exosomales incluyen factores de coagulación, moléculas pequeñas, equivalentes de energía, quimiocinas, citocinas, moléculas de adhesión, hormonas, moléculas inmunológicas y reguladores del crecimiento (o factores de crecimiento), división celular, apoptosis y/o angiogénesis, y factores de unión. En realizaciones particulares, la expresión no abarca el lisado de plaquetas. La expresión "lisado de plaquetas", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una solución que comprende el contenido de una o más plaquetas lisadas. El término también puede abarcar el liberado de plaquetas. Los métodos para obtener un lisado de plaquetas son conocidos en la técnica y comprenden la congelación y descongelación de plaquetas.

20 Preferentemente, el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas está sustancialmente exento de células (es decir, como máximo 50 000 células por μl de liberado o lisado de plaquetas, preferentemente como máximo 40 000 células por μl de liberado o lisado de plaquetas). El término "célula", tal como se usa en el presente documento, no abarca vesículas extracelulares.

25 A menos que se indique lo contrario, los términos "sujeto" o "paciente" se pueden usar indistintamente y pueden referirse a animales, preferentemente animales de sangre caliente, más preferentemente vertebrados, incluso más preferentemente mamíferos tales como chimpancés y otras especies de simios y monos, ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras, caballos, perros, gatos, ratones, ratas, cobayas y similares, aún más preferentemente primates y, en concreto, incluyen a pacientes humanos y a mamíferos y primates no humanos. Los sujetos preferentes son sujetos humanos. Los términos "sujeto" o "paciente" incluyen sujetos que necesitan tratamiento, más en particular, sujetos que se beneficiarían del tratamiento de una afección determinada, especialmente lesiones de tejidos duros y blandos, enfermedades inflamatorias, enfermedades óseas, enfermedades degenerativas de las articulaciones, discopatías degenerativas, afecciones cutáneas, alopecia areata, enfermedad endometrial, atrofia vaginal, enfermedad de la superficie ocular, síndrome del túnel carpiano, trastornos neurodegenerativos, arteriopatía periférica y dolor. Dichos sujetos pueden incluir, sin limitación, los que han sido diagnosticados de dicha afección, los propensos a desarrollar dicha afección y/o aquellos en quienes se debe prevenir dicha afección. Los términos "sujeto" o "paciente" incluyen sujetos que necesitan un aspecto mejorado de la piel y/o del cabello. El término "sujeto" o "paciente" incluye sujetos o pacientes tanto en singular como en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

40 La expresión "composición de sangre rica en plaquetas", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una composición derivada de sangre entera que comprende al menos 50 000, preferentemente al menos 600 000 plaquetas por μl o al menos 800 000 plaquetas por μl . Ejemplos no limitantes de composiciones de sangre ricas en plaquetas son un concentrado de plaquetas (tal como un concentrado de plaquetas derivado de la capa leucoplaquetaria, un concentrado de plaquetas para aféresis o un concentrado de plaquetas derivado de plasma rico en plaquetas), sangre entera, plasma sanguíneo y plasma rico en plaquetas. Métodos para obtener un concentrado de plaquetas, un plasma sanguíneo o un plasma rico en plaquetas a partir de sangre entera son conocidos en la técnica e incluyen la centrifugación diferencial y métodos como los descritos en Hardwick J., *Blood processing*. 2008. 3(20): 148-176, y especialmente págs. 164 a 175, incluyendo la aféresis, la agrupación de capas leucoplaquetarias o la producción de plasma rico en plaquetas.

50 Preferentemente, la composición de sangre rica en plaquetas no comprende sustancialmente glóbulos blancos (por ejemplo, menos de 10 glóbulos blancos por μl , preferentemente menos de 5 glóbulos blancos por μl) y/o menos de 4000 glóbulos rojos por μl .

55 Los términos o expresiones "muestra" o "muestra biológica" tal como se usan a lo largo de esta memoria descriptiva con referencia a una composición de sangre rica en plaquetas obtenida (aislada, extraída) de un sujeto abarca muestras de una composición de sangre rica en plaquetas obtenida directa o indirectamente (aislada, extraída) del sujeto. Las muestras obtenidas indirectamente de una composición de sangre rica en plaquetas incluyen muestras obtenidas mediante procesamiento de sangre entera, que se puede obtener directamente del sujeto, para llegar a una composición de sangre rica en plaquetas, tal como mediante aféresis o centrifugación. Preferentemente, se puede obtener fácilmente una muestra mediante métodos mínimamente invasivos, tales como la extracción de sangre ("biopsia líquida"), permitiendo proporcionar/extraer/aislar la muestra de un sujeto.

65 En realizaciones particulares, la muestra es una muestra agrupada, lo que significa que la muestra se toma a partir de un único conjunto de muestras, en donde el conjunto de muestras comprende muestras de dos o más sujetos y/o

muestras de un único sujeto tomadas en diferentes momentos.

En realizaciones particulares, la muestra tiene un volumen de 5,0 ml a 50 000,0 ml, de 10,0 ml a 10 000,0 ml, de 10,0 ml a 5000,0 ml, de 10,0 ml a 2500,0 ml, de 10,0 ml a 1000,0 ml, de 50,0 ml a 750,0 ml, de 50,0 ml a 500,0 ml, de 100,0 ml a 500,0 ml, de 150,0 ml a 450,0 ml, preferentemente de 100,0 a 500,0 ml.

El término "concentrado de plaquetas", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una composición de sangre rica en plaquetas que comprende al menos 50 000 plaquetas por μl , preferentemente al menos 600 000 plaquetas por μl o al menos 800 000 plaquetas por μl , y plasma y/o una o más soluciones aditivas de plaquetas (por ejemplo, una solución de almacenamiento de plaquetas (SSP+)). La solución aditiva de plaquetas se puede utilizar para reemplazar parte del plasma (por ejemplo, del 5,0 al 95,0 % (v/v)). El concentrado de plaquetas se puede preparar mediante cualquier método conocido en la técnica para preparar concentrados de plaquetas tal como se describe en Hardwick J., *Blood processing*. 2008. 3(20):148-176, y especialmente págs. 164 a 175, incluyendo la aféresis, la agrupación de capas leucoplaquetarias o la producción de plasma rico en plaquetas. De acuerdo con ello, la expresión "concentrado de plaquetas" también abarca el plasma rico en plaquetas, tal como un plasma concentrado rico en plaquetas, que normalmente no comprende una solución aditiva de plaquetas.

Preferentemente, el concentrado de plaquetas no comprende sustancialmente glóbulos blancos (por ejemplo, menos de 10 glóbulos blancos por μl , preferentemente menos de 5 glóbulos blancos por μl).

En realizaciones particulares, la composición de sangre rica en plaquetas comprende al menos 50 000 plaquetas por μl , al menos 100 000 plaquetas por μl , al menos 200 000 plaquetas por μl , al menos 300 000 plaquetas por μl , al menos 400 000 plaquetas por μl , al menos 500 000 plaquetas por μl , al menos 600 000 plaquetas por μl , al menos 700 000 plaquetas por μl , al menos 800 000 plaquetas por μl , al menos 900 000 plaquetas por μl o al menos 1 000 000 plaquetas por μl , preferentemente al menos 600 000 plaquetas por μl o al menos 800 000 plaquetas por μl . Por ejemplo, de 800 000 a 1 200 000 plaquetas por μl . La composición de sangre rica en plaquetas puede comprender de 100 000 a 3 000 000 de plaquetas por μl , de 200 000 a 2 000 000 plaquetas por μl , o de 200 000 a 1 500 000 plaquetas por μl , preferentemente de 200 000 a 2 000 000 plaquetas por μl , más preferentemente de 800 000 a 1 200 000 plaquetas por μl .

En realizaciones particulares, la composición de sangre rica en plaquetas comprende al menos un 5,0 % (v/v), al menos un 10,0 % (v/v), al menos un 15,0 % (v/v), al menos un 20,0 % (v/v), al menos un 25,0 % (v/v), al menos un 30,0 % (v/v), al menos un 35,0 % (v/v), al menos un 40,0 % (v/v), al menos un 45,0 % (v/v), al menos un 50,0 % (v/v), al menos un 55,0 % (v/v), al menos un 60,0 % (v/v), al menos un 65,0 % (v/v), al menos un 70,0 % (v/v), al menos un 75,0 % (v/v) o al menos un 85,0 % (v/v), preferentemente al menos un 30,0 % (v/v) de plasma. El plasma normalmente comprende uno o más factores de coagulación, tales como el factor de coagulación I, factor II, factor III, factor IV, factor V, factor VI, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor XII y/o factor XIII. Preferentemente, el uno o más factores de coagulación están presentes en el plasma en niveles fisiológicos normales (es decir, la concentración fisiológica de dicho uno o más factores de coagulación en sujetos sanos).

En realizaciones particulares, la composición de sangre rica en plaquetas se selecciona entre un concentrado de plaquetas, plasma (tal como un plasma rico en plaquetas) y sangre entera. En realizaciones más particulares, la composición de sangre rica en plaquetas es un concentrado de plaquetas o un plasma rico en plaquetas, preferentemente un concentrado de plaquetas.

En realizaciones particulares, el concentrado de plaquetas comprende al menos 600 000 plaquetas por μl , al menos 700 000 plaquetas por μl , al menos 800 000 plaquetas por μl , al menos 900 000 plaquetas por μl o al menos 1 000 000 plaquetas por μl , preferentemente al menos 1 000 000 plaquetas por μl .

En realizaciones particulares, el concentrado de plaquetas comprende de 600 000 a 3 000 000 de plaquetas por μl , de 700 000 a 2 500 000 plaquetas por μl , de 800 000 a 2 000 000 plaquetas por μl o de 800 000 a 1 500 000 plaquetas por μl .

En realizaciones particulares, el concentrado de plaquetas es un concentrado de plaquetas obtenido por aféresis o de la capa leucoplaquetaria. En realizaciones particulares, el concentrado de plaquetas es un concentrado de plaquetas preparado y aprobado para uso médico en transfusiones, por ejemplo, por un médico u otro profesional clínico tal como una enfermera.

La expresión "solución aditiva de plaquetas" o "PAS", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una solución de electrolitos para la conservación de plaquetas. Las soluciones aditivas de plaquetas normalmente comprenden acetato y opcionalmente potasio, magnesio y/o fosfato. La solución aditiva de plaquetas puede prolongar el tiempo de conservación de las plaquetas, reducir la activación plaquetaria, mejorar la funcionalidad de las plaquetas, mantener el pH y reducir las reacciones alérgicas. La solución aditiva de plaquetas puede ser cualquier solución aditiva de plaquetas conocida en la técnica, por ejemplo tal como la descrita en la tabla 1 de Tynngard *et al.* "Preparation, storage and quality control of platelet concentrates". 2009. *Transfusion and Apheresis Science*. 41:97-104. Ejemplos no limitantes de PAS incluyen PAS-B (es decir, que comprende acetato), PAS-C (es decir, que comprende acetato y

ES 2 970 156 T3

fosfato), PAS-F (es decir, que comprende acetato, magnesio y potasio como constituyentes clave), PAS-E (es decir, que comprende acetato, magnesio, potasio y fosfato), o combinaciones de estos.

5 En realizaciones particulares, el concentrado de plaquetas comprende al menos un 5,0 % (v/v), al menos un 10,0 % (v/v), al menos un 15,0 % (v/v), al menos un 20,0 % (v/v), al menos un 25,0 % (v/v), al menos un 30,0 % (v/v), al menos un 35,0 % (v/v), al menos un 40,0 % (v/v), al menos un 45,0 % (v/v), al menos un 50,0 % (v/v), al menos un 55,0 % (v/v), al menos un 60,0 % (v/v), al menos un 65,0 % (v/v), al menos un 70,0 % (v/v), al menos un 75,0 % (v/v) o al menos un 85,0 % (v/v), preferentemente al menos un 60,0 % (v/v) de una o más soluciones aditivas de plaquetas.

10 En realizaciones particulares, el concentrado de plaquetas comprende del 0,0 al 95,0 % (v/v), del 5,0 al 95,0 % (v/v), del 10,0 al 90,0 % (v/v), del 20,0 al 80,0 % (v/v), del 30,0 al 80,0 % (v/v), del 40,0 al 80,0 % (v/v), del 50,0 al 80,0 % (v/v), del 60 al 80,0 % (v/v) o del 65,0 al 75,0 % (v/v), preferentemente del 60,0 al 90,0 % (v/v), de una o más soluciones aditivas de plaquetas.

15 En realizaciones más particulares, la solución aditiva de plaquetas es una solución PAS-E y comprende al menos acetato 32,50 mM, al menos potasio 5,0 mM, al menos magnesio 1,50 mM y al menos fosfato 28,20 mM.

20 En realizaciones más particulares, la solución aditiva de plaquetas comprende Na_3 -citrato $2\text{H}_2\text{O}$, Na-acetato $3\text{H}_2\text{O}$, NaCl y opcionalmente $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 , KCl y/o $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

20 En realizaciones incluso más particulares, la solución aditiva de plaquetas es una solución PAS-E y comprende:

- 25
- de 2,0 a 4,0 g/l, preferentemente de 2,90 a 3,20 g/l, de Na_3 -citrato $2\text{H}_2\text{O}$,
 - de 3,0 a 5,0 g/l, preferentemente de 4,0 a 4,50 g/l, de Na-acetato $3\text{H}_2\text{O}$,
 - de 3,0 a 8,0 g/l, preferentemente de 4,0 a 7,0 g/l, de NaCl,

y opcionalmente

- 30
- de 9,0 a 1,20 g/l, preferentemente de 1,0 a 1,10 g/l, de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,
 - de 2,90 a 3,20, preferentemente de 3,0 a 3,10 g/l, de Na_2HPO_4 ,
 - de 0,30 a 0,45 g/l, preferentemente de 0,350 a 0,40 g/l de KCl, y/o
 - de 0,250 a 0,350 g/l, preferentemente de 0,290 a 0,310 g/l de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

35 Por ejemplo, la solución aditiva de plaquetas es SSP+ (Macopharma) o T-PAS+ (TerumoBCT, Inc.).

En realizaciones particulares, la composición de sangre rica en plaquetas comprende al menos 700 000 plaquetas por μl y del 60,0 al 90,0 % (v/v) de una o más soluciones aditivas de plaquetas.

40 En realizaciones particulares, la composición de sangre rica en plaquetas se somete a una inactivación de patógenos (también conocida como reducción de patógenos). La inactivación de patógenos de sangre entera o productos derivados de la sangre se conoce en la técnica y se puede efectuar usando los sistemas Intercept Blood System (CERUS, Concord CA), Mirasol Pathogen Reduction (Terumo BCT, Denver, CO) o Theraflex UVC (Macopharma, Tourcoing, Francia).

45 En realizaciones particulares, la composición de sangre rica en plaquetas está sustancialmente exenta de cualquier agente infeccioso (por ejemplo, microorganismos que incluyen bacterias, virus y protozoos) que pueda causar una enfermedad en un sujeto al que se administra la composición de sangre rica en plaquetas o un derivado de esta. En realizaciones más particulares, la composición de sangre rica en plaquetas está sustancialmente exenta del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), del virus de la hepatitis (por ejemplo, la hepatitis B o la hepatitis C) y del *Treponema pallidum* (es decir, la bacteria que causa la sífilis).

50

El concentrado de plaquetas tiene un tiempo de conservación corto (por ejemplo, de 5-7 días) y, como resultado, se necesitan muchos donantes para mantener el suministro mínimo de concentrado de plaquetas para transfusión en un momento dado. Debido al corto tiempo de conservación y a la variación en la oferta y la demanda de concentrados de plaquetas, a los bancos de sangre les resulta difícil gestionar las reservas de concentrado de plaquetas. Como resultado de esto, el 3-5 % del concentrado de plaquetas donado caduca (es decir, ya no se considera seguro para transfusiones en humanos) antes de que pueda ser usado para transfusiones y, por lo tanto, se desecha como residuo biopeligroso. El tiempo de conservación del concentrado de plaquetas se mantiene corto debido al mayor riesgo de crecimiento de patógenos durante su almacenamiento a temperatura ambiente. Aparte de esto, la función de las plaquetas disminuye durante el almacenamiento, conocido también como lesión por almacenamiento de plaquetas. El concentrado de plaquetas es un producto caro, por lo que el coste financiero de desechar el concentrado de plaquetas caducado es elevado. Los presentes inventores han descubierto que un concentrado de plaquetas caducado se podría usar para preparar un liberado de plaquetas mediante los métodos enseñados en el presente documento. En realizaciones particulares, los métodos enseñados en el presente documento opcionalmente comprenden lisar las plaquetas presentes en la composición de sangre rica en plaquetas y obtener un lisado de plaquetas. Si está presente tal etapa de lisis, el método enseñado en el presente documento será un método para preparar un lisado de plaquetas

55

60

65

y se obtiene un lisado de plaquetas a partir de dicho liberado de plaquetas. Los inventores han descubierto además que dicho liberado de plaquetas o dicho lisado de plaquetas se puede usar en un cultivo celular, en el tratamiento de lesiones de tejidos duros y blandos, enfermedades inflamatorias, enfermedades óseas, enfermedades degenerativas de las articulaciones, discopatías degenerativas, afecciones cutáneas, alopecia areata, enfermedad endometrial, atrofia vaginal, enfermedad de la superficie ocular, síndrome del túnel carpiano, trastornos neurodegenerativos, arteriopatía periférica y dolor, y para mejorar el aspecto de la piel y/o del cabello.

En realizaciones particulares, el concentrado de plaquetas es un concentrado de plaquetas caducado.

El término "caducado", tal como se usa en el presente documento con referencia al concentrado de plaquetas, denota un concentrado de plaquetas que ya no se considera adecuado para transfusión. El tiempo de caducidad y/o las condiciones de caducidad del concentrado de plaquetas pueden ser diferentes de una jurisdicción a otra. Por ejemplo, el concentrado de plaquetas se puede considerar caducado al menos 3 días después de la donación, al menos 4 días después de la donación, al menos 5 días después de la donación, al menos 6 días después de la donación, al menos 7 días después de la donación, al menos 8 días después de la donación, al menos 9 días después de la donación, al menos 10 días después de la donación, al menos 11 días después de la donación, al menos 12 días después de la donación, al menos 13 días después de la donación, al menos 14 días después de la donación o al menos 15 días después de la donación, preferentemente al menos 10 días después de la donación.

En realizaciones particulares, el concentrado de plaquetas se utiliza al menos 5 días, preferentemente al menos 10 días, después de obtener el concentrado de plaquetas del sujeto.

El término "sal de calcio soluble en agua", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una sal de calcio o un complejo de calcio que tiene una solubilidad de al menos 0,010 g por 100 ml de agua, preferentemente cuando se mide a una presión atmosférica de 0,10 MPa (1 atm), a una temperatura de 20,0 °C y un pH de 7,4. Preferentemente, el agua es agua destilada. Ejemplos no limitantes de sales de calcio solubles en agua son cloruro de calcio, hidróxido de calcio, acetato de calcio, carbonato de calcio, bicarbonato de calcio, clorato de calcio, perclorato de calcio, sulfato de calcio, nitrato de calcio, nitrito de calcio, lactato de calcio, glucobionato de calcio, gluceptato de calcio y gluconato de calcio. Ejemplos no limitantes de complejos de calcio incluyen calcio -ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y calcio-ácido pentético o ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y similares.

En realizaciones particulares, la una o más sales de calcio solubles en agua se seleccionan entre el grupo que consiste en cloruro de calcio, hidróxido de calcio, acetato de calcio, carbonato de calcio, bicarbonato de calcio, clorato de calcio, perclorato de calcio, sulfato de calcio, nitrato de calcio, nitrito de calcio, lactato de calcio, glucobionato de calcio, gluceptato de calcio y gluconato de calcio, o mezclas de estos. En una realización preferente, la sal de calcio soluble en agua es cloruro de calcio. El término "cloruro de calcio" o " CaCl_2 ", tal como se usa en el presente documento, se refiere al cloruro de calcio con número CAS 10043-52-4.

En realizaciones particulares, la una o más sales de calcio solubles en agua no son tóxicas *in vivo*. En realizaciones más particulares, la una o más sales de calcio solubles en agua no comprenden bromuro de calcio.

En realizaciones particulares, la cantidad de la una o más sales de calcio solubles en agua es de 0,010 μmol a 20,0 μmol , de 0,050 μmol a 20,0 μmol , de 0,10 μmol a 15,0 μmol , de 0,050 μmol a 12,0 μmol , de 1,0 μmol a 12,0 μmol , de 0,050 μmol a 10,0 μmol , de 0,50 μmol a 10,0 μmol , de 1,0 μmol a 10,0 μmol , de 1,0 μmol a 9,0 μmol , de 1,0 μmol a 8,0 μmol , de 1,0 μmol a 7,0 μmol , de 1,0 μmol a 6,0 μmol , de 2,0 μmol a 12,0 μmol , de 2,0 μmol a 10,0 μmol , de 2,0 μmol a 9,0 μmol , de 0,050 μmol a 8,0 μmol , de 2,0 μmol a 8,0 μmol , de 3,0 μmol a 8,0 μmol , de 2,0 μmol a 7,0 μmol , de 3,0 μmol a 7,0 μmol , de 2,0 μmol a 6,0 μmol o de 3,0 μmol a 6,0 μmol por ml de la muestra, preferentemente de 1,0 μmol a 12,0 μmol o de 2,0 μmol a 10,0 μmol por ml de la muestra, más preferentemente de 3,0 μmol a 8,0 μmol por ml de la muestra. Por ejemplo, 4,0 μmol o 5,0 μmol por ml de la muestra. La cantidad de la una o más sales de calcio solubles en agua normalmente se refiere a la cantidad de una o más sales de calcio solubles en agua añadidas exógenamente, y no a las que ya están presentes en la composición de sangre rica en plaquetas.

En realizaciones particulares, la cantidad de la una o más sales de calcio solubles en agua es de 0,010 mM a 20,0 mM, de 0,050 mM a 20,0 mM, de 0,10 mM a 15,0 mM, de 0,050 mM a 12,0 mM, de 1,0 mM a 12,0 mM, de 0,050 mM a 10,0 mM, de 0,50 mM a 10,0 mM, de 1,0 mM a 10,0 mM, de 1,0 mM a 9,0 mM, de 1,0 mM a 8,0 mM, de 1,0 mM a 7,0 mM, de 1,0 mM a 6,0 mM, de 2,0 mM a 12,0 mM, de 2,0 mM a 10,0 mM, de 2,0 mM a 9,0 mM, de 0,050 mM a 8,0 mM, de 2,0 mM a 8,0 mM, de 3,0 mM a 8,0 mM, de 2,0 mM a 7,0 mM, de 3,0 mM a 7,0 mM, de 2,0 mM a 6,0 mM o de 3,0 mM a 6,0 mM, preferentemente de 1,0 mM a 12,0 mM o de 2,0 mM a 10,0 mM, más preferentemente de 3,0 mM a 8,0 mM. Por ejemplo, 4,0 mM o 5,0 mM.

En realizaciones particulares, la una o más sales de calcio solubles en agua se disuelven en agua, preferentemente agua destilada, antes de añadir la una o más sales de calcio solubles en agua a la composición de sangre rica en plaquetas. En realizaciones particulares, el volumen de agua en donde se disuelven la una o más sales de calcio solubles en agua es como máximo el 5,0 % (v/v), como máximo el 4,0 % (v/v), como máximo el 3,0 % (v/v), como máximo el 2,0 % (v/v), o como máximo el 1,0 % (v/v), preferentemente como máximo el 1,0 % (v/v), del volumen de la composición de sangre rica en plaquetas a la que se añaden la una o más sales de calcio solubles en agua.

ES 2 970 156 T3

5 El término "partícula", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un objeto pequeño que tiene una determinada forma, preferentemente una forma simétrica y homogénea. Ejemplos no limitantes de formas de partículas incluyen un cubo, una esfera, un cilindro, un cono, una pirámide, un prisma, un cuboide y un toro; preferentemente una esfera.

En realizaciones particulares, las partículas de vidrio son esferas, cubos, cilindros, conos, pirámides, prismas, cuboides, toros o combinaciones de estos, preferentemente esferas.

10 En realizaciones particulares, las partículas de vidrio tienen un tamaño de partícula promedio o un diámetro promedio de 0,20 mm a 40,0 mm, de 0,50 mm a 35,0 mm, de 0,50 mm a 30,0 mm, de 0,50 mm a 25,0 mm, de 0,50 mm a 20,0 mm, de 0,50 mm a 15,0 mm, de 0,50 mm a 10,0 mm, de 1,0 mm a 10,0 mm, de 1,0 mm a 9,0 mm, de 1,0 mm a 8,0 mm, de 1,0 mm a 7,0 mm, de 1,0 mm a 6,0 mm, de 1,0 mm a 5,0 mm o de 1,0 mm a 4,0 mm, preferentemente de 2,0 mm a 4,0 mm. En realizaciones preferentes, las partículas de vidrio tienen un tamaño de partícula promedio o un diámetro promedio de 1,0 mm a 5,0 mm, preferentemente de 2,0 mm a 4,0 mm.

15 El tamaño de partícula se puede calcular en función del área superficial de una partícula determinada, conocido también como tamaño de partícula basado en el área. El tamaño de partícula basado en el área es igual al diámetro de la esfera que tiene la misma área superficial que una partícula determinada. El experto entenderá que si la partícula es una esfera, el tamaño de partícula es igual al diámetro de la partícula.

20 En realizaciones particulares, el diámetro máximo de las partículas de vidrio es como máximo de 4,0 cm, como máximo de 3,50 cm, como máximo de 3,0 cm, como máximo de 2,50 cm, como máximo de 2,0 cm, como máximo de 1,50 cm, como máximo de 1,0 cm o como máximo de 0,50 cm.

25 En realizaciones particulares, las partículas de vidrio tienen una distribución de tamaño homogénea con una desviación estándar normalizada en promedio de una población tomada al azar de al menos 40 perlas inferior al 20 %, preferentemente inferior al 10 %.

30 El término "distribución de tamaño homogénea" se refiere en el presente documento a una magnitud física uniforme.

En realizaciones particulares, las partículas de vidrio no son porosas y/o no son huecas.

35 En realizaciones particulares, las partículas de vidrio están hechas de un vidrio a base de sílice, tal como vidrio de sílice sódico-cálcico (también denominado en el presente documento vidrio sódico-cálcico), vidrio de borosilicato de sodio, vidrio de aluminosilicato, vidrio de óxido de plomo o vidrio de sílice fundida.

40 En realizaciones preferentes, las partículas de vidrio son partículas de vidrio sódico-cálcico. Los presentes inventores observaron que el tiempo de coagulación en los métodos enseñados en el presente documento que utilizan partículas de vidrio sódico-cálcico podría disminuir en comparación con el tiempo de coagulación para otros tipos de vidrio.

45 En realizaciones particulares, la cantidad de partículas de vidrio es de 0,010 g a 1,0 g, de 0,010 g a 0,60 g, de 0,020 g a 0,60 g, de 0,030 g a 0,60 g, de 0,040 g a 0,60 g, de 0,050 g a 0,60 g, de 0,10 g a 0,50 g, de 0,10 g a 0,450 g, de 0,10 g a 0,40 g, de 0,10 g a 0,350 g, de 0,10 g a 0,30 g, de 0,150 g a 0,30 g o de 0,20 g a 0,30 g por ml de la muestra, preferentemente de 0,10 g a 0,40 g por ml de la muestra. Por ejemplo, 0,25 g de partículas de vidrio por ml de la muestra.

50 En realizaciones particulares, la cantidad de partículas de vidrio es de 0,10 g a 0,40 g por ml de dicha muestra y la cantidad de la una o más sales de calcio solubles en agua es de 2,0 μmol a 10,0 μmol o de 3,0 μmol a 8,0 μmol por ml de la muestra, preferentemente de 3,0 μmol a 8,0 μmol por ml de la muestra. Por ejemplo, la cantidad de partículas de vidrio es 0,250 g por ml de la muestra y la cantidad de la una o más sales de calcio solubles en agua es 5,0 μmol por ml de la muestra. Si la cantidad de una o más sales de calcio solubles en agua está más próxima al límite superior de los intervalos divulgados en el presente documento, la cantidad de partículas de vidrio puede estar más próxima al límite inferior de los intervalos divulgados en el presente documento.

55 Un aspecto adicional proporciona un sistema para preparar un liberado de plaquetas o un lisado de plaquetas que comprende un primer contenedor (1) que tiene un primer espacio contenedor (1'), en donde dicho primer espacio contenedor contiene una cantidad (Q_{gp}) de partículas de vidrio (3) y está configurado para recibir una cantidad (Q_{bc}) de una composición de sangre rica en plaquetas contenida en un segundo espacio contenedor (2') de un segundo contenedor (2), preferentemente el primer espacio contenedor está configurado para conectarse a un segundo espacio contenedor (2') de un segundo contenedor (2) que contiene una cantidad (Q_{bc}) de una composición de sangre rica en plaquetas; en donde la relación $Q_{gp}:Q_{bc}$ es de 0,010 a 0,60 gramos por ml.

60 En realizaciones particulares,

65 - (i) el primer espacio contenedor (1') contiene además una cantidad (Q_{cc}) de una o más sales de calcio solubles

en agua (4); o

- (ii) el primer espacio contenedor (1') está configurado para recibir una cantidad (Q_{cc}) de una o más sales de calcio solubles en agua (4) contenidas en un tercer espacio contenedor (5') de un tercer contenedor (5), preferentemente el primer espacio contenedor (1') está configurado para conectarse a un tercer espacio contenedor (5') de un tercer contenedor (5) que contiene una cantidad (Q_{cc}) de una o más sales de calcio solubles en agua (4), más preferentemente el primer espacio contenedor (1') comprende una primera abertura, preferentemente una abertura sellable, configurada para conectarse a una abertura de un tercer espacio contenedor (5') de un tercer contenedor (5) que contiene una cantidad (Q_{cc}) de una o más sales de calcio solubles en agua (4);

10 en donde en (i) o en (ii) la relación $Q_{cc}:Q_{bc}$ es de 1,0 a 12,0 μmol por ml de dicha composición de sangre rica en plaquetas.

15 En una realización preferente, el primer espacio contenedor (1') contiene una cantidad (Q_{gp}) de partículas de vidrio (3) y una cantidad (Q_{cc}) de una o más sales de calcio solubles en agua (4), preferentemente el primer espacio contenedor (1') contiene de 0,10 g a 0,40 g de partículas de vidrio por ml de composición de sangre rica en plaquetas y de 3,0 μmol a 8,0 μmol de una o más sales de calcio solubles en agua por ml de composición de sangre rica en plaquetas.

20 La conexión entre el primer espacio contenedor (1') y el segundo espacio contenedor (2') y/o el tercer espacio contenedor (5') se puede obtener mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, por medios de conducto (por ejemplo, uno o más tubos tal como se describe en otra parte del presente documento), mediante una unión de conexión Luer (por ejemplo, si el segundo y/o el tercer contenedor es una jeringa sin aguja), mediante penetración de un tapón o cubierta perforable con una punta perforante hueca (por ejemplo, si el segundo y/o el tercer contenedor es una jeringa con una aguja hueca), mediante un tapón frangible/rompible (por ejemplo, el descrito en WO8101105 o US5152755A) o combinaciones de estos. Tales combinaciones pueden ser tubos cuyo extremo proximal se puede conectar a la abertura en el primer espacio contenedor (1') y el extremo distal se puede conectar a la abertura en el segundo espacio contenedor (2') y/o el tercer espacio contenedor (5), en donde el extremo distal comprende un componente de conexión Luer hembra (por ejemplo, cuando el segundo y/o el tercer contenedor es una jeringa sin aguja) o, como alternativa, en donde el extremo distal está sellado con un tapón o cubierta perforable (por ejemplo, cuando el segundo y/o el tercer contenedor es una jeringa con una aguja hueca).

30 En realizaciones particulares, el sistema enseñado en el presente documento comprende

- un primer contenedor (1) que comprende un primer espacio contenedor (1') que contiene una cantidad (Q_{gp}) de partículas de vidrio (3) y una o más sales de calcio (4) solubles en agua configurado para recibir una cantidad (Q_{bc}) de una composición de sangre rica en plaquetas contenida en un segundo espacio contenedor (2') de un segundo contenedor (2); en donde el primer espacio contenedor comprende una primera abertura, preferentemente una abertura sellable, configurada para conectarse a una abertura de un segundo espacio contenedor (2') de un segundo contenedor (2); y

40 - un primer tubo cuyo extremo proximal está sujeto por una primera abertura en el primer espacio contenedor (1') y el extremo distal está configurado para conectarse a la abertura en el segundo espacio contenedor (2'); en donde el primer tubo está configurado para poner el primer espacio contenedor (1') en comunicación fluida con el segundo espacio contenedor (2'), por ejemplo mediante soldadura;

45 en donde la relación $Q_{gp}:Q_{bc}$ es de 0,010 a 0,60 gramos por ml de dicha composición de sangre rica en plaquetas y la relación $Q_{cc}:Q_{bc}$ es de 1,0 a 12,0 μmol por ml de dicha composición de sangre rica en plaquetas.

50 En realizaciones particulares, la primera abertura del primer espacio contenedor (1') está configurada para sujetar el extremo proximal de un primer tubo y la abertura del tercer espacio contenedor (5') está configurada para sujetar el extremo distal de dicho primer tubo.

55 En realizaciones particulares, el sistema enseñado en el presente documento comprende un primer tubo cuyo extremo proximal está sujeto por la primera abertura en el primer espacio contenedor (1') y el extremo distal está configurado para conectarse o está sujeto mediante una abertura en el tercer espacio contenedor (5'), en donde el primer tubo está configurado para conectar el primer contenedor (1) al tercer contenedor (5), preferentemente sin fugas, y para poner el primer espacio contenedor (1') en comunicación fluida con el tercer espacio contenedor (5'). En realizaciones particulares, el sistema enseñado en el presente documento comprende

60 - un primer contenedor (1) que comprende un primer espacio contenedor (1') que contiene una cantidad (Q_{gp}) de partículas de vidrio (3) configuradas para recibir una cantidad (Q_{bc}) de una composición de sangre rica en plaquetas contenida en un segundo espacio contenedor (2') de un segundo contenedor (2); en donde el primer espacio contenedor comprende una primera abertura, preferentemente una abertura sellable, configurada para conectarse a una abertura de un tercer espacio contenedor (5') de un tercer contenedor (5);

- un tercer contenedor (5) que tiene un tercer espacio contenedor (5') que contiene una cantidad (Q_{cc}) de una o más sales de calcio solubles en agua (4); y

65 - un primer tubo cuyo extremo proximal está sujeto por una primera abertura en el primer espacio contenedor (1') y el extremo distal está sujeto por una abertura en el tercer espacio contenedor (5'), en donde el primer tubo está

configurado para conectar el primer contenedor (1) al tercer contenedor (5), preferentemente sin fugas, y para poner el primer espacio contenedor (1') en comunicación fluida con el tercer espacio contenedor (5');

5 en donde la relación Q_{gp}/Q_{bc} es de 0,010 a 0,60 gramos por ml de dicha composición de sangre rica en plaquetas y la relación Q_{cc}/Q_{bc} es de 1,0 a 12,0 μmol por ml de dicha composición de sangre rica en plaquetas.

10 En realizaciones particulares, la comunicación fluida entre el primer espacio contenedor (1') del primer contenedor (1) y el tercer espacio contenedor (5') del tercer contenedor (5) se puede interrumpir por completo mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, la comunicación fluida entre el primer espacio contenedor (1') y el tercer espacio contenedor (5') se puede interrumpir por completo colocando una abrazadera extraíble (por ejemplo, una abrazadera para tubos (por ejemplo, una abrazadera para tubos 340 TCS de Halkay/Roberts®) o una abrazadera Kocher) en el primer tubo entre el primer espacio contenedor (1') y el tercer espacio contenedor (5'). Como alternativa, la comunicación fluida entre el primer espacio contenedor (1') y el tercer espacio contenedor (5') se puede interrumpir por completo incorporando una válvula entre el primer espacio contenedor (1') y el tercer espacio contenedor (5'), preferentemente una válvula de cánula frangible, lo que permite regular la comunicación fluida entre el primer espacio contenedor (1') y el tercer espacio contenedor (5'). La válvula se puede utilizar para abrir y/o cerrar el tubo, permitiendo o impidiendo así la comunicación fluida entre el primer espacio contenedor (1') y el tercer espacio contenedor (5'). La válvula utilizada para interrumpir de manera reversible la comunicación fluida entre el primer espacio contenedor (1') y el tercer espacio contenedor (5') puede ser cualquier tipo de válvula conocida en la técnica adecuada para tales medios, que incluyen válvulas de cánula frangibles o rompibles (por ejemplo, las descritas en WO8101105 o US5152755A), llaves de paso, válvulas de presión/alivio y válvulas de una vía. Normalmente se instala una válvula de cánula frangible o rompible en el tubo en su formación cerrada y una vez que se abre la válvula, la comunicación fluida ya no puede cerrarse mediante dicha válvula.

25 En realizaciones particulares, el primer tubo cuyo extremo proximal está sujeto por la primera abertura en el primer espacio contenedor (1') y el extremo distal está configurado para conectarse o está sujeto mediante una abertura en el tercer espacio contenedor (5'), comprende medios para interrumpir de manera reversible la comunicación fluida entre el primer espacio contenedor (1') y el tercer espacio contenedor (5'), tal como una abrazadera externa o una válvula, preferentemente una válvula de cánula frangible o rompible, tal como se describe en cualquier otra parte del presente documento.

35 En realizaciones particulares, el primer espacio contenedor comprende una segunda abertura, preferentemente una abertura sellable, configurada para conectar el primer espacio contenedor al segundo espacio contenedor (2') del segundo contenedor (2) que contiene una cantidad (Q_{bc}) de una composición de sangre rica en plaquetas. La conexión entre la segunda abertura en el primer espacio contenedor (1') y la abertura en el segundo espacio contenedor (2') se puede lograr mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como se describe en cualquier otra parte del presente documento. Por ejemplo, la segunda abertura del primer espacio contenedor (1') se puede configurar para contener medios de conducto, tal como un tubo, tal como se describe en cualquier otra parte del presente documento.

40 En realizaciones particulares, el sistema enseñado en el presente documento comprende un segundo tubo cuyo extremo proximal está sujeto por la segunda abertura en el primer espacio contenedor (1') y el extremo distal está configurado para conectarse a una abertura en el segundo espacio contenedor (2'), en donde el segundo tubo está configurado para conectar el primer contenedor (1) al segundo contenedor (2), preferentemente sin fugas, y para poner el primer espacio contenedor (1') en comunicación fluida con el segundo espacio contenedor (2').

45 En realizaciones particulares, el primer espacio contenedor (1') está configurado para liberar una cantidad de liberado de plaquetas contenido en el primer espacio contenedor (1') del primer contenedor (1) en un cuarto espacio contenedor de un cuarto contenedor, en donde el cuarto espacio contenedor está configurado para recibir (por ejemplo, recoger) y/o contener el liberado de plaquetas preparado usando el sistema enseñado en el presente documento. Preferentemente, el primer espacio contenedor (1') está configurado para conectarse al cuarto espacio contenedor del cuarto contenedor.

50 La conexión entre el primer espacio contenedor (1') y el cuarto espacio contenedor se puede obtener mediante cualquier método conocido en la técnica tal como se describe en otra parte del presente documento.

55 En realizaciones particulares, el primer espacio contenedor comprende una tercera abertura, preferentemente una abertura sellable, configurada para conectar el primer espacio contenedor a un cuarto espacio contenedor de un cuarto contenedor, en donde el cuarto espacio contenedor está configurado para recibir (por ejemplo, recoger) y/o contener el liberado de plaquetas preparado usando el sistema enseñado en el presente documento. La conexión entre la tercera abertura en el primer espacio contenedor (1') y la abertura en el cuarto espacio contenedor se puede obtener mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como se describe en cualquier otra parte del presente documento. Por ejemplo, la tercera abertura en el primer espacio contenedor (1') se puede configurar para contener medios de conducto, tal como un tubo, tal como se describe en cualquier otra parte del presente documento.

60 En realizaciones particulares, el sistema enseñado en el presente documento comprende un tercer tubo cuyo extremo proximal está sujeto por la tercera abertura en el primer espacio contenedor (1') y el extremo distal está configurado

para conectarse a una abertura en el cuarto espacio contenedor de un cuarto contenedor, en donde el tubo está configurado para conectar el primer contenedor (1) con el cuarto contenedor, preferentemente sin fugas, y para poner el primer espacio contenedor (1') en comunicación fluida con el cuarto espacio contenedor.

- 5 En realizaciones particulares, la primera, la segunda y/o la tercera abertura en el primer espacio contenedor (1') se refiere a la misma abertura en el primer espacio contenedor (1'). La abertura en el primer espacio contenedor podrá conectarse consecutivamente al segundo (2'), tercero (5') y cuarto espacio contenedor.

- 10 Los extremos distales del primero, segundo y tercer tubo cuyos extremos proximales están sujetos por la primera, segunda y tercera aberturas en el primer espacio contenedor, respectivamente, pueden estar conectados a una abertura en el tercero, segundo o cuarto espacio contenedor, respectivamente, mediante conexión de los extremos distales del primero, segundo y tercer tubo inmediatamente a la abertura del tercero, segundo o cuarto espacio contenedor, respectivamente, por ejemplo, mediante una unión de conexión Luer o mediante perforación de un tapón perforable que sella la abertura de un espacio contenedor mediante una aguja hueca que está en conexión fluida con el otro espacio contenedor o, como alternativa, interconectando el extremo distal del primero, segundo y tercer tubo con el extremo distal de un tubo cuyo extremo proximal está sujeto por la abertura en el tercero, segundo o cuarto espacio contenedor, respectivamente, por ejemplo mediante una conexión de tubo estéril, tal como soldando los tubos entre sí de manera que los tubos estén en comunicación fluida entre sí. Los dispositivos de soldadura estériles permiten conectar o desconectar al menos dos extremos de los tubos manteniendo la esterilidad durante el corte y la soldadura. En realizaciones particulares, si se utiliza soldadura estéril para desconectar al menos dos extremos de los tubos, los dos tubos suelen estar sellados permanentemente y solo se pueden abrir de nuevo cortando y/o soldando.

- 20 La soldadura se puede usar para conectar o desconectar los tubos y permite abrir o cerrar la comunicación fluida entre los espacios contenedores de los contenedores tal como se describe en el presente documento sin exponer los espacios contenedores o el contenido de estos al entorno (y a los patógenos que pueden estar presentes en el entorno) fuera del sistema enseñado en el presente documento.

- 25 En realizaciones particulares, el primer, segundo y tercer tubo son tubos flexibles. Los tubos pueden estar hechos de cualquier material de calidad médica conocido en la técnica para preparar tubos flexibles, tal como plástico o silicona. En realizaciones particulares, el primer, segundo y tercer tubo consisten en plástico, tal como tubos de elastómero termoplástico, tal como cloruro de polivinilo (PVC), poliuretano (PU), etileno propileno fluorado (FEP), policarbonato (PC), polietileno (PE) tal como PE de alta densidad (HDPE) o PE de baja densidad (LDPE), o combinaciones de estos, preferentemente PVC, PU o combinaciones de estos. El plástico se puede esterilizar mediante cualquier método o medio conocido en la técnica. Por ejemplo, el plástico se puede tratar con óxido de etileno.

- 30 En realizaciones particulares, el sistema comprende además medios de filtración (7) configurados para retener las partículas de vidrio y/o residuos dentro del primer espacio contenedor del primer contenedor a la vez que permite que el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento salga del primer espacio contenedor del primer contenedor a un cuarto espacio contenedor de un cuarto contenedor. La tercera abertura del primer espacio contenedor puede funcionar como dicho medio de filtración (7) si la tercera abertura está configurada para retener las partículas de vidrio dentro del primer espacio contenedor mientras permite que el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento salga del primer espacio contenedor al cuarto espacio contenedor, por ejemplo proporcionando una tercera abertura que tiene un diámetro que es menor que el tamaño de partícula o el diámetro de la partícula de vidrio más pequeña, o proporcionando una tercera abertura que comprende un filtro (por ejemplo, una rejilla) que tiene un tamaño de poro que es menor que el tamaño de partícula o el diámetro de la partícula de vidrio más pequeña.

- 40 En realizaciones particulares, los medios de filtración (7) están en comunicación fluida con el primer espacio contenedor del primer contenedor y el cuarto espacio contenedor del cuarto contenedor. En realizaciones particulares, los medios de filtración (7) están situados entre la tercera abertura en el primer espacio contenedor del primer contenedor y el cuarto espacio contenedor del cuarto contenedor. Por ejemplo, los medios de filtración (7) pueden estar presentes en medios de conducto (por ejemplo, un tubo tal como se describe en otra parte del presente documento) entre la tercera abertura en el primer espacio contenedor del primer contenedor y el cuarto espacio contenedor del cuarto contenedor.

- 50 En realizaciones particulares, los medios de filtración (7) son uno o más (por ejemplo uno, dos, tres, cuatro, cinco o más) filtros. En realizaciones particulares, los medios de filtración (7) comprenden al menos un filtro que tiene un tamaño de poro que es menor que el tamaño de partícula o el diámetro de la partícula de vidrio más pequeña, tal como, por ejemplo, un tamaño de poro inferior a 3,0 mm. En realizaciones más particulares, los medios de filtración (7) comprenden al menos un filtro que tiene un tamaño de poro inferior a 0,20 μm .

En una realización preferente, el sistema enseñado en el presente documento comprende

- 65 - un primer contenedor (1) que tiene un primer espacio contenedor (1') que contiene una cantidad (Q_{gp}) de partículas de vidrio (3) configuradas para recibir una cantidad (Q_{bc}) de una composición de sangre rica en plaquetas contenida en un segundo espacio contenedor (2') de un segundo contenedor (2); en donde el primer espacio

contenedor comprende

- 5 - una primera abertura, preferentemente una abertura sellable, configurada para conectarse a una abertura de un tercer espacio contenedor (5') de un tercer contenedor (5);
- una segunda abertura, preferentemente una abertura sellable, configurada para conectarse a una abertura del segundo espacio contenedor (2') de un segundo contenedor (2);
- una tercera abertura, preferentemente una abertura sellable, configurada para conectarse a una abertura de un cuarto espacio contenedor de un cuarto contenedor;
- 10 - un tercer contenedor (5) que tiene un tercer espacio contenedor (5') que contiene una cantidad (Q_{cc}) de una o más sales de calcio solubles en agua (4);
- un primer tubo cuyo extremo proximal está sujeto por la primera abertura en el primer espacio contenedor (1') y el extremo distal está sujeto por una abertura en el tercer espacio contenedor (5'), en donde el tubo está configurado para conectar el primer contenedor (1) al tercer contenedor (5), preferentemente sin fugas, y para poner el primer espacio contenedor (1') en comunicación fluida con el tercer espacio contenedor (5);
- 15 - un segundo tubo cuyo extremo proximal está sujeto por la segunda abertura en el primer espacio contenedor (1') y el extremo distal se puede conectar al segundo espacio contenedor (2'), en donde el segundo tubo está configurado para conectar el primer contenedor (1) al segundo contenedor (2), preferentemente sin fugas, y para poner el primer espacio contenedor (1') en comunicación fluida con el segundo espacio contenedor (2');
- 20 - un tercer tubo cuyo extremo proximal está sujeto por la tercera abertura en el primer espacio contenedor (1') y el extremo distal se puede conectar a un cuarto espacio contenedor de un cuarto contenedor, en donde el tubo está configurado para conectar el primer contenedor (1) con el cuarto contenedor, preferentemente sin fugas, y para poner el primer espacio contenedor (1') en comunicación fluida con el cuarto espacio contenedor; y
- 25 - opcionalmente medios de filtración (7) que están situados entre la tercera abertura en el primer espacio contenedor (1') y el cuarto espacio contenedor;

en donde la relación Q_{gp}/Q_{bc} es de 0,010 a 0,60 gramos por ml de dicha composición de sangre rica en plaquetas y la relación $Q_{cc}:Q_{bc}$ es de 1,0 a 12,0 μmol por ml de dicha composición de sangre rica en plaquetas.

- 30 En realizaciones particulares, la relación $Q_{gp}:Q_{bc}$ (g/ml) es de 0,010 a 1,0, de 0,010 a 0,60, de 0,050 a 0,60, de 0,10 a 0,50, de 0,10 a 0,450, de 0,10 a 0,40, de 0,10 a 0,350, de 0,10 a 0,30, de 0,150 a 0,30 o de 0,20 a 0,30, preferentemente de 0,10 a 0,40. Por ejemplo, 0,20 g/ml.

- 35 En realizaciones particulares, la relación $Q_{cc}:Q_{bc}$ ($\mu\text{mol}/\text{ml}$) es de 0,010 a 20,0, de 0,050 a 20,0, de 0,10 a 15,0, de 0,050 a 12,0, de 1,0 a 12,0, de 0,050 a 10,0, de 0,50 a 10,0, de 1,0 a 10,0, de 1,0 a 9,0, de 1,0 a 8,0, de 1,0 a 7,0, de 1,0 a 6,0, de 2,0 a 10,0, de 2,0 a 9,0, de 0,050 a 8,0, de 2,0 a 8,0, de 3,0 a 8,0, de 2,0 a 7,0, de 3,0 a 7,0, de 2,0 a 6,0 o de 3,0 a 6,0, preferentemente de 1,0 a 12,0 o de 2,0 a 10,0, más preferentemente de 3,0 a 8,0. Por ejemplo, 4,0 o 5,0 $\mu\text{mol}/\text{ml}$.

- 40 En realizaciones particulares, Q_{bc} es de 100,0 ml a 500,0 ml, Q_{gp} es de 20,0 g a 100,0 g y Q_{cc} es de 2,0 μmol a 10,0 μmol .

- 45 En realizaciones particulares, el primer espacio contenedor tiene un volumen de 5,0 ml a 50 000,0 ml, de 10,0 ml a 10 000,0 ml, de 10,0 ml a 5000,0 ml, de 10,0 ml a 2500,0 ml, de 10,0 ml a 1000,0 ml, de 50,0 ml a 750,0 ml, de 50,0 ml a 500,0 ml, de 100,0 ml a 500,0 ml, de 150,0 ml a 450,0 ml, preferentemente de 100,0 a 500,0 ml.

- 50 En realizaciones particulares, el volumen del tercer espacio contenedor es como máximo del 5,0 % (v/v), como máximo el 4,0 % (v/v), como máximo el 3,0 % (v/v), como máximo el 2,0 % (v/v), o como máximo el 1,0 % (v/v), preferentemente como máximo el 1,0 % (v/v), del volumen del primer espacio contenedor.

- 55 En realizaciones particulares, el tercer espacio contenedor tiene un volumen de 0,10 ml a 25,0 ml, de 0,50 ml a 20,0 ml, de 1,0 ml a 15,0 ml, de 5,0 ml a 15,0 ml, de 5,0 ml a 10,0 ml, preferentemente de 1,0 a 15,0 ml.

- El experto entenderá que las realizaciones particulares con respecto a los usos y los métodos para preparar el liberado o el lisado de plaquetas a partir de una muestra de una composición de sangre rica en plaquetas obtenida de un sujeto enseñado en el presente documento, por ejemplo con respecto a los tipos de partículas de vidrio y sales de calcio solubles en agua, son aplicables también al sistema enseñado en el presente documento.

- 60 Un aspecto adicional proporciona el uso del sistema enseñado en el presente documento para producir un liberado de plaquetas o un lisado de plaquetas.

- Un aspecto adicional proporciona un método para preparar el liberado de plaquetas a partir de una muestra de una composición de sangre rica en plaquetas obtenida de un sujeto que comprende las etapas de

- 65 a) poner en contacto dicha muestra con una cantidad de 0,010 g a 0,60 g de partículas de vidrio por ml de dicha muestra y una cantidad de 0,10 μmol a 20,0 μmol de una o más sales de calcio solubles en agua por ml de dicha

muestra, y obtener así una mezcla;

b) dejar que la mezcla obtenida en la etapa a) coagule obteniendo así un coágulo y un liberado de plaquetas; y

c) recuperar de la mezcla el liberado de plaquetas obtenido en la etapa b).

5 El término "contacto", "contactar" o la expresión "poner en contacto", tal como se usan en el presente documento, significan juntar uno o más primeros componentes (tales como una o más moléculas, entidades biológicas o materiales) con uno o más segundos componentes (tales como una o más moléculas, entidades biológicas o materiales) de tal manera que el primer o primeros componentes puedan, si son capaces de hacerlo, unirse o modular el segundo componente o que el segundo o segundos componentes puedan, si son capaces de hacerlo, unirse o modular el primer o primeros componentes. Esta modulación puede ocurrir bien directamente, es decir, mediante interacción directa entre el primer y el segundo o segundos componentes; o bien indirectamente, por ejemplo, cuando el primer o primeros componentes interactúan con uno o más componentes adicionales o los modulan, uno o más de los cuales interactúan a su vez con el segundo o segundos componentes, o los modulan, o viceversa. El término "contactar", según el contexto, puede ser sinónimo de "exponer", "incubar", "mezclar", "hacer reaccionar", "tratar", o similar.

20 En realizaciones particulares, se pone en contacto la muestra con de 0,010 g a 1,0 g, de 0,010 g a 0,60 g, de 0,050 g a 0,60 g, de 0,10 g a 0,50 g, de 0,10 g a 0,450 g, de 0,10 g a 0,40 g, de 0,10 g a 0,350 g, de 0,10 g a 0,30 g, de 0,150 g a 0,30 g o de 0,20 g a 0,30 g de partículas de vidrio por ml de la muestra, preferentemente de 0,10 g a 0,40 g de partículas de vidrio por ml de la muestra.

25 En realizaciones particulares, la muestra se pone en contacto con de 0,010 μ mol a 20,0 μ mol, de 0,050 μ mol a 20,0 μ mol, de 0,10 μ mol a 15,0 μ mol, de 0,050 μ mol a 12,0 μ mol, de 1,0 μ mol a 12,0 μ mol, de 0,050 μ mol a 10,0 μ mol, de 0,50 μ mol a 10,0 μ mol, de 1,0 μ mol a 10,0 μ mol, de 1,0 μ mol a 9,0 μ mol, de 1,0 μ mol a 8,0 μ mol, de 1,0 μ mol a 7,0 μ mol, de 1,0 μ mol a 6,0 μ mol, de 2,0 μ mol a 10,0 μ mol, de 2,0 μ mol a 9,0 μ mol, de 0,050 μ mol a 8,0 μ mol, de 2,0 μ mol a 8,0 μ mol, de 3,0 μ mol a 8,0 μ mol, de 2,0 μ mol a 7,0 μ mol, de 3,0 μ mol a 7,0 μ mol, de 2,0 μ mol a 6,0 μ mol o de 3,0 μ mol a 6,0 μ mol de una o más sales de calcio solubles en agua por ml de la muestra, preferentemente de 1,0 μ mol a 12,0 μ mol o de 2,0 μ mol a 10,0 μ mol de una o más sales de calcio solubles en agua por ml de la muestra, más preferentemente de 3,0 μ mol a 8,0 μ mol de una o más sales de calcio solubles en agua por ml de la muestra. Por ejemplo, 4,0 μ mol o 5,0 μ mol de una o más sales de calcio solubles en agua por ml de la muestra.

35 En realizaciones particulares, la muestra se pone en contacto con de 0,010 mM a 20,0 mM, de 0,050 mM a 20,0 mM, de 0,10 mM a 15,0 mM, de 0,050 mM a 12,0 mM, de 1,0 mM a 12,0 mM, de 0,050 mM a 10,0 mM, de 0,50 mM a 10,0 mM, de 1,0 mM a 10,0 mM, de 1,0 mM a 9,0 mM, de 1,0 mM a 8,0 mM, de 1,0 mM a 7,0 mM, de 1,0 mM a 6,0 mM, de 2,0 mM a 10,0 mM, de 2,0 mM a 9,0 mM, de 0,050 mM a 8,0 mM, de 2,0 mM a 8,0 mM, de 3,0 mM a 8,0 mM, de 2,0 mM a 7,0 mM, de 3,0 mM a 7,0 mM, de 2,0 mM a 6,0 mM o de 3,0 mM a 6,0 mM de una o más sales de calcio solubles en agua, preferentemente de 1,0 mM a 12,0 mM o de 2,0 mM a 10,0 mM de una o más sales de calcio solubles en agua, más preferentemente de 3,0 mM a 8,0 mM de una o más sales de calcio solubles en agua. Por ejemplo, 4,0 mM o 5,0 mM de una o más sales de calcio solubles en agua.

40 En realizaciones particulares, la muestra se pone en contacto con de 0,10 g a 0,40 g de partículas de vidrio por ml de dicha muestra y de 3,0 μ mol a 8,0 μ mol de una o más sales de calcio solubles en agua por ml de dicha muestra. Por ejemplo, la muestra se pone en contacto con de aproximadamente 0,100 a 0,300 g de partículas de vidrio por ml de muestra, tal como aproximadamente de 0,150 a 0,250 g de partículas de vidrio por ml de muestra, por ejemplo con aproximadamente 0,200 g de partículas de vidrio por ml de la muestra y entre 4,0 y 6,0 μ mol, tal como aproximadamente 5,0 μ mol, de una o más sales de calcio solubles en agua por ml de la muestra.

50 En realizaciones particulares, la etapa a) (es decir, poner en contacto la muestra con partículas de vidrio y sales de calcio) de los métodos enseñados en el presente documento comprende mezclar la muestra, las partículas de vidrio y la una o más sales de calcio solubles en agua usando un medio de mezcla, tal como un rotador, un vibrador o un agitador (por ejemplo, un vibrador oscilante).

55 El término "coagular" o "coágulo", tal como se usa en el presente documento, se refiere al proceso secuencial mediante el cual se forma un coágulo totalmente retraído a partir de sangre entera o un derivado de sangre entera. La coagulación puede iniciarse mediante la activación de las vías intrínseca o extrínseca de coagulación. Ambas vías dan como resultado la producción del factor de coagulación Xa. La activación del factor de coagulación Xa iniciará la vía común de coagulación, lo que finalmente da como resultado la formación de un coágulo. La vía extrínseca suele iniciarse por la respuesta al factor tisular (TF), que puede ocurrir cuando hay una conexión abierta entre la superficie exterior e interior de un vaso sanguíneo (por ejemplo, un vaso sanguíneo roto). El TF activa el factor VII, formando el factor VIIa, lo que desencadena una cascada de reacciones que dan como resultado la rápida producción del factor Xa. Por otro lado, la vía intrínseca se activa por una lesión que se produce dentro del vaso sanguíneo. Esta vía se inicia mediante la activación del factor XII. La activación del factor XII al factor XIIa puede ocurrir en cualquier momento cuando la sangre entra en contacto con una superficie de carga negativa, por ejemplo, cuando se pone en contacto con matrices no biológicas. Se puede producir una activación cruzada entre la vía intrínseca y la vía extrínseca. Por ejemplo, además de activar el factor Xa, el factor VIIa activa el Factor IX, un componente necesario de la vía intrínseca. La producción del factor Xa da como resultado la escisión de la protrombina (factor II) en trombina (factor IIa). A

continuación, la trombina cataliza la conversión del fibrinógeno (factor I) en hilos largos y pegajosos de fibrina insoluble. Los hilos de fibrina forman una malla que atrapa las plaquetas, el plasma y, opcionalmente, las células sanguíneas. Posteriormente, la red de fibrina se contrae y exprime al menos el 95 % de su contenido líquido original, también conocido como retracción del coágulo, obteniendo así el coágulo y el líquido expulsado.

5 Mediante el uso de partículas de vidrio en combinación con una o más sales de calcio solubles en agua enseñado en el presente documento, se formará un coágulo estable que atraparán las partículas de vidrio así como los restos de plaquetas. El liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas obtenidos mediante los métodos, usos o métodos enseñados en el presente documento requerirán menos o ninguna filtración antes de su uso, ya que las plaquetas quedan atrapadas en el coágulo que es estabilizado por las partículas de vidrio.

15 En realizaciones particulares, las partículas de vidrio y la una o más sales de calcio solubles en agua son los únicos activadores de la coagulación usados en los usos o métodos enseñados en el presente documento (es decir, en la adición de los posibles activadores de la coagulación ya presentes en la composición de sangre rica en plaquetas, tal como el FXII). De manera importante, en realizaciones no se añaden activadores de la coagulación sanguínea adicionales.

20 La expresión "activador de la coagulación", tal como se usa en el presente documento, se refiere a sustancias que pueden iniciar la coagulación mediante la vía intrínseca y/o extrínseca de coagulación. Ejemplos no limitantes de activadores de la coagulación incluyen trombinas, tal como, por ejemplo, trombina humana exógena purificada o recombinante o trombina bovina (liofilizada), factores tisulares, tal como, por ejemplo, factor tisular exógeno de conejo o factor tisular humano purificado o recombinante, fosfolípidos sintéticos en combinación con aminofosfolípidos, veneno de víbora de Russell, ecarina, textarina, ácido elálgico, caolín y otros minerales arcillosos.

25 En realizaciones particulares, los usos o métodos enseñados en el presente documento no comprenden el uso de uno o más activadores de la coagulación tal como se definen en el presente documento.

30 En realizaciones particulares, en la etapa b) (es decir, dejar que la mezcla coagule) de los métodos enseñados en el presente documento, se deja que dicha mezcla coagule durante un período de 1 hora a 20 horas, de 1 a 18 horas, de 1 a 16 horas, de 1 a 14 horas, de 1 a 12 horas, de 1 a 10 horas, de 1 a 8 horas, de 1 a 6 horas, de 1 a 4 horas, preferentemente de 2 a 6 horas, más preferentemente de 2 a 4 horas. Por ejemplo, se deja que dicha mezcla coagule durante un periodo de 3 horas.

35 En realizaciones particulares, la etapa b) de los métodos enseñados en el presente documento se efectúa a una temperatura de 5 °C a 42 °C, de 15 °C a 40 °C, de 20 °C a 40 °C, de 15 °C a 25 °C, de 20 a 25 °C, preferentemente de 15 °C a 40 °C. Por ejemplo, la etapa b) de los métodos enseñados en el presente documento se realiza a temperatura ambiente o a aproximadamente 37 °C. Después de haber puesto en contacto la composición de sangre rica en plaquetas con partículas de vidrio y la una o más sales de calcio solubles en agua y después de dejar que la mezcla obtenida en la etapa a) coagule obteniendo así un coágulo y un liberado de plaquetas, las partículas de vidrio (por ejemplo, comprendidas por el coágulo) se eliminan preferentemente de la totalidad o una parte del liberado de plaquetas para evitar la interferencia de las partículas de vidrio en el uso posterior del liberado de plaquetas. De acuerdo con ello, en realizaciones particulares, al menos parte, preferentemente de manera sustancial la totalidad (por ejemplo, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % o al menos el 95 %, preferentemente al menos el 95 %), del liberado de plaquetas se recupera de la muestra, es decir, se retira del contacto físico con las partículas de vidrio (por ejemplo, comprendidas por el coágulo).

En realizaciones particulares, en la etapa c) dicho liberado de plaquetas obtenido en la etapa b) se recupera de la mezcla simplemente recogiendo la fase líquida que contiene el liberado o mediante centrifugación.

50 En realizaciones particulares, en la etapa c) dicho liberado de plaquetas obtenido en la etapa b) se recupera de la mezcla haciendo pasar la mezcla a través de al menos un filtro.

55 El término "filtro", tal como se usa en el presente documento, tiene su significado habitual en el sentido de que se refiere a una sustancia, dispositivo o membrana porosa a través del cual se hace pasar líquido para eliminar impurezas suspendidas o partículas sólidas y/o para recuperar sólidos.

En realizaciones particulares, el filtro es un filtro de membrana, tal como una película microporosa de nitrocelulosa, poliuretano y/o poliéster.

60 La expresión "tamaño de poro" se refiere al tamaño medio de uno o más poros en una superficie de una membrana o un filtro. El tamaño de los poros también está relacionado con la capacidad del filtro para filtrar partículas de determinado tamaño. Por ejemplo, un filtro con un tamaño de poro de 0,50 µm filtrará partículas con un diámetro de 0,50 µm o más de una corriente de filtración. El tamaño de los poros se puede determinar mediante cualquier método conocido por el experto para determinar el tamaño de los poros, tal como un examen visual usando microscopía electrónica de barrido, porosimetría, espectroscopia de correlación y/o seguimiento de partículas individuales. Los poros pueden ser poros cilíndricos o esponjosos.

En realizaciones particulares, el filtro tiene al menos un poro (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco o más).

5 En realizaciones particulares, en la etapa c) dicho liberado de plaquetas obtenido en la etapa b) se recupera de la mezcla haciendo pasar la mezcla a través de al menos un filtro (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco o más), en donde el al menos un filtro tiene un tamaño de poro que es menor que el tamaño de partícula o el diámetro de la partícula de vidrio más pequeña. El filtro puede ser cualquier filtro conocido en la técnica para filtrar el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas, tal como los MZP de cápsula de la serie MZP (ZenPure, Hitma), filtros Sartopure® GF Plus (Sartorius Stedim Biotech) y filtros Sartopure® PP3 (Sartorius Stedim Biotech).

10 En realizaciones particulares, en la etapa c) dicho liberado de plaquetas obtenido en la etapa b) se recupera de la mezcla haciendo pasar la mezcla a través de al menos un filtro (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco o más), en donde al menos un filtro tiene un tamaño de poro que es menor que el tamaño de partícula o el diámetro de la partícula de vidrio más pequeña e inferior a 0,2 µm.

15 En realizaciones particulares, el paso del liberado de plaquetas a través del filtro se puede conseguir mediante cualquier método conocido por el experto. Por ejemplo, el paso del liberado de plaquetas a través del filtro se puede lograr por gravedad, vacío o presión.

20 En realizaciones particulares, los métodos para preparar un liberado de plaquetas enseñado en el presente documento no comprenden una etapa de lisis de las plaquetas presentes en la composición de sangre rica en plaquetas.

25 En realizaciones particulares, los métodos enseñados en el presente documento opcionalmente comprenden lisar las plaquetas presentes en la composición de sangre rica en plaquetas y obtener un lisado de plaquetas. Si está presente tal etapa de lisis, el método enseñado en el presente documento será un método para preparar un lisado de plaquetas y se obtendrá un lisado de plaquetas a partir de dicho coágulo y/o liberado de plaquetas obtenidos.

30 En realizaciones particulares, los métodos enseñados en el presente documento comprenden opcionalmente lisar las plaquetas presentes en el coágulo obtenido y/o el liberado de plaquetas obtenido en la etapa b), obteniendo así un lisado de plaquetas. La lisis de plaquetas se puede conseguir mediante cualquier método conocido en la técnica para lisar plaquetas, incluidos ciclos de congelación-descongelación, tratamiento con ultrasonidos, lisis química (por ejemplo, usando Triton X-100), disrupción mecánica y homogeneización de líquidos o a alta presión.

35 En realizaciones particulares, los métodos enseñados en el presente documento comprenden además al menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o más) etapas de congelación y descongelación del coágulo y/o el liberado de plaquetas obtenido en la etapa b) obteniendo así un lisado de plaquetas. La congelación y descongelación del coágulo y/o el liberado de plaquetas obtenido en la etapa b) se puede efectuar mediante cualquier método conocido en la técnica para congelar y descongelar composiciones de sangre ricas en plaquetas con el fin de destruir las plaquetas. Por ejemplo, tal como se describe en Fekete *et al.*, "Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components". *Cytotherapy* 2012;14(5):540-54). El experto comprenderá que aumentar el número de ciclos de congelación-descongelación por encima de tres puede no aumentar aún más la concentración de factores de crecimiento en el lisado de plaquetas (Strandberg *et al.*, "Standardizing the freeze-thaw preparation of growth factors from platelet lysate". *Transfusion*, 2017;57(4):1058-65). Además, los ciclos de congelación y descongelación suelen llevar mucho tiempo y pueden dañar el recipiente que contiene el lisado de plaquetas. En vista de esto, los métodos enseñados en el presente documento comprenden preferentemente como máximo tres, como máximo dos, o como máximo una, preferentemente como máximo una, etapa o etapas de congelación y descongelación.

50 En realizaciones particulares, la mezcla obtenida en la etapa a) se congela a -20 °C o menos, a -25 °C o menos, a -30 °C o menos, a -35 °C o menos, a -40 °C o menos, a -45 °C o menos, a -50 °C o menos, a -55 °C o menos, a -60 °C o menos, a -65 °C o menos, a -70 °C o menos, a -75 °C o menos, a -80 °C o menos, a -100 °C o menos, a -150 °C o menos, a -200 °C o menos, preferentemente a -80 °C o menos. Por ejemplo, la mezcla obtenida en la etapa a) se congela a una temperatura de -80 °C o a una temperatura de -196 °C a -210 °C (por ejemplo, en nitrógeno líquido).

55 En realizaciones particulares, la mezcla obtenida en la etapa a) se congela durante al menos 0,5 horas, al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 4 horas, al menos 6 horas, al menos 8 horas, al menos 10 horas, al menos 12 horas, al menos 14 horas, al menos 16 horas, al menos 18 horas, al menos 20 horas, al menos 22 horas, al menos 24 horas, al menos 26 horas, al menos 28 horas, o al menos 30 horas, preferentemente al menos 24 horas. Por ejemplo, la mezcla obtenida en la etapa a) se congela durante 24 horas.

60 En realizaciones particulares, la mezcla obtenida en la etapa a) se descongela, después de su congelamiento, a una temperatura de al menos 3 °C, al menos 4 °C, al menos 5 °C, al menos 10 °C, al menos 15 °C, al menos 20 °C, al menos 25 °C, al menos 30 °C, al menos 35°, al menos 36 °C o al menos 37 °C. Por ejemplo, la mezcla obtenida en la etapa a) se puede descongelar a 4 °C (tal como en un frigorífico), a temperatura ambiente o a 37 °C (tal como en un baño de agua tibia).

En realizaciones particulares, la al menos una etapa (tal como una, dos, tres o más) de congelación y descongelación se efectúa antes de la etapa c).

- 5 En realizaciones particulares, los métodos para preparar el liberado de plaquetas enseñado en el presente documento comprenden una etapa de almacenamiento del liberado de plaquetas recuperado en la etapa c).

En realizaciones particulares, los métodos para preparar el liberado de plaquetas enseñado en el presente documento comprenden una etapa de liofilización del liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas.

- 10 En realizaciones particulares, los métodos para preparar un liberado o un lisado de plaquetas enseñado en el presente documento no comprenden una etapa de adición activa de polipéptidos, proteínas, péptidos, lípidos, carbohidratos o ácidos nucleicos de mamíferos no humanos a la composición rica en plaquetas, las partículas de vidrio, la una o más sales de calcio solubles en agua, el liberado de plaquetas y/o el lisado de plaquetas. Por ejemplo, los métodos para preparar el liberado o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento no comprenden una etapa de adición activa de heparina derivada de un mamífero no humano, tal como heparina bovina o porcina, a la composición rica en plaquetas, las partículas de vidrio, la una o más sales de calcio solubles en agua, el liberado de plaquetas y/o el lisado de plaquetas.

- 20 Los métodos actualmente existentes para preparar un liberado o un lisado de plaquetas no se efectúan actualmente en un sistema cerrado, lo que aumenta el riesgo de contaminación del liberado o el lisado de plaquetas con patógenos ambientales.

- 25 En realizaciones particulares, el método para preparar el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento se realiza en condiciones estériles y se realiza en un sistema esencialmente cerrado. Como resultado de esto, el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas obtenido mediante el método enseñado en el presente documento está sustancialmente libre de patógenos ambientales (es decir, patógenos que aún no estaban presentes en la composición de sangre rica en plaquetas antes de iniciar el método enseñado en el presente documento).

- 30 En realizaciones particulares, los métodos para preparar el liberado de plaquetas enseñado en el presente documento se realizan usando el sistema para preparar el liberado de plaquetas enseñado en el presente documento.

- 35 En una realización preferente, los métodos para preparar el liberado de plaquetas enseñado en el presente documento comprenden las siguientes etapas:

- poner un primer espacio contenedor (1') de un primer contenedor (1) y un segundo espacio contenedor (2') de un segundo contenedor (2) en comunicación fluida; en donde dicho primer espacio contenedor (1') (i) está configurado para recibir una cantidad (Q_{bc}) de una composición de sangre rica en plaquetas contenida en un segundo espacio contenedor (2') de un segundo contenedor (2); y (ii) tiene una cantidad (Q_{gp}) de partículas de vidrio (3) y una cantidad (Q_{cc}) de una o más sales de calcio solubles en agua (4); y en donde dicho segundo espacio contenedor (2') contiene una cantidad (Q_{bc}) de una composición de sangre rica en plaquetas;
- permitir que la composición de sangre rica en plaquetas fluya del segundo espacio contenedor (2') al primer espacio contenedor (1');
- 45 - opcionalmente interrumpir la comunicación fluida entre el segundo espacio contenedor (2') y el primer espacio contenedor (1');
- mezclar la composición de sangre rica en plaquetas, las partículas de vidrio (3) y la una o más sales de calcio solubles en agua (4), obteniendo así una mezcla;
- dejar que la mezcla obtenida coagule obteniendo así un coágulo y un liberado de plaquetas;
- 50 - poner el primer espacio contenedor (1') del primer contenedor (1) y un cuarto espacio contenedor de un cuarto contenedor en comunicación fluida, en donde el cuarto espacio contenedor está configurado para recibir y/o contener el liberado de plaquetas preparado usando el sistema;
- recuperar el liberado de plaquetas obtenido en la etapa b) de la mezcla; y
- 55 - opcionalmente interrumpir la comunicación fluida entre el cuarto espacio contenedor y el primer espacio contenedor (1').

En realizaciones particulares, los métodos para preparar el liberado de plaquetas enseñado en el presente documento comprenden las siguientes etapas:

- 60 - poner un primer espacio contenedor (1') de un primer contenedor (1) en comunicación fluida con un segundo espacio contenedor (2') de un segundo contenedor (2); en donde dicho segundo espacio contenedor (2') contiene una cantidad (Q_{bc}) de una composición de sangre rica en plaquetas; en donde dicho primer espacio contenedor (1') (i) está configurado para recibir una cantidad (Q_{bc}) de una composición de sangre rica en plaquetas comprendida en un segundo espacio contenedor (2') de un segundo contenedor (2); (ii) contiene una cantidad (Q_{gp}) de partículas de vidrio (3); y (iii) comprende una primera abertura configurada para conectarse a una abertura de un tercer espacio contenedor (5') de un tercer contenedor (5), y en donde dicho tercer espacio contenedor (5')
- 65

comprende una cantidad (Q_{cc}) de una o más sales de calcio solubles en agua (4);

- permitir que la composición de sangre rica en plaquetas fluya del segundo espacio contenedor (2') al primer espacio contenedor (1');

5 - opcionalmente interrumpir la comunicación fluida entre el primer espacio contenedor (1') y el segundo espacio contenedor (2');

- poner el tercer espacio contenedor (5') del tercer contenedor (5), que contiene una cantidad (Q_{cc}) de una o más sales de calcio solubles en agua (4), en comunicación fluida con el primer espacio contenedor (1'), permitiendo que la una o más sales de calcio solubles en agua (4) fluyan del tercer espacio contenedor (5') al primer espacio contenedor (1'); y opcionalmente interrumpir la comunicación fluida entre el tercer espacio contenedor (5') y el primer espacio contenedor (1');

10 - mezclar la composición de sangre rica en plaquetas, las partículas de vidrio y la una o más sales de calcio solubles en agua obteniendo así una mezcla;

- dejar que la mezcla obtenida coagule obteniendo así un coágulo y un liberado de plaquetas;

15 - poner el primer espacio contenedor (1') del primer contenedor (1) y un cuarto espacio contenedor de un cuarto contenedor en comunicación fluida;

- recuperar (6) el liberado de plaquetas obtenido en la etapa b) de la mezcla; y

- opcionalmente interrumpir la comunicación fluida entre el cuarto espacio contenedor y el primer espacio contenedor (1').

20 En realizaciones particulares, poner el segundo espacio contenedor (2') de un segundo contenedor (2) en comunicación fluida con el primer espacio contenedor (1') de un primer contenedor (1), poner el tercer espacio contenedor (5') del tercer contenedor (5) en comunicación fluida con el primer espacio contenedor (1') de un primer contenedor (1); y/o poner el cuarto espacio contenedor del cuarto contenedor en comunicación fluida con el primer espacio contenedor (1') de un primer contenedor (1) se efectúa mediante una conexión de tubo estéril tal como se conoce en la técnica.

25

De esta manera, los métodos y sistemas divulgados en el presente documento proporcionan un sistema cerrado completamente estéril para preparar un liberado de plaquetas o un lisado de plaquetas.

30 En realizaciones particulares, si, por ejemplo el tercer contenedor es una jeringa que comprende una aguja hueca, poner el tercer espacio contenedor (5') del tercer contenedor (5) en comunicación fluida con el primer espacio contenedor (1') se puede efectuar inyectando la cantidad (Q_{cc}) de una o más sales de calcio solubles en agua (4) en el primer contenedor.

35 En realizaciones particulares, poner el segundo espacio contenedor (2') del segundo contenedor (2) en comunicación fluida con el primer espacio contenedor (1') del primer contenedor (1) y/o interrumpir la comunicación fluida entre el primer espacio contenedor (1') y el segundo espacio contenedor (2'); se puede efectuar mediante soldadura. Por ejemplo, para poner el segundo espacio contenedor (2') de un segundo contenedor (2) en comunicación fluida con el primer espacio contenedor (1') de un primer contenedor (1), se puede soldar un tubo que está en comunicación fluida con el primer espacio contenedor (1') a un tubo que está en comunicación fluida con el segundo espacio contenedor (2') tal como se conoce en la técnica.

40

45 De manera similar, en realizaciones particulares, poner el tercer espacio contenedor (3') del tercer contenedor (3) en comunicación fluida con el primer espacio contenedor (1') del primer contenedor (1) se puede efectuar mediante soldadura. Por ejemplo, para poner el tercer espacio contenedor (3') del tercer contenedor (3) en comunicación fluida con el primer espacio contenedor (1') del primer contenedor (1), se puede soldar un tubo que está en comunicación fluida con el tercer espacio contenedor (3') a un tubo que está en comunicación fluida con el primer espacio contenedor (1').

50 En realizaciones particulares, poner el cuarto espacio contenedor del cuarto contenedor en comunicación fluida con el primer espacio contenedor (1') del primer contenedor (1) y/o interrumpir la comunicación fluida entre el primer espacio contenedor (1') y el cuarto espacio contenedor; se puede efectuar mediante soldadura. Por ejemplo, para poner el cuarto espacio contenedor del cuarto contenedor en comunicación fluida con el primer espacio contenedor (1') del primer contenedor (1), se puede soldar un tubo que está en comunicación fluida con el primer espacio contenedor (1') a un tubo que está en comunicación fluida con el cuarto espacio contenedor (2') tal como se conoce en la técnica.

55

60 En realizaciones particulares, la soldadura se efectúa mediante un soldador de tubos estéril. Por ejemplo, un soldador de tubos estéril TSCD® II o TSCD-Q® de Terumo™. El experto entenderá que las realizaciones particulares con respecto a los usos y los sistemas para preparar el liberado de plaquetas enseñado en el presente documento también son aplicables al método para preparar el liberado de plaquetas a partir de una muestra de una composición de sangre rica en plaquetas enseñado en el presente documento y viceversa. Un aspecto adicional proporciona un liberado de plaquetas obtenido mediante los métodos enseñados en el presente documento.

65 En realizaciones particulares, el liberado de plaquetas obtenido mediante los métodos enseñados en el presente documento comprende factores de coagulación, moléculas pequeñas, equivalentes de energía, quimiocinas, citocinas,

moléculas de adhesión, hormonas, moléculas inmunológicas y reguladores del crecimiento (o factores de crecimiento), división celular, apoptosis y/o angiogénesis y/o factores de unión.

La expresión "factores de unión", tal como se usa en el presente documento, se refiere a proteínas estructurales o sustancias similares a proteínas que tienen capacidades adherentes y aumentan las interacciones célula-sustrato entre células dependientes de anclaje y un sustrato tal como un matraz de cultivo celular. Ejemplos no limitantes de factores de unión incluyen fibronectina, vitronectina, factor de Von Willebrand, glicocalicina y sCD62P.

En realizaciones particulares, el liberado de plaquetas obtenido mediante los métodos enseñados en el presente documento comprende uno o más factores de crecimiento seleccionados entre el grupo que consiste en factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor plaquetario 4 y angiopoyetinas. La presencia o ausencia de estos factores de crecimiento en el liberado de plaquetas se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica, tales como inmunoensayos (por ejemplo, ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), transferencia Western) y ensayos proteómicos.

En realizaciones particulares, el liberado de plaquetas obtenido mediante los métodos enseñados en el presente documento comprende una o más hormonas seleccionadas entre el grupo que consiste en serotonina, adrenalina, histamina, tromboxanos, prostaglandinas, ceramidas y esfingolípidos.

Un aspecto adicional proporciona un lisado de plaquetas obtenido mediante los métodos enseñados en el presente documento.

En realizaciones particulares, el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas obtenido mediante los métodos enseñados en el presente documento tiene una transmitancia que es de al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, o al menos el 95 % de la transmitancia del agua destilada, preferentemente cuando se mide a una longitud de onda de 680 nm.

En realizaciones particulares, el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas obtenido mediante los métodos enseñados en el presente documento tiene una transmitancia que es de al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % o al menos el 95 %, preferentemente al menos el 90 %, de la transmitancia del agua destilada, preferentemente cuando se mide a una longitud de onda de 680 nm, en donde los métodos enseñados en el presente documento comprenden al menos una etapa de paso del liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas a través de un filtro con un tamaño de poro de como máximo 0,2 μ m.

En realizaciones particulares, el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento comprende una concentración de Ca^{2+} residual después de la coagulación de como máximo 1,5 mM, como máximo 1,4 mM, como máximo 1,3 mM, como máximo 1,2 mM, como máximo 1,1 mM, como máximo 1 mM, como máximo 0,9 mM, como máximo 0,8 mM, como máximo 0,7 mM, como máximo 0,6 mM, como máximo 0,5 mM, como máximo 0,4 mM, como máximo 0,35 mM, como máximo 0,34 mM, como máximo 0,33 mM, como máximo 0,32 mM, como máximo 0,31 mM, como máximo 0,3 mM, como máximo 0,29 mM, como máximo 0,28 mM, como máximo 0,27 mM, como máximo 0,26 mM o como máximo 0,25 mM, preferentemente como máximo 0,35 mM. La concentración de Ca^{2+} (es decir, iones de calcio) en el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica para determinar iones Ca^{2+} , tal como, por ejemplo, mediante análisis de gases en sangre utilizando electrodos selectivos de iones incorporados.

En realizaciones particulares, por ejemplo, si el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas se obtiene a partir de una composición de sangre humana rica en plaquetas, el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento está sustancialmente exento de cualquier polipéptido, proteínas, péptidos, lípidos, carbohidratos (tales como polisacáridos) o ácidos nucleicos derivados de un mamífero no humano. La expresión "sustancialmente exento" cuando se usa en el presente documento con referencia a polipéptidos, proteínas, péptidos, lípidos, carbohidratos (tales como polisacáridos) o ácidos nucleicos derivados de un mamífero no humano se refiere al liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento al que no se han añadido activamente polipéptidos, proteínas, péptidos, lípidos, carbohidratos o ácidos nucleicos de mamíferos no humanos (es decir, no presentes inherentemente en ellos). Por ejemplo, el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento está sustancialmente exento de heparina derivada de un mamífero no humano, tal como la heparina bovina o porcina.

En realizaciones particulares, el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento puede estar comprendido en una composición farmacéutica o cosmética.

En realizaciones particulares, el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento es líquido, semisólido o sólido. Se puede obtener una forma sólida del liberado de plaquetas o del lisado de plaquetas enseñado en el presente documento liofilizando el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas.

Un aspecto adicional proporciona una composición farmacéutica que comprende el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento y opcionalmente uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

5 Un aspecto adicional proporciona una composición cosmética que comprende el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento y opcionalmente uno o más vehículos cosméticamente aceptables.

10 Un aspecto adicional proporciona una composición que comprende una composición de sangre rica en plaquetas, de 0,10 mM a 20,0 mM de iones Ca^{2+} , además de los iones Ca^{2+} presentes en la composición de sangre rica en plaquetas, y de 0,010 g a 0,60 g de partículas de vidrio por ml de dicha composición de sangre rica en plaquetas.

15 En realizaciones particulares, las composiciones enseñadas en el presente documento comprenden hormonas, factores de crecimiento y/o factores de unión. Estas hormonas, factores de crecimiento y/o factores de unión normalmente se liberan a partir de las plaquetas presentes en la composición de sangre rica en plaquetas.

20 En realizaciones particulares, las composiciones enseñadas en el presente documento comprenden uno o más factores de crecimiento seleccionados entre el grupo que consiste en factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF)), factor plaquetario 4 y angiopoyetinas. La presencia o ausencia de estos factores de crecimiento en la composición se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como inmunoensayos (por ejemplo, ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), transferencia Western) y ensayos proteómicos

25 En realizaciones particulares, dicha composición está comprendida en un envase, preferentemente un envase de calidad médica. Ejemplos no limitantes de envases adecuados incluyen bolsas de transferencia de calidad médica, frascos o botellas.

30 De acuerdo con ello, también se proporciona en el presente documento un envase que comprende la composición enseñado en el presente documento.

35 En realizaciones particulares, dicha composición o envase que comprende la composición se almacena a una temperatura de $-210\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por ejemplo, la composición o el envase se pueden almacenar a una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-210\text{ }^{\circ}\text{C}$ (por ejemplo, en nitrógeno líquido), a una temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (por ejemplo, en un congelador), a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (por ejemplo, en un congelador), a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (por ejemplo, en un frigorífico) o a temperatura ambiente. Si la composición o el envase se almacena a temperatura ambiente, la composición se liofiliza preferentemente antes de su almacenamiento. La composición se puede almacenar durante un periodo de hasta un año o más (tal como 2 años).

40 Un aspecto adicional proporciona el liberado de plaquetas, el lisado de plaquetas o la composición farmacéutica que comprende el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento para su uso como medicamento.

45 El liberado de plaquetas, el lisado de plaquetas o la composición farmacéutica que comprende el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento se puede usar para tratar enfermedades o trastornos en varios campos médicos de subespecialidad, incluyendo reumatología, ortopedia, dermatología, odontología, estomatología, oftalmología, ginecología, endocrinología y cirugía plástica. Ejemplos no limitantes de tales enfermedades o trastornos incluyen heridas (por ejemplo, heridas crónicas o agudas), lesiones de tejidos duros (por ejemplo, huesos) y de tejidos blandos, enfermedades inflamatorias, enfermedades óseas, osteonecrosis, enfermedad de la superficie ocular, trastornos neurodegenerativos, arteriopatía periférica, artrosis, degeneración del disco intervertebral, lesión del manguito de los rotadores, lesión de los isquiotibiales, síndrome de dolor del trocánter mayor, artroplastia, síndrome del túnel carpiano, epicondilitis, fascitis plantar, tendinopatías, vitíligo, alopecia, melasma, úlceras varicosas en las piernas, quemaduras, cicatrices (acné), implantes dentales, hendidura alveolar, procedimientos de endodoncia, cirugía maxilofacial, complicaciones del glaucoma, úlcera corneal neurótrofa, síndrome del ojo seco grave, líquen escleroso, enfermedad endometrial, atrofia vaginal, úlceras diabéticas e infecciones postoperatorias, hinchazón y dolor.

60 Un aspecto adicional proporciona el liberado de plaquetas, el lisado de plaquetas o la composición farmacéutica que comprende el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento para su uso en el tratamiento de lesiones de tejidos duros y blandos, enfermedades inflamatorias (por ejemplo, tendinitis, periodontitis, fascitis plantar, bursitis trocánterea y epicondilitis), enfermedades óseas (por ejemplo, osteonecrosis), enfermedades degenerativas de las articulaciones (por ejemplo, artrosis), discopatías degenerativas (por ejemplo degeneración de los discos intervertebrales), afecciones de la piel (por ejemplo, líquen escleroso, trastornos de la pigmentación de la piel tales como vitíligo y melasma), alopecia areata, enfermedad endometrial, atrofia vaginal, enfermedades de la superficie ocular (por ejemplo, síndrome del ojo seco grave, complicaciones del glaucoma tal como sequedad ocular), síndrome del túnel carpiano, trastornos neurodegenerativos (por ejemplo, enfermedad de Parkinson y enfermedad de

Alzheimer), arteriopatía periférica y dolor (por ejemplo, dolor posoperatorio, dolor radicular y dolor lumbar (lumbalgia), dolor de rodilla, dolor de tobillo, dolor de cadera y dolor de hombro) que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz del liberado de plaquetas, el lisado de plaquetas o la composición farmacéutica que comprende el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas.

5 Un aspecto adicional proporciona un método para tratar lesiones de tejidos duros y blandos, enfermedades inflamatorias (por ejemplo, tendinitis, periodontitis, fascitis plantar, bursitis trocantérea y epicondilitis), enfermedades óseas (por ejemplo, osteonecrosis), enfermedades degenerativas de las articulaciones (por ejemplo, artrosis), discopatías degenerativas (por ejemplo degeneración de los discos intervertebrales), afecciones de la piel (por ejemplo, líquen escleroso, trastornos de la pigmentación de la piel tales como vitiligo y melasma), alopecia areata, enfermedad endometrial, atrofia vaginal, enfermedades de la superficie ocular (por ejemplo, síndrome del ojo seco grave, complicaciones del glaucoma tal como sequedad ocular), síndrome del túnel carpiano, trastornos neurodegenerativos (por ejemplo, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer), arteriopatía periférica y dolor (por ejemplo, dolor posoperatorio, dolor radicular y dolor lumbar (lumbalgia), dolor de rodilla, dolor de tobillo, dolor de cadera y dolor de hombro) que comprende administrar una cantidad eficaz del liberado de plaquetas, el lisado de plaquetas o la composición farmacéutica que comprende el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento a un sujeto.

20 Los términos "tratar" o "tratamiento" abarcan tanto el tratamiento terapéutico de una enfermedad o afección ya desarrollada, tal como la terapia de lesiones de tejidos duros y blandos, enfermedades inflamatorias, enfermedades óseas, enfermedades degenerativas de las articulaciones, discopatías degenerativas, afecciones cutáneas, alopecia areata, enfermedad endometrial, atrofia vaginal, enfermedad de la superficie ocular, síndrome del túnel carpiano, trastornos neurodegenerativos, arteriopatía periférica y dolor ya desarrolladas, así como las medidas profilácticas o preventivas, en donde el objetivo es prevenir o disminuir la posibilidades de incidencia de una afección no deseada, tal como evitar la aparición, el desarrollo y la progresión de lesiones de tejidos duros y blandos, enfermedades inflamatorias, enfermedades óseas, enfermedades degenerativas de las articulaciones, discopatías degenerativas, afecciones cutáneas, alopecia areata, enfermedad endometrial, atrofia vaginal, enfermedad de la superficie ocular, síndrome del túnel carpiano, trastornos neurodegenerativos, arteriopatía periférica y dolor. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, sin limitación, el alivio de uno o más síntomas o uno o más marcadores biológicos, la disminución del grado de la enfermedad, el estado estabilizado (es decir, no empeoramiento) de la enfermedad, el retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o el alivio de la patología y similares. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

35 La expresión "cantidad eficaz", tal como se usa en el presente documento con respecto al uso terapéutico del liberado o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento, se refiere a una cantidad del liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento o una composición farmacéutica que comprende el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento que provoca la respuesta biológica o terapéutica en un sujeto ("cantidad terapéuticamente eficaz") y/o que inhibe o retrasa en un sujeto la aparición de un trastorno ("cantidad profilácticamente eficaz") que busca un cirujano, investigador, veterinario, médico u otro terapeuta, que puede incluir, entre otros, el alivio de los síntomas de la enfermedad o trastorno que se está tratando. Se conocen métodos en la técnica para determinar dosis terapéutica y/o profilácticamente eficaces de un liberado de plaquetas o un lisado de plaquetas enseñado en el presente documento o una composición farmacéutica que comprende el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento.

45 Ejemplos no limitantes de lesiones de tejidos duros y blandos incluyen úlceras (por ejemplo, úlceras corneales neurótroficas, úlceras diabéticas del pie, úlceras varicosas en las piernas, úlceras por presión y fisuras anales), heridas quirúrgicas, quemaduras y cicatrices. Dado que el liberado de plaquetas, el lisado de plaquetas o la composición farmacéutica que comprende el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento se pueden usar para la curación de tejidos duros tales como huesos así como tejidos blandos tales como la piel, el liberado de plaquetas, el lisado de plaquetas o la composición farmacéutica que comprende el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento se pueden usar para curar lesiones tisulares resultantes de una lesión del manguito de los rotadores, lesión de los isquiotibiales, implantes dentales, reparación de hendiduras alveolares, procedimientos de endodoncia, cirugía maxilofacial, artroplastia, blefaroplastia y lipotransferencia facial.

55 Un aspecto adicional proporciona el uso del liberado de plaquetas, el lisado de plaquetas o la composición cosmética que comprende el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñados en el presente documento para mejorar el aspecto de la piel y/o del cabello.

60 En realizaciones particulares, el uso del liberado de plaquetas, el lisado de plaquetas o la composición cosmética que comprende el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñados en el presente documento para rejuvenecer la piel, mejorar el aspecto de la piel y/o del cabello comprende reducir las arrugas (por ejemplo, arrugas faciales) y las cicatrices, aumentar la firmeza y la elasticidad de la piel, mejorar la textura, el tono de piel y/o el color de la piel y/o aumentar el crecimiento del cabello, el número de cabellos, el espesor del cabello y/o la fase de crecimiento del ciclo capilar.

65 En realizaciones particulares, el uso del liberado de plaquetas, el lisado de plaquetas o la composición cosmética que

- comprende el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñados en el presente documento para mejorar el aspecto de la piel y/o del cabello comprende aplicar por vía tópica sobre la piel un volumen del liberado de plaquetas, el lisado de plaquetas o la composición cosmética que comprende el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñados en el presente documento o inyectar un volumen del liberado de plaquetas o del lisado de plaquetas enseñado en el presente documento en la epidermis, la dermis o la hipodermis de la piel, preferentemente mediante microagujas.
- En realizaciones particulares, el uso del liberado de plaquetas, el lisado de plaquetas o la composición cosmética que comprende el liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñados en el presente documento para mejorar el aspecto de la piel y/o del cabello no es un método de tratamiento.
- Los presentes inventores han descubierto que el método enseñado en el presente documento permite preparar un liberado de plaquetas o un lisado de plaquetas que no conduce a la formación de precipitaciones cuando se añade a un medio de crecimiento.
- De acuerdo con ello, un aspecto adicional proporciona el uso del liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento en un cultivo celular o un cultivo de tejidos *in vitro*.
- Un aspecto adicional proporciona el uso del liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento para mantener células o tejidos *in vitro* y/o para mejorar el crecimiento de células *in vitro*.
- En realizaciones particulares, el uso del liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento en un medio de crecimiento de células puede mejorar el crecimiento de las células en de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 5 veces, en comparación con el crecimiento de las células si el medio de crecimiento de las células se suplementa con la misma cantidad de suero, más particularmente FBS.
- Un aspecto adicional proporciona el uso del liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento como sustituto del suero, tal como FBS, en un medio de crecimiento. En realizaciones particulares, el uso de los liberados de plaquetas o los lisados de plaquetas enseñados en el presente documento en un cultivo celular o un cultivo de tejidos *in vitro* para mantener células o tejidos *in vitro* y/o para mejorar el crecimiento de células *in vitro* comprende añadir una cantidad eficaz de un liberado de plaquetas o un lisado de plaquetas enseñado en el presente documento al medio de crecimiento de las células.
- De manera similar, otro aspecto proporciona un método *in vitro* para mantener células o tejidos *in vitro* o para mejorar el crecimiento de células *in vitro* que comprende añadir una cantidad eficaz de un liberado de plaquetas o un lisado de plaquetas enseñado en el presente documento al medio de crecimiento de las células.
- La expresión "cantidad eficaz", tal como se usa en el presente documento con respecto al uso *in vitro* del liberado o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento, se refiere a una cantidad del liberado de plaquetas o del lisado de plaquetas enseñado en el presente documento que provoca la respuesta biológica *in vitro* deseada. Se conocen métodos en la técnica para determinar dosis eficaces del liberado de plaquetas o el lisado de plaquetas enseñado en el presente documento en un cultivo de células y/o tejidos *in vitro*.
- La expresión "medio de crecimiento" o "medio de cultivo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un sólido, líquido o semisólido diseñado para favorecer el crecimiento de células o tejidos. El medio de crecimiento normalmente comprende macronutrientes (por ejemplo, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio o azufre), micronutrientes (por ejemplo, hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, molibdeno), vitaminas, aminoácidos, uno o más azúcares (por ejemplo, glucosa), sales inorgánicas y/o proteínas (por ejemplo, transferrina). Los medios de crecimiento son bien conocidos en la técnica y pueden variar dependiendo del tipo de célula o tejido cultivado, así como del propósito del cultivo (por ejemplo, diferenciación, expansión o mantenimiento). Ejemplos no limitantes de medios de crecimiento incluyen el medio esencial mínimo (MEM) de Eagle, medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo alfa modificado (alfa-MEM), medio basal esencial (BME), medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), medio BGJb, mezcla de nutrientes F-12 (Ham), Leibovitz L-15, DMEM/F-12, medio esencial modificado de Eagle (EMEM), RPMI-1640, medio 199, MB 752/1 de Waymouth o medio E de Williams, medio basal de células madre mesenquimales, y modificaciones y/o combinaciones de estos.
- En realizaciones particulares, el medio de crecimiento comprende CaCl_2 , MgSO_4 , KCl , NaHCO_3 , NaCl y fosfato, o sus sales.
- En realizaciones particulares, el medio de crecimiento es DMEM, tal como DMEM con bajo contenido de glucosa y piruvato de sodio. En realizaciones particulares, el medio de crecimiento es DMEM y comprende aproximadamente 0,2 g/l de CaCl_2 , aproximadamente 0,1 g/l de MgSO_4 , aproximadamente 0,4 g/l de KCl , aproximadamente 3,7 g/l de NaHCO_3 , aproximadamente 6,4 g/l de NaCl y aproximadamente 0,1 g/l de Na_2HPO_4 .
- En realizaciones particulares, la cantidad eficaz de liberado de plaquetas o lisado de plaquetas en el uso de los liberados de plaquetas o lisados de plaquetas enseñados en el presente documento en un cultivo celular o un cultivo

de tejidos *in vitro* o para mejorar el crecimiento celular *in vitro* comprende añadir una cantidad eficaz de liberado de plaquetas o lisado de plaquetas enseñado en el presente documento y los métodos para mejorar el crecimiento celular enseñados en el presente documento es de al menos un 0,5 % (v/v), al menos un 1,0 % (v/v), al menos un 2,0 % (v/v), al menos un 3,0 % (v/v), al menos un 4,0 % (v/v), al menos un 5,0 % (v/v), al menos un 6,0 % (v/v), al menos un 7,0 % (v/v), al menos un 8,0 % (v/v), al menos un 9,0 % (v/v), al menos un 10,0 % (v/v), al menos un 11,0 % (v/v), al menos un 12,0 % (v/v), al menos un 13,0 % (v/v), al menos un 14,0 % (v/v) o al menos 15,0 % (v/v), o al menos un 20,0 % (v/v), preferentemente entre el 5 y el 15 % (v/v), o entre el 8 y el 12 % (v/v), tal como aproximadamente un 10,0 % (v/v) del medio de crecimiento.

10 En realizaciones particulares, las células son células madre pluripotentes (PS), tales como PS de mamíferos y PS humanas, preferentemente PS humanas. En realizaciones más particulares, las células son PS inducidas.

15 La expresión "célula madre" se refiere generalmente a una célula no especializada o relativamente menos especializada y competente para la proliferación, que es capaz de autorrenovarse, es decir, puede proliferar sin diferenciación, y la cual o la descendencia de la cual puede dar lugar a al menos un tipo de célula relativamente más especializada. El término abarca células madre capaces de una autorrenovación sustancialmente ilimitada, es decir, en donde la progenie de una célula madre o al menos parte de ella conserva sustancialmente el fenotipo no especializado o relativamente menos especializado, el potencial de diferenciación y la capacidad de proliferación de la célula madre original, así como células madre que muestran una autorrenovación limitada, es decir, en donde la capacidad de la progenie o parte de ella para una mayor proliferación y/o diferenciación se reduce de manera demostrable en comparación con la célula original. A modo de ejemplo y no de limitación, una célula madre puede dar lugar a descendientes que pueden diferenciarse a lo largo de uno o más linajes para producir células cada vez más relativamente más especializadas, en donde dichos descendientes y/o células cada vez más relativamente más especializadas pueden ser ellas mismas células madre tal como se definen en el presente documento, o incluso producir células terminalmente diferenciadas, es decir, células totalmente especializadas, que pueden ser postmitóticas.

20 Tal como se usa en el presente documento, el calificativo "pluripotente" denota la capacidad de una célula para dar lugar a tipos celulares originados en las tres capas germinales de un organismo, es decir, el mesodermo, el endodermo y el ectodermo, y que es potencialmente capaz de dar lugar a todos y cada uno de los tipos de células de un organismo, aunque no sea capaz de crecer en todo el organismo.

30 En realizaciones particulares, las células son células madre pluripotentes (PS) seleccionadas entre el grupo formado por células madre mesenquimales (MSC), células madre derivadas de la sangre (BDSC), células madre derivadas de la sangre del cordón umbilical (UCBSC) y células madre derivadas de la médula ósea (BMSC). En realizaciones preferentes, las células son MSC.

35 El término "célula madre mesenquimal" o "MSC", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una célula madre adulta, derivada del mesodermo que es capaz de generar células de linajes mesenquimales, normalmente de dos o más linajes mesenquimales, más normalmente de tres o más linajes mesenquimales, por ejemplo, un linaje condro-osteoblástico (hueso y cartílago), osteoblástico (hueso), condroblástico (cartílago), miocítico (músculo), tenocítico (tendón), fibroblástico (tejido conjuntivo), adipocítico (grasa) y estromogénico (estroma medular). Las MSC se pueden aislar de una muestra biológica, preferentemente una muestra biológica de un sujeto humano, por ejemplo, médula ósea, hueso trabecular, sangre, cordón umbilical, placenta, saco vitelino fetal, piel (dermis), específicamente piel fetal y adolescente, periostio, pulpa dental, tendón y tejido adiposo.

40 El término "MSC" también abarca la progenie de MSC, por ejemplo, progenie obtenida mediante proliferación (propagación/expansión) *in vitro* o *ex-vivo* de MSC obtenidas de una muestra biológica de un animal o un sujeto humano.

50 En realizaciones particulares, el medio de crecimiento es un medio de crecimiento adecuado para cultivar células madre pluripotentes, preferentemente células madre mesenquimales.

55 En realizaciones particulares, el tejido es un tejido seleccionado entre el grupo que consiste en tejido hepático, tejido cerebral y tejido óseo.

Los aspectos y realizaciones de la invención divulgados en el presente documento están respaldados adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes.

60 Ejemplos

Ejemplo 1. Método para preparar liberados de plaquetas humanas enseñados en el presente documento

1. Materiales y métodos

Concentrado de plaquetas

En la preparación de un liberado de plaquetas humanas (hPR) se utilizaron concentrados de plaquetas (PC) caducados preparados y aprobados para transfusión. En Flandes (Bélgica), los PC caducan cuando no se transfunden en los cinco días posteriores a la donación.

Método de preparación

Se prepararon 4 combinaciones diferentes de PC (que comprendían aproximadamente un 62,5 % (v/v) de solución aditiva de plaquetas), CaCl_2 y/o perlas de vidrio sódico-cálcico:

- se añadió CaCl_2 15 mM a 40 ml de PC en un tubo de plástico de 50 ml (combinación 1);
- se añadió CaCl_2 4 mM a 40 ml de PC en un tubo de plástico de 50 ml (combinación 2);
- se añadieron 10 g de perlas de vidrio a 40 ml de PC en un tubo de plástico de 50 ml (combinación 3); o
- se añadieron 10 g de perlas de vidrio y CaCl_2 4 mM a 40 ml de PC en un tubo de plástico de 50 ml (combinación 4).

Se dejó que las 4 combinaciones coagularan durante un período de 3 horas a temperatura ambiente.

Las perlas de vidrio sódico-cálcico tenían un diámetro de 3 mm.

2. Resultados

Sólo las combinaciones 1 y 4 formaron un coágulo retraído y se obtuvo un liberado de plaquetas (figura 1A-1B). En las combinaciones 2 y 3 no se observó coagulación y no se obtuvo un liberado de plaquetas (figura 1A).

Esto indica que una combinación de perlas de vidrio sódico-cálcico y CaCl_2 permite una menor concentración de CaCl_2 (es decir, 4 mM) para preparar el liberado de plaquetas.

Ejemplo 2. Método para preparar liberados de plaquetas y lisados de plaquetas humanos enseñados en el presente documento en un sistema cerrado

Perlas de vidrio y CaCl_2 en el mismo espacio contenedor

Se unió mediante soldadura una bolsa de PC que comprendía 350 ml de PC (que comprendía aproximadamente un 62,5 % (v/v) de solución aditiva de plaquetas) a un sistema de bolsas (figura 2A), cuya bolsa de transferencia primaria contenía 70 g de perlas de vidrio sódico-cálcico (de 3 mm de diámetro) dando como resultado 0,2 g de perlas de vidrio sódico-cálcico por ml y 3,5 ml de una solución de CaCl_2 404 mM en agua (destilada y esterilizada en autoclave). Posteriormente, la bolsa de PC vacía se desoldó. El PC, el CaCl_2 y las perlas se mezclaron mediante rotación/agitación suave. El sistema de bolsas que comprendía el PC, las perlas de vidrio y el CaCl_2 se colocó con la etiqueta hacia abajo sobre una mesa a temperatura ambiente para dejar que se produjera la coagulación durante tres horas. Durante este proceso, las plaquetas se activan mediante la generación de trombina durante la coagulación y, por tanto, liberan factores de crecimiento mediante exocitosis de los gránulos. El coágulo finalmente se retrajo, momento en el cual el líquido fue expulsado del interior del coágulo, liberando factores de crecimiento adicionales del coágulo en formación (datos no mostrados), obteniendo así el liberado de plaquetas. Si la retracción del coágulo es total, queda un coágulo estable normalmente de 9 cm de largo por 6 cm de ancho, que atrapa tanto las perlas de vidrio como los restos de plaquetas. A continuación, el sistema de bolsas se puede almacenar a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ durante al menos 24 horas hasta su uso posterior. Después de la descongelación, se obtendrá un lisado de plaquetas.

Perlas de vidrio y CaCl_2 en un espacio contenedor separado

Se unió mediante soldadura una bolsa de PC que comprendía 350 ml de PC (que incluía aproximadamente un 62,5 % (v/v) de solución aditiva de plaquetas) a un sistema de bolsas (figura 2B), cuya bolsa de transferencia primaria contenía 70 g de perlas de vidrio sódico-cálcico (de 3 mm de diámetro) dando como resultado 0,2 g de perlas de vidrio sódico-cálcico por ml. A continuación, se abrió la válvula de cánula rompible de una bolsa satélite unida mediante soldadura que contenía 3,5 ml de una solución de CaCl_2 404 mM en agua (destilada y esterilizada en autoclave) para liberar el contenido en la bolsa de transferencia que contenía el PC y las perlas de vidrio (figura 2B). Posteriormente, la bolsa de PC vacía y la bolsa satélite se desoldaron. El PC, el CaCl_2 y las perlas se mezclaron mediante rotación/agitación suave. El sistema de bolsas que comprendía el PC, las perlas de vidrio y el CaCl_2 se colocó con la etiqueta hacia abajo sobre una mesa a temperatura ambiente para dejar que se produjera la coagulación durante tres horas. Durante este proceso, las plaquetas se activan mediante la generación de trombina durante la coagulación y, por tanto, liberan factores de crecimiento mediante exocitosis de los gránulos. El coágulo finalmente se retrajo, momento en el cual el líquido fue expulsado del interior del coágulo, liberando factores de crecimiento adicionales del coágulo en formación (figura 3A), obteniendo así el liberado de plaquetas. Para fines ilustrativos, el coágulo se retiró de la bolsa y se muestra en la figura 3B. Si la retracción del coágulo es total, queda un coágulo estable normalmente de 9 cm de largo por 6 cm de ancho, que atrapa tanto las perlas de vidrio como los restos de plaquetas. A continuación, el sistema de bolsas se puede almacenar a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ durante al menos 24 horas hasta su uso posterior. Después de la descongelación, se

obtendrá un lisado de plaquetas.

Ejemplo 3. Parámetros de coagulación para diferentes concentraciones de cloruro de calcio y partículas de vidrio

5

1. Materiales y métodos

Para los resultados mostrados en la figura 5A, se prepararon 8 combinaciones diferentes de PC (que comprendían aproximadamente un 62,5 % (v/v) de solución aditiva de plaquetas), CaCl₂ y/o perlas de vidrio sódico-cálcico:

10

- se añadieron CaCl₂ 5 mM y 2,5 g (combinación 1), 5 g (combinación 2), 7,5 g (combinación 3) o 10 g (combinación 4) de perlas de vidrio a 40 ml de PC;
- se añadieron CaCl₂ 4 mM y 2,5 g (combinación 5), 5 g (combinación 6), 7,5 g (combinación 7) o 10 g (combinación 8) de perlas de vidrio a 40 ml de PC.

15

Las 8 combinaciones se mezclaron mediante inversión suave y se dejaron coagular durante un período de 5 horas a temperatura ambiente.

Para los resultados mostrados en la figura 5B, se preparó el hPR mediante:

20

- adición de CaCl₂ 15 mM por ml de PC (y sin perlas de vidrio) a 350 ml de PC (que comprendía aproximadamente un 62,5 % de solución aditiva de plaquetas); o
- adición de CaCl₂ 4 mM por ml de PC y 0,20 g de perlas de vidrio por ml de PC a 350 ml de PC (que comprendía aproximadamente un 62,5 % de solución aditiva de plaquetas).

25

Las perlas de vidrio sódico-cálcico tenían un diámetro de 3 mm.

El tiempo hasta el inicio de la retracción (figura 4) se determinó midiendo el tiempo (en minutos) entre la mezcla y el momento en que el coágulo se desprendió efectivamente de los bordes del matraz. El rendimiento volumétrico se determinó mediante volumetría de la fracción líquida antes y después de la coagulación. El volumen después de la coagulación se dividió por el volumen inicial y se multiplicó por 100 para calcular el rendimiento de liberado.

30

La concentración de Ca²⁺ (es decir, iones de calcio) en el liberado de plaquetas se determinó mediante análisis de gases en sangre (RapidPoint 500, Siemens Healthcare, Erlangen, Alemania) utilizando electrodos selectivos de iones incorporados.

35

2. Resultados

El tiempo hasta la retracción del coágulo se acorta significativamente mediante la adición de cantidades crecientes de perlas de vidrio, en el contexto de dos concentraciones bajas de iones Ca²⁺ añadidos (es decir, CaCl₂ 5 mM o 4 mM) (figura 4).

40

El rendimiento de liberado no es diferente entre las combinaciones ensayadas (figura 5A). El rendimiento de liberado no es diferente entre una baja concentración de iones Ca²⁺ (es decir, CaCl₂ 4 mM) combinados con perlas de vidrio en comparación con una alta concentración de iones Ca²⁺ (es decir, CaCl₂ 15 mM) sin perlas de vidrio (figura 5B).

45

La concentración de Ca²⁺ residual después de la coagulación es menor en el liberado de plaquetas obtenido con todas las combinaciones con CaCl₂ 4 mM en comparación con todas las combinaciones con Ca²⁺ 5 mM (figura 6). De manera adicional, La figura 6 muestra que la concentración de Ca²⁺ residual en el liberado de plaquetas no es una función de la cantidad de perlas de vidrio utilizadas.

50

Ejemplo 4. Uso del liberado de plaquetas humanas enseñado en el presente documento en medios de crecimiento

La mayoría de los bancos de sangre de la UE, Canadá y Australia utilizan una solución aditiva (tal como SSP+ de Macopharma, Tourcoing, Francia) para reemplazar la fracción plasmática de PC en aproximadamente un 70 % (v/v). Esta solución aditiva contiene aniones fosfato y carbonato. Cuando se usa un liberado de plaquetas humanas preparado mediante métodos de activación de plaquetas que utilizan altas concentraciones de calcio (por ejemplo, 15 mM de una sal de calcio) en un cultivo de células o tejidos, el exceso de iones Ca²⁺ formará complejos químicos con aniones multivalentes en el medio de crecimiento al que se añade el hPR (figura 7, recuadro izquierdo). Esto lleva a problemas (por ejemplo, un crecimiento celular reducido, células estresadas e incluso muerte celular) en cultivos de células o tejidos posteriores. Los experimentos de control que utilizaron trombina para causar la coagulación no provocaron precipitación y la adición de EDTA a los complejos hizo que se disolvieran estos. Esto indica que las precipitaciones dependen del calcio. No se observan precipitaciones si se añade suero fetal bovino (FBS) al medio de crecimiento (figura 7, recuadro derecho).

55

60

65

1. Materiales y métodos

Preparación de medios de crecimiento

- 5 El medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Thermo Fisher Scientific) se suplementó con
- un 10 % (v/v) de hPR en donde el hPR se preparó con CaCl₂ 15 mM pero sin perlas de vidrio (medio de crecimiento 1, control positivo);
 - un 0 % (v/v) de hPR (medio de crecimiento 5, medio (sin hPR));
- 10 - un 10 % (v/v) de lisado de plaquetas humanas (hPL) en donde el hPL se preparó mediante ciclos convencionales de congelación y descongelación (medio de crecimiento 2, no coagulado); o
- un 10 % (v/v) de hPR en donde el hPR se preparó con CaCl₂ 5 mM o 4 mM y 0,2 g de perlas de vidrio por ml de PC (medios de crecimiento 3 y 4, CaCl₂ 5 mM y CaCl₂ 4 mM).

2. Resultados

- 15 El medio de crecimiento 1 comprendía precipitaciones (figura 8A), mientras que el medio de crecimiento 5 no comprendía ninguna precipitación (figura 8B).
- 20 El medio de crecimiento 2 no comprendía precipitaciones (figura 8C). Sin embargo, el medio de crecimiento 2 provoca la coagulación de todo el medio durante el cultivo celular. Debido a la ausencia de calcio añadido, no se produce ninguna etapa de coagulación mientras se prepara el hPL. Como resultado de esto, cuando este hPL se añade al medio de crecimiento (que contiene iones Ca²⁺) se produce una coagulación espontánea durante el cultivo celular. El medio de crecimiento se adhiere como un gel al fondo del matraz de cultivo celular en lugar de permanecer líquido.
- 25 La razón, por tanto, es que la mayoría de los medios de crecimiento contienen calcio en concentraciones suficientes para permitir la coagulación a 37 °C y un 5 % de CO₂.

Los medios de crecimiento 3 y 4 no comprenden precipitaciones (figuras 8D y 8E), lo que indica que el hPR preparado mediante los métodos enseñados en el presente documento supera el problema de las precipitaciones dependientes del calcio que se observan normalmente cuando se añade hPR preparado mediante métodos convencionales al medio de crecimiento estándar. De manera adicional, el hPR preparado mediante los métodos enseñados en el presente documento supera el problema de la coagulación después de la preparación del medio que se observa normalmente cuando se añade hPL o hPR preparado mediante métodos convencionales al medio de crecimiento estándar.

Ejemplo 5. Efecto del liberado de plaquetas humanas preparado usando 15 mM y sin perlas de vidrio en una solución similar a un medio de crecimiento.

Los iones que desempeñan un papel potencial en la precipitación del calcio se seleccionaron entre la composición de un medio de crecimiento estándar, en concreto DMEM, y una solución aditiva de plaquetas, en concreto SSP+, en combinación con CaCl₂ añadido exógenamente (tabla 1).

Tabla 1.

	HCO ₃ ⁻ (mM)	PO ₄ ³⁻ (mM)	Ca ²⁺ (mM)
DMEM	44,05	0,91	1,80
SSP+	/	28,2	/
CaCl ₂	/	/	1500

45 En el hPR preparado con CaCl₂ 15 mM sin perlas de vidrio, se midió una concentración de Ca²⁺ residual de 1,5 mM después de la coagulación. Suponiendo que la composición rica en plaquetas a partir de la cual se preparó el hPR comprendía un 70 % (v/v) de SSP+, las concentraciones teóricas de los iones seleccionados en el hPR serían las siguientes:

- 50
- HCO₃⁻ 4 mM
 - PO₄³⁻ 19,7 mM
 - Ca²⁺ 1,5 mM

Suponiendo un medio de crecimiento compuesto por un 90 % (v/v) de DMEM y un 10 % (v/v) de hPR, las concentraciones teóricas de los iones seleccionados en el medio de crecimiento + hPR serían las siguientes:

- 55
- 90 % (v/v) de DMEM + 10 % (v/v) de hPR:
 - 39,6 + 0,4 = HCO₃⁻ 40,0 mm
 - 0,8 + 2,82 = PO₄³⁻ 3,6 mM
 - 1,62 + 0,15 = Ca²⁺ 1,77 mM
- 60

Se realizaron experimentos para detectar precipitación en composiciones mínimas de iones en condiciones de cultivo celular (5 % de CO₂ y 37 °C). Se prepararon composiciones iónicas en agua tal como se indica a continuación y se incubaron en una incubadora de células. La precipitación se detectó por control visual mediante microscopía de campo brillante:

5 1. ¿Ca²⁺ y HCO₃⁻?

- NaHCO₃ 44 mM
- CaCl₂ 2 mM

10 No se observó precipitación.

2. ¿Ca²⁺ y H₂PO₄⁻?

- 15
- NaH₂PO₄ 3,73 mM
 - CaCl₂ 2 mM

No se observó precipitación.

20 3. ¿Ca²⁺ y HCO₃⁻ y H₂PO₄⁻?

- NaHCO₃ 44 mM
- NaH₂PO₄ 3,73 mM
- CaCl₂ 2 mM

25 Se observaron precipitaciones.

Los datos muestran que la precipitación de sales de calcio insolubles requiere al menos la presencia tanto de aniones fosfato como de aniones bicarbonato, en las condiciones físicas y químicas ensayadas anteriormente. Los datos también sugieren que estos aniones son suficientes para provocar la precipitación, lo que indica que cualquier medio de cultivo comercial que contenga estos aniones (al menos en las concentraciones ensayadas) sufriría precipitaciones de sales de calcio insolubles utilizando hPR al 10 % (v/v) preparado con CaCl₂ ≥ 15 mM y sin perlas de vidrio.

35 **Ejemplo 6. Efecto del liberado de plaquetas humanas enseñado en el presente documento sobre el crecimiento celular.**

1. Materiales y métodos

Se cultivaron células madre mesenquimales (MSC) derivadas de tejido adiposo en medio de crecimiento DMEM suplementado con diferentes tipos de hPR o hPL al 10 % (v/v) o FBS al 10 % (v/v). Los diferentes tipos de hPR incluyen:

- 45
- hPL preparado mediante dos ciclos de congelación y descongelación seguidos de una centrifugación ("estándar");
 - hPR preparado con CaCl₂ 5 mM y 0,2 g de perlas de vidrio por ml de PC ("CaCl₂ + perlas de vidrio");
 - hPL (nLiven PR™) de Cook Regentec ("Competidor 1");
 - hPL (PLTMax™; SCM141) de EMD Merck Millipore ("Competidor 2"); y
 - hPR (rango múltiple; número de referencia BC0190020 / BC0190030) de Macopharma ("Competidor 3").

50 El tiempo de duplicación celular de las MSC se determinó mediante recuento de células en un hemocitómetro (tipo Malassez) en función del tiempo de cultivo.

2. Resultados

55 La figura 9 muestra que el tiempo de duplicación celular para "CaCl₂ + perlas de vidrio" es aproximadamente 2,4 veces más rápido en comparación con el FBS. Además, el tiempo de duplicación celular para "CaCl₂ + perlas de vidrio" es más o menos el mismo que el tiempo de duplicación celular para el hPR "estándar" y el hPR de tres competidores comerciales.

60 **Ejemplo 7. Efecto del liberado de plaquetas humanas enseñado en el presente documento sobre el estrés celular**

1. Materiales y métodos

65 Se cultivaron células madre mesenquimales (MSC) derivadas de tejido adiposo en medio de crecimiento DMEM suplementado con hPR al 10 % (v/v) preparado con CaCl₂ 15 mM sin perlas de vidrio o hPR al 10 % (v/v) preparado

con CaCl_2 4 mM y 0,20 g de perlas de vidrio por ml de PC.

El efecto sobre el estrés celular y la muerte celular se determinó mediante microscopía.

5 2. Resultados

La figura 10 muestra que las MSC cultivadas en medio de crecimiento DMEM suplementado con hPR al 10 % (v/v) preparado con CaCl_2 15 mM sin perlas de vidrio (figura 10A) sufren estrés celular e incluso muerte celular, mientras que las MSC cultivadas en medio de crecimiento DMEM suplementado con hPR al 10 % (v/v) preparado con CaCl_2 4 mM y 0,20 g de perlas de vidrio por ml de PC parecen sanas (figura 10B).

Ejemplo 8. Efecto de diferentes tipos de partículas a base de sílice sobre el tiempo de coagulación.

Se añadieron PC pareados (350 ml, que comprendían aproximadamente un 62,5 % (v/v) de solución aditiva de plaquetas) a bolsas que contenían 0,20 g/ml, 0,15 g/ml o 0,10 g/ml de perlas de vidrio de borosilicato. Se añadió 6 mM, 5 mM o 4 mM de CaCl_2 a la mezcla de PC y perlas de vidrio. Se registró el tiempo hasta la retracción total. El PC se consideró "no retraído" cuando se requirieron > 3 h de registro (figura 11, indicado con una "X"). La retracción satisfactoria se indica en la figura 11 con una "V".

Los datos muestran que en presencia de vidrio de borosilicato, se requiere más de 4 mM de CaCl_2 para obtener una retracción total en menos de 3 h mientras que en tales condiciones usando vidrio sódico-cálcico, la totalidad de los 20 PC se retrajeron satisfactoriamente en menos de 3 h. En las condiciones con CaCl_2 5 mM se encontró una retracción del PC satisfactoria, aunque tardando más (3 h en promedio) que en presencia de cantidades iguales de vidrio sódico-cálcico (2 h30 en promedio).

Ejemplo 9. Método para preparar liberados de plaquetas humanas enseñados en el presente documento a partir de un concentrado de plaquetas que no comprende solución aditiva de plaquetas.

Los concentrados de plaquetas se prepararon en plasma al 100 % (v/v), sin adición de una solución aditiva de plaquetas. Se añadieron 0,25 g/ml, 0,15 g/ml o 0,05 g/ml de perlas de vidrio sódico-cálcico y 10 mM, 8 mM, 6 mM, 4 mM o 2 mM de CaCl_2 a 40 ml de PC en tubos Falcon de 50 ml. El tiempo de retracción del coágulo se controló durante 21 h. El PC se consideró "no retraído" cuando se requirieron > 21 h de registro (figura 12, indicado con una "X"). La retracción satisfactoria en < 3 h se indica con una "V" en la figura 12. La retracción del coágulo en un periodo entre 3 h y 21 h se indica mediante un círculo abierto en la figura 12.

Los datos muestran que en presencia de plasma al 100 % (v/v), la retracción del coágulo no es significativamente más rápida en comparación con muestras históricas de PC preparadas en aproximadamente un 35 % (v/v) de plasma y aproximadamente un 65 % (v/v) de solución aditiva.

Ejemplo 10. Análisis comparativo de las concentraciones finales de calcio ionizado en liberados de plaquetas producidos de acuerdo con la invención y liberados de plaquetas de la técnica anterior

La concentración de Ca^{2+} (calcio ionizado) en liberados de plaquetas se preparó de acuerdo con la técnica anterior citada. En un experimento pareado, se trataron concentrados de plaquetas en solución aditiva (PAS-plasma) o en plasma puro (Plasma) con el método reivindicado (TReC) o con los de documentos de la técnica anterior: Ming-Li Chou *et al.*, 2014, *PLOS ONE* vol. 9(6), 19 de junio de 2014, página e99145 (D1), WO2013/003356 (D2), y Martina Bernardi *et al.*, 2017, *J. of Translational Medicine*, vol. 15(1) (D3). Las concentraciones respectivas de Ca^{2+} de partida (es decir, la cantidad de calcio añadido) se indican en la leyenda. En el producto final resultante, la concentración de Ca^{2+} se midió y se muestra en la figura 13. Tal como lo muestran las barras negras, la concentración de Ca^{2+} es significativamente menor para el método reivindicado en comparación con los métodos competidores D1-D3. La línea de puntos representa la concentración máxima de Ca^{2+} permitida en el liberado de plaquetas puro para evitar la precipitación de complejos de fosfato-calcio en composiciones normales de medios de cultivo de tejidos.

En comparación con el método de alto contenido de calcio de Ming-Li Chou *et al.*, 2014, el método de la invención da como resultado liberados de plaquetas que no son propensos a la precipitación de calcio-fosfato cuando se usan en un medio de cultivo celular tal como se puede mostrar en la comparación representada en la figura 14. Precipitación de complejos químicos de fosfato (HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- & PO_4^{3-}) con calcio (Ca^{2+}) en medios de cultivo de tejidos. Un medio de cultivo de tejidos (DMEM con Ca^{2+} preañadido) se suplementó con un 10 % de liberado de plaquetas preparado a partir de concentrados de plaquetas que contenían una solución aditiva como fuente de aniones fosfato. Se utilizaron dos métodos diferentes para la preparación de el liberado de plaquetas: el método de los presentes inventores de bajo contenido de Ca^{2+} (A) o el método de alto contenido de Ca^{2+} D1 de la técnica anterior (B). Después de 24 horas de incubación a 37 °C y CO_2 (p CO_2 5 %), eran visibles complejos de fosfato-calcio usando microscopía de campo brillante (200X) solo en el caso B. Las concentraciones de iones Ca^{2+} residuales (barras macizas) y PO_4^{3-} (barras huecas) en el medio se indica en el gráfico (recuadro inferior). La línea de puntos representa la solubilidad teórica del Ca^{2+} con PO_4^{3-} a pH 7,4 y condiciones termodinámicas ideales.

Estos datos muestran claramente el efecto beneficioso de usar el método de acuerdo con la invención para preparar liberados de plaquetas con riesgo reducido de obtener precipitaciones en un medio de cultivo celular, evitando el daño celular y evitando la influencia de los iones de calcio, por ejemplo, en vías de señalización.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una cantidad de una o más sales de calcio solubles en agua y una cantidad de partículas de vidrio para preparar un liberado de plaquetas a partir de una muestra de una composición de sangre rica en plaquetas obtenida de un sujeto, en donde dicha cantidad de la una o más sales de calcio solubles en agua es de 1,0 μmol por ml a 12,0 μmol por ml de dicha muestra y dicha cantidad de partículas de vidrio es de 0,010 g por ml a 0,60 g por ml de dicha muestra.
2. Un sistema para preparar un liberado de plaquetas que comprende un primer contenedor (1) que tiene un primer espacio contenedor (1') en donde dicho primer espacio contenedor (1'):
- está configurado para recibir una cantidad (Q_{bc}) de una composición de sangre rica en plaquetas comprendida en un segundo espacio contenedor (2') de un segundo contenedor (2);
 - contiene una cantidad (Q_{gp}) de partículas de vidrio (3); y
 - contiene una cantidad (Q_{cc}) de una o más sales de calcio solubles en agua (4) o está configurado para recibir una cantidad (Q_{cc}) de una o más sales de calcio solubles en agua (4) contenidas en un tercer espacio contenedor (5') de un tercer contenedor (5);
- en donde la relación $Q_{gp}:Q_{bc}$ es de 0,010 a 0,60 g por ml de dicha composición de sangre rica en plaquetas, y la relación $Q_{cc}:Q_{bc}$ es de 1,0 a 12,0 μmol por ml de dicha composición de sangre rica en plaquetas.
3. El sistema de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la relación $Q_{gp}:Q_{bc}$ es de 0,10 a 0,40 y la relación $Q_{cc}:Q_{bc}$ es de 3,0 a 8,0.
4. Uso del sistema de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, para producir un liberado de plaquetas o un lisado de plaquetas.
5. Un método para preparar un liberado de plaquetas a partir de una muestra de una composición de sangre rica en plaquetas obtenida de un sujeto que comprende las etapas de:
- a) poner en contacto dicha muestra con una cantidad de 0,010 g a 0,60 g de partículas de vidrio por ml de dicha muestra y una cantidad de 1,0 μmol a 12,0 μmol de una o más sales de calcio solubles en agua por ml de dicha muestra, y obtener así una mezcla;
 - b) dejar que la mezcla obtenida en la etapa a) coagule, obteniendo así un coágulo y un liberado de plaquetas; y
 - c) recuperar de la mezcla el liberado de plaquetas obtenido en la etapa b).
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o el método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicha muestra se pone en contacto con desde 0,10 g a 0,40 g de partículas de vidrio por ml de dicha muestra y desde 3,0 μmol a 8,0 μmol de una o más sales de calcio solubles en agua por ml de dicha muestra.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 6, el sistema de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, o el método de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en donde dichas partículas de vidrio tienen un diámetro promedio de 1,0 mm a 5,0 mm, preferentemente de 2,0 mm a 4,0 mm.
8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 6 o 7, el sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 o 7, o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde dichas partículas de vidrio son partículas de vidrio a base de sílice, preferentemente partículas de vidrio de sílice sódico-cálcico o vidrio sódico-cálcico, partículas de vidrio de borosilicato de sodio, partículas de vidrio de aluminosilicato, partículas de vidrio de óxido de plomo o partículas de vidrio de sílice fundida.
9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 6 a 8, el sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 7 u 8, o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde dicha una o más sales de calcio solubles en agua se seleccionan entre el grupo que consiste en cloruro de calcio, hidróxido de calcio, acetato de calcio, carbonato de calcio, bicarbonato de calcio, clorato de calcio, perclorato de calcio, sulfato de calcio, nitrato de calcio, nitrito de calcio, lactato de calcio, glucobionato de calcio, gluceptato de calcio y gluconato de calcio o mezclas de estos, preferentemente cloruro de calcio.
10. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 6 a 9, o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en donde dicha composición de sangre rica en plaquetas se selecciona entre un concentrado de plaquetas, plasma y sangre entera, preferentemente un concentrado de plaquetas.
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, que comprende además una etapa de lisis de las plaquetas presentes en el coágulo obtenido y/o el liberado de plaquetas obtenido en la etapa b), obteniendo así un lisado de plaquetas.
12. Un liberado de plaquetas que comprende menos de 1 mM de iones Ca^{2+} .

13. Un lisado de plaquetas que comprende menos de 1 mM de iones Ca^{2+} .
- 5 14. Una composición farmacéutica o cosmética que comprende el liberado de plaquetas de acuerdo con la reivindicación 12 o el lisado de plaquetas de acuerdo con la reivindicación 13.
- 10 15. El liberado de plaquetas de acuerdo con la reivindicación 12, el lisado de plaquetas de acuerdo con la reivindicación 13 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14 para su uso en medicina, preferentemente para su uso en el tratamiento de lesiones de tejidos duros y blandos, enfermedades inflamatorias, enfermedades óseas, enfermedades degenerativas de las articulaciones, discopatías degenerativas, afecciones cutáneas, alopecia areata, enfermedad endometrial, atrofia vaginal, enfermedad de la superficie ocular, síndrome del túnel carpiano, trastornos neurodegenerativos, arteriopatía periférica y dolor, que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz del liberado de plaquetas, el lisado de plaquetas o la composición farmacéutica.
- 15 16. Uso del liberado de plaquetas de acuerdo con la reivindicación 12, el lisado de plaquetas de acuerdo con la reivindicación 13 o la composición cosmética de acuerdo con la reivindicación 14 para mejorar el aspecto de la piel y/o del cabello.
- 20 17. Uso del liberado de plaquetas de acuerdo con la reivindicación 12, o del lisado de plaquetas de acuerdo con la reivindicación 13 en un cultivo celular o un cultivo de tejidos.

FIG. 1

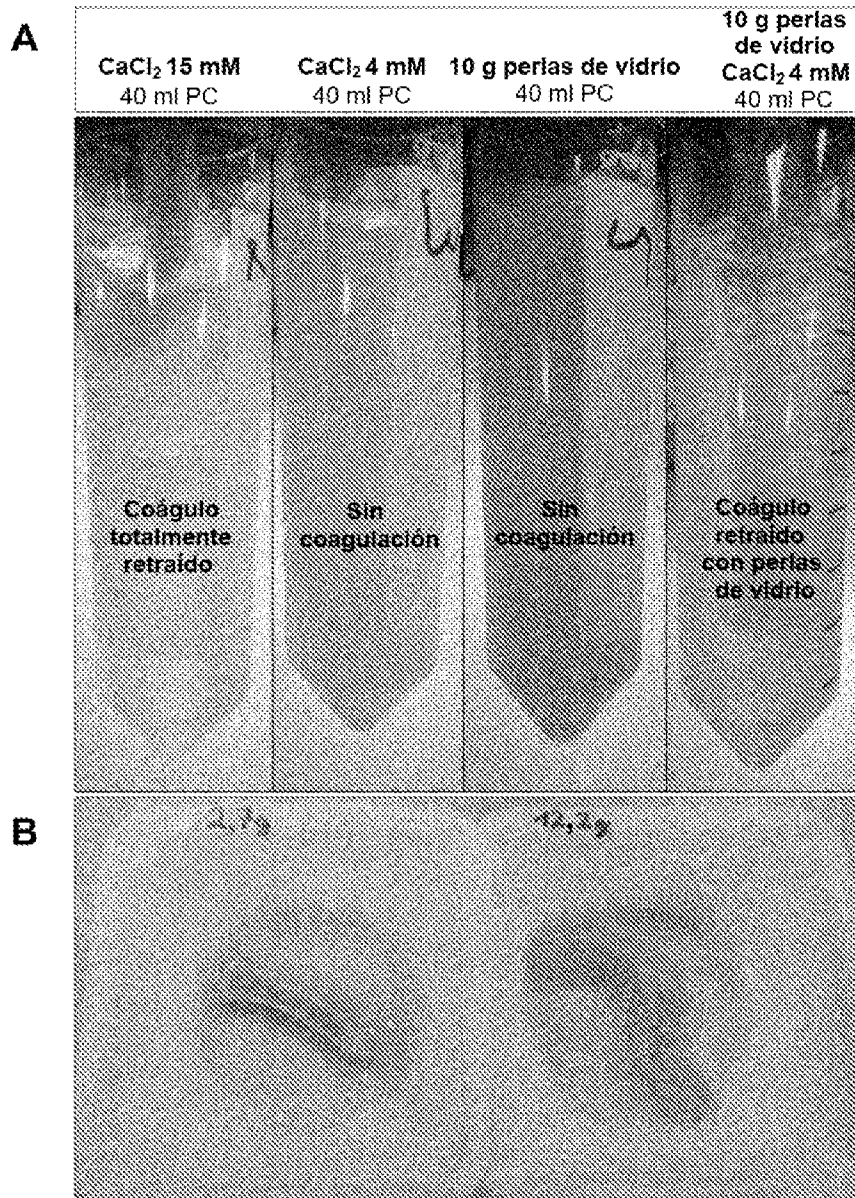


FIG. 2

A

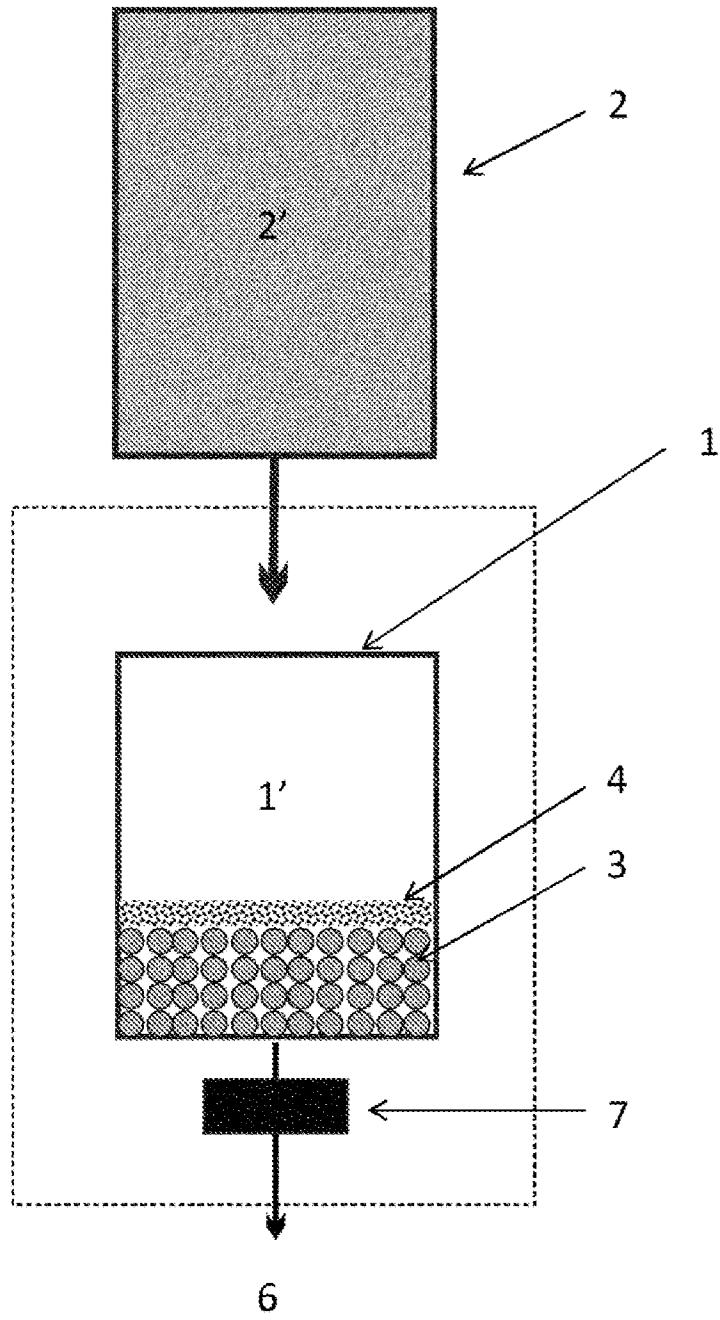


FIG. 2 (continuación)

B

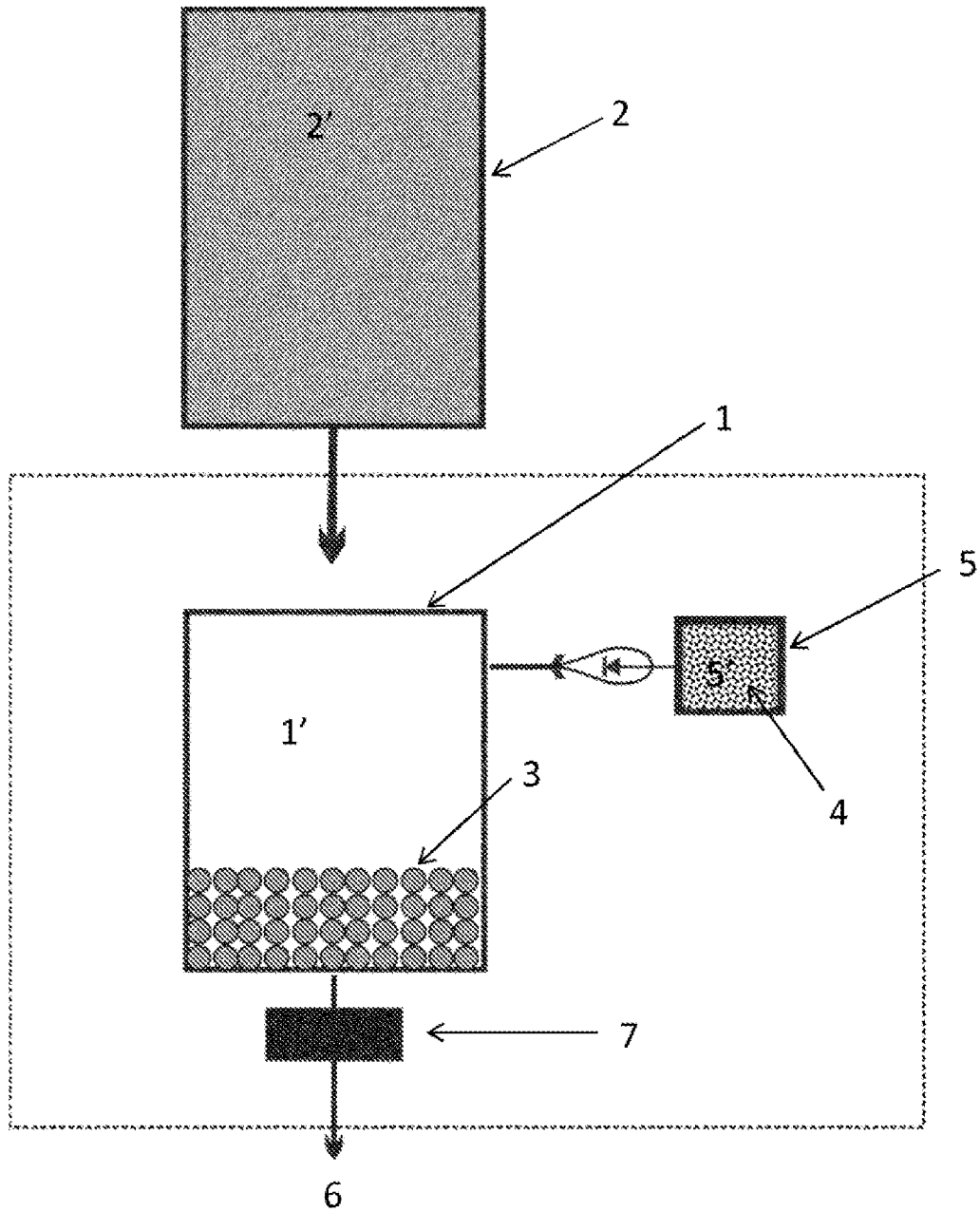


FIG. 3

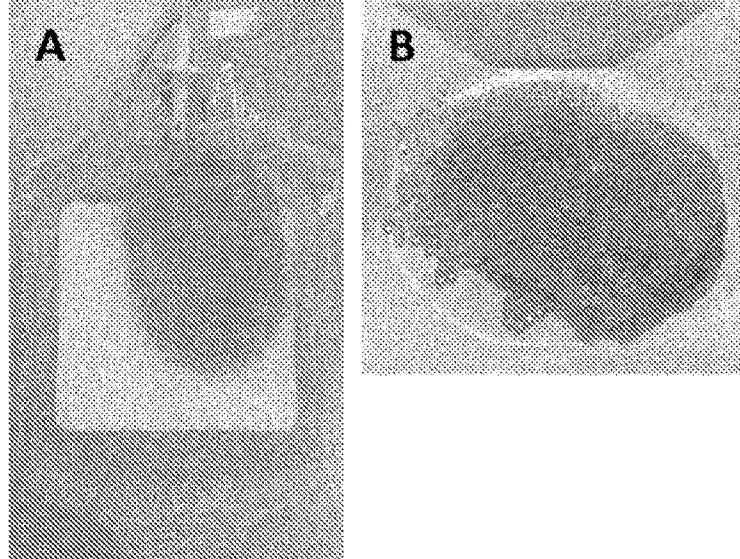


FIG. 4

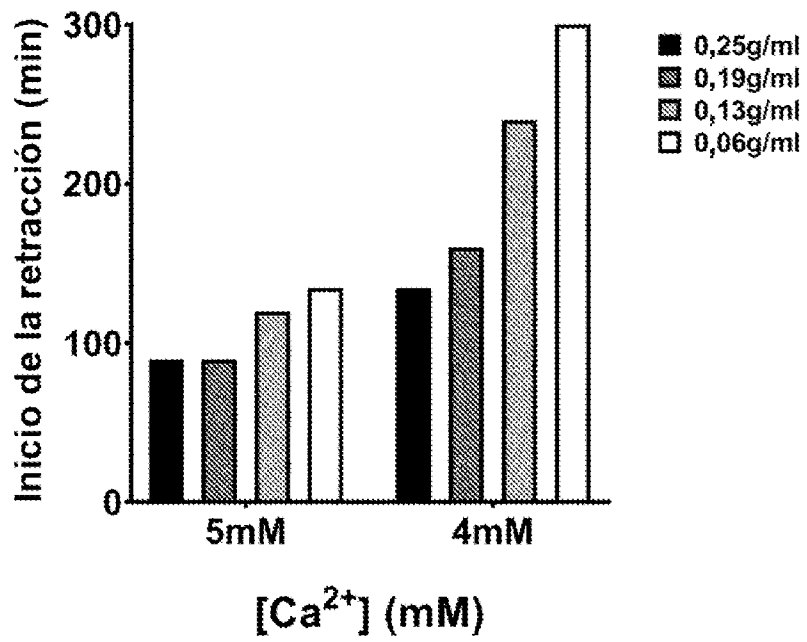


FIG. 5

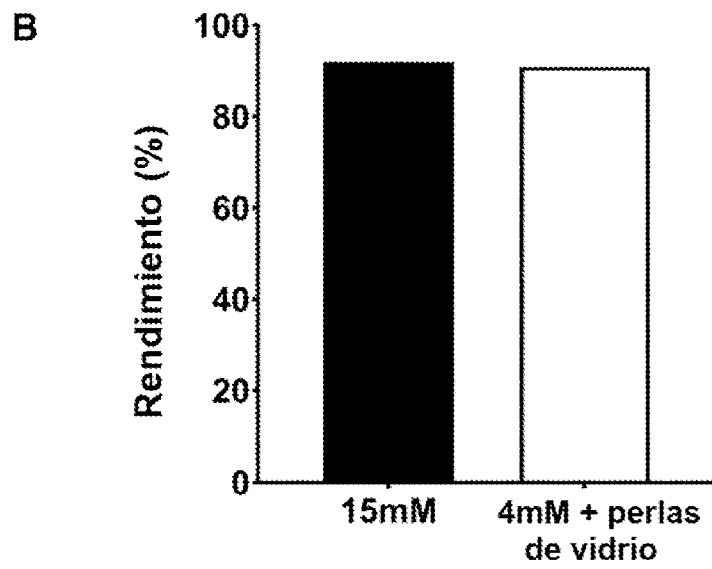
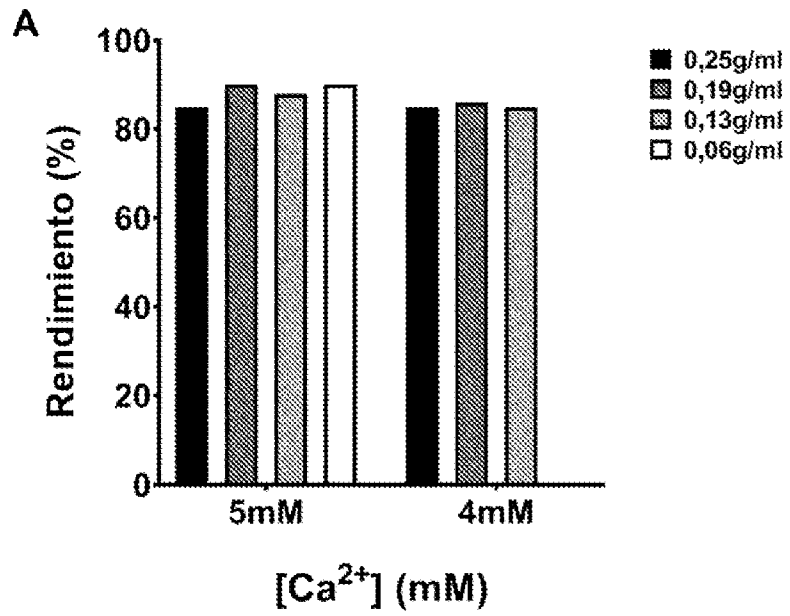


FIG. 6

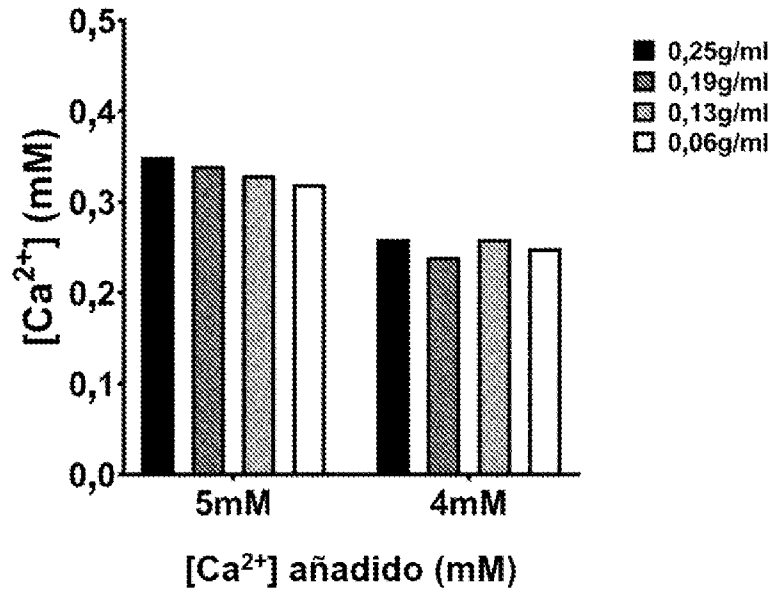


FIG. 7

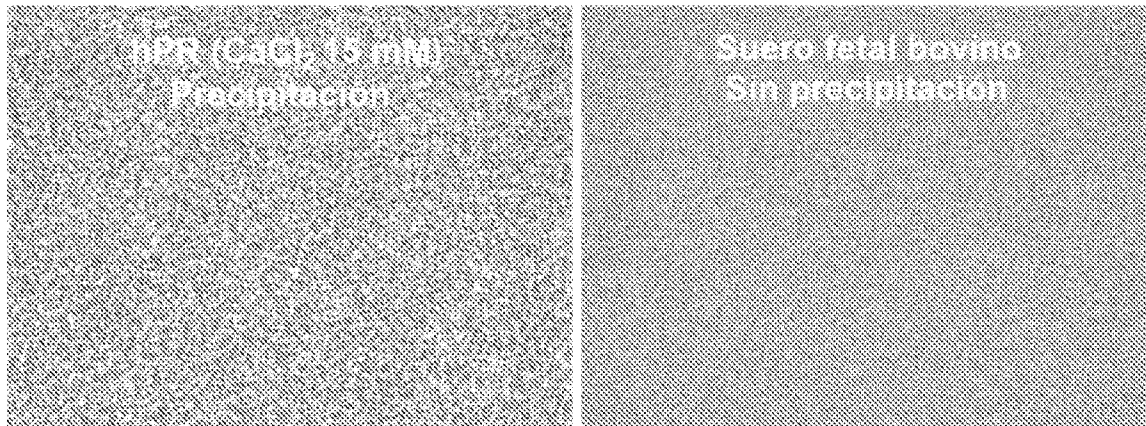


FIG. 8

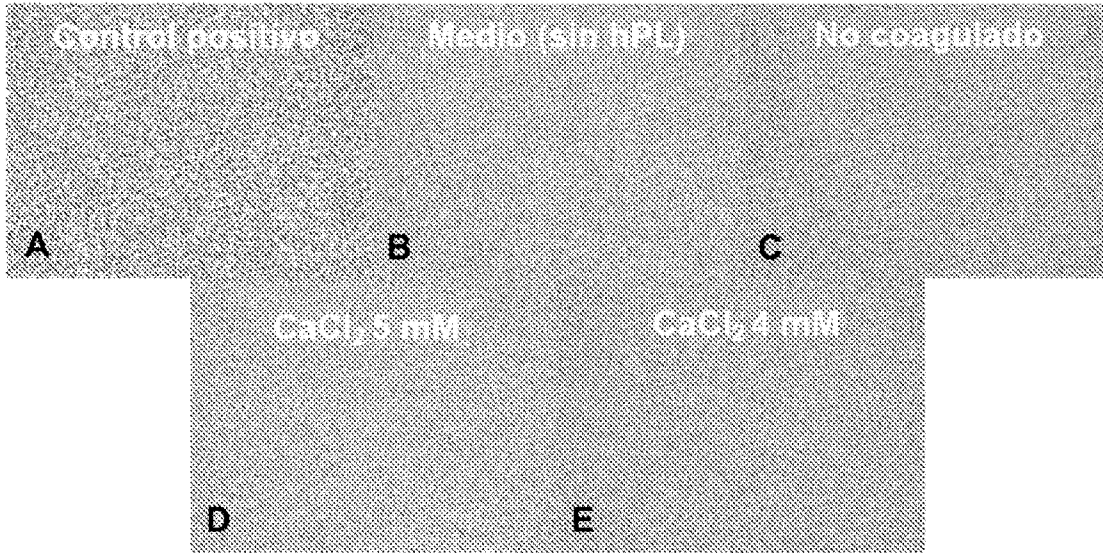


FIG. 9

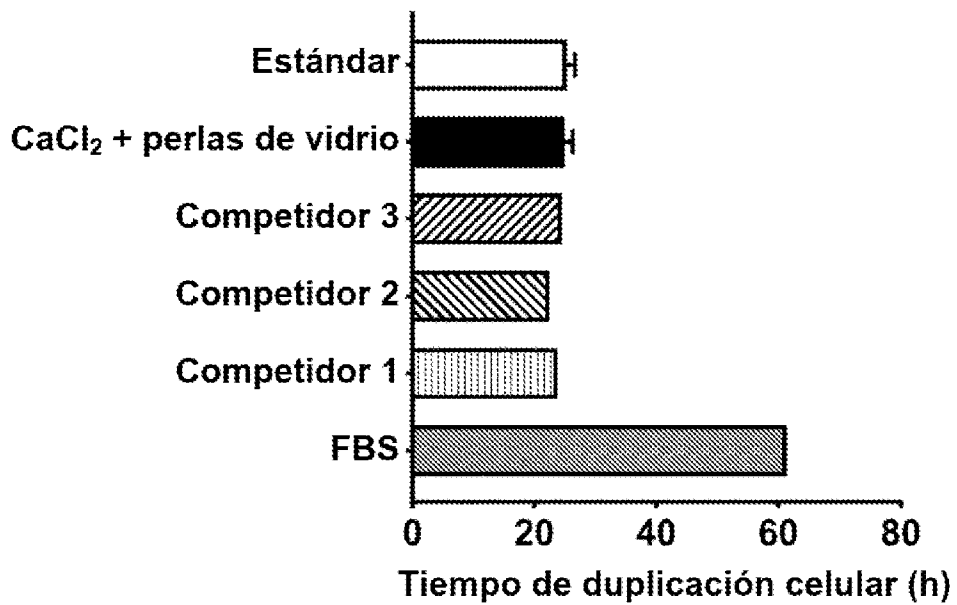


FIG. 10

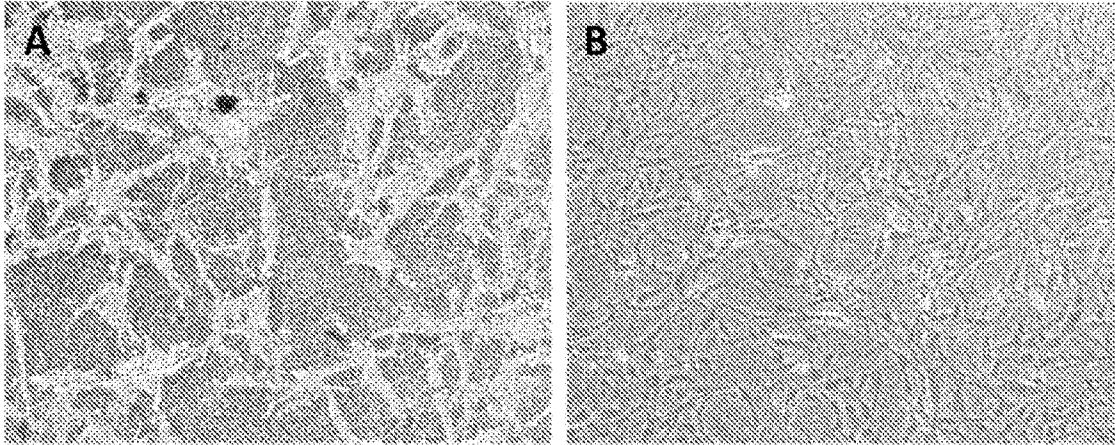


FIG. 11

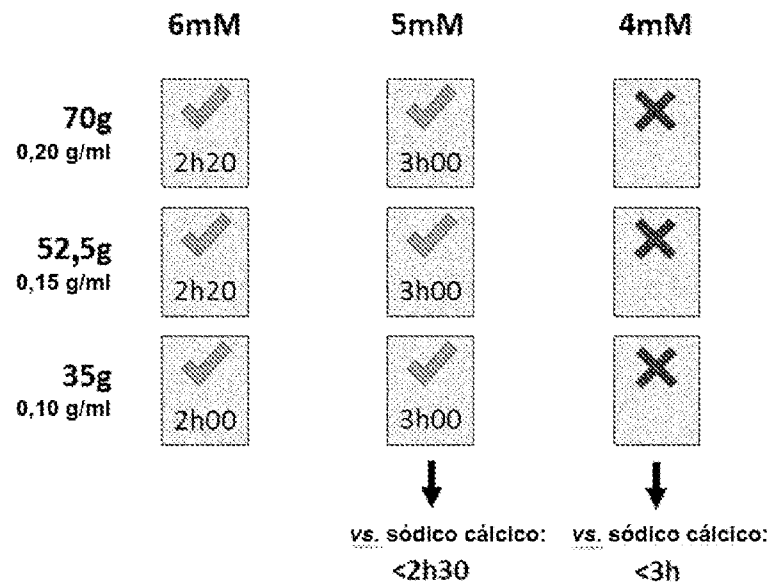


FIG. 12

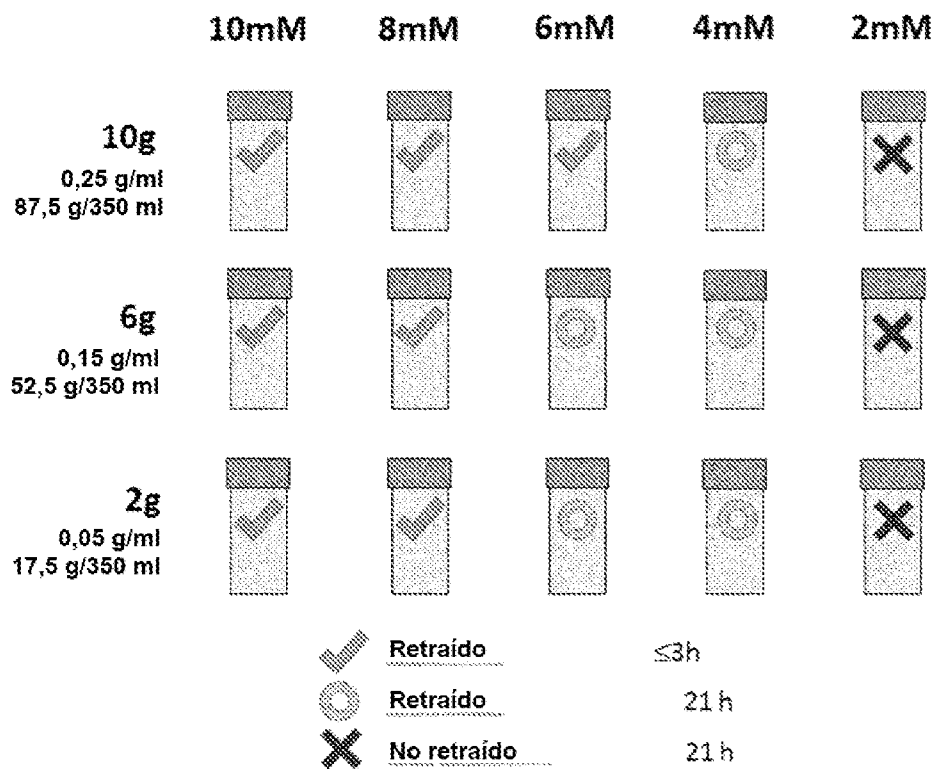


FIG. 13

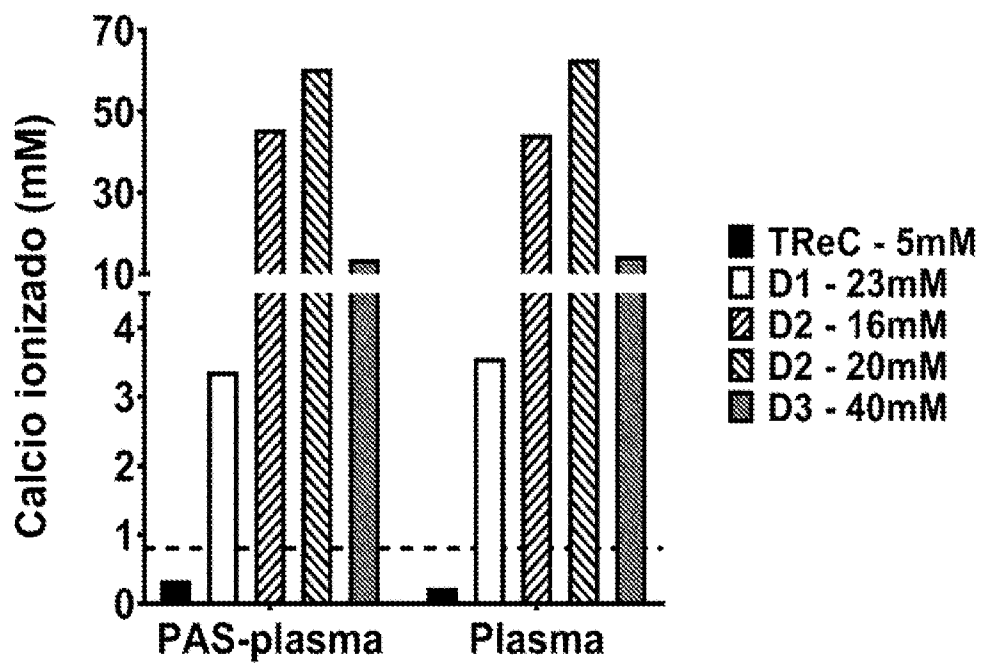


FIG. 14

