

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 798**

21 Número de solicitud: 201930106

51 Int. Cl.:

**A61K 35/19** (2015.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**11.02.2019**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**11.08.2020**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**22.09.2021**

Fecha de concesión:

**05.10.2021**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**13.10.2021**

73 Titular/es:

**BIOTECHNOLOGY INSTITUTE, I MAS D, S.L.  
(100.0%)  
SAN ANTONIO 15, 5º  
01005 Vitoria (Araba/Álava) ES**

72 Inventor/es:

**ANITUA ALDECOA, Eduardo**

74 Agente/Representante:

**TRIGO PECES, José Ramón**

54 Título: **FORMULACIÓN O ADHESIVO TISULAR OBTENIDA DE UNA COMPOSICIÓN SANGUÍNEA QUE CONTIENE PLAQUETAS, Y MÉTODO DE PREPARACIÓN DE DICHA FORMULACIÓN**

57 Resumen:

Formulación, o adhesivo tisular, obtenida de una composición sanguínea rica en plaquetas y/o factores de crecimiento, y método de preparación de dicho adhesivo. El método de preparación del adhesivo comprende los pasos de subir la temperatura de la composición sanguínea inicial y posteriormente activar la composición. Entre otras ventajas, el adhesivo tisular es biocompatible y biodegradable, presenta propiedades biológicas o médicas deseables proporcionadas por la presencia de plaquetas o factores de crecimiento, y además presenta una elevada adhesividad y un acelerado proceso de coagulación.

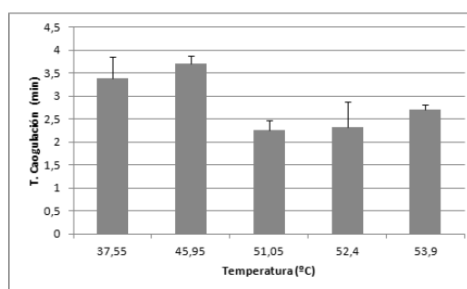


FIG. 1

ES 2 778 798 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

## DESCRIPCIÓN

### FORMULACIÓN O ADHESIVO TISULAR OBTENIDA DE UNA COMPOSICIÓN SANGUÍNEA QUE CONTIENE PLAQUETAS, Y MÉTODO DE PREPARACIÓN DE DICHA FORMULACIÓN

5

#### **Sector de la técnica**

10 La invención se refiere a una formulación con propiedades biológicas o médicas deseables, obtenida de una composición sanguínea inicial que contiene plaquetas. La invención se refiere asimismo a un método de preparación de dicha formulación. La formulación sirve como adhesivo tisular.

#### **15 Estado de la técnica**

20 En el estado de la técnica se conoce la preparación de composiciones a partir de la sangre humana o animal, donde la sangre es procesada de manera que se obtiene un plasma rico en plaquetas (PRP) y/o un plasma rico en factores de crecimiento que presentan útiles propiedades biológicas y médicas. Dichos PRP o plasma rico en factores de crecimiento vienen siendo utilizados con éxito en aplicaciones ex vivo, por ejemplo como medio de cultivo celular, e in vivo, por ejemplo para realizar un proceso de regeneración ósea en un paciente o para tratar a un  
25 paciente de una dolencia articular mediante infiltraciones. En el caso de composiciones destinadas a aplicaciones in vivo, la tecnología de preparación de formulaciones PRP y plasma rico en factores de crecimiento ha ido evolucionando hacia la preparación de composiciones autólogas, es decir, obtenidas de la sangre del propio paciente. Ejemplos de este tipo de  
30 composiciones y métodos de preparación pueden encontrarse en las patentes US6569204 y ES2221770.

35 Se conocen asimismo composiciones consistentes en una fibrina rica en plaquetas (PRF), obtenida a partir de la sangre. Al igual que los plasmas citados anteriormente, la fibrina puede ser autóloga o heteróloga. Al contrario que el plasma, que es líquido, la fibrina presenta una

consistencia sólida o semisólida.

Un ejemplo de fibrina es el conocido como gel de fibrina o malla de fibrina, que es una formulación cuya consistencia semisólida resulta muy conveniente para ciertas aplicaciones. El procedimiento de preparación del gel o malla de fibrina generalmente comienza con una primera fase en la cual se obtiene un PRP o un plasma rico en factores de crecimiento por un método aplicable, por ejemplo centrifugando sangre extraída de un paciente hasta que la sangre se separa en varias fracciones, y extrayendo la fracción superior, es decir la fracción de plasma rico en plaquetas (PRP) o plasma rico en factores de crecimiento. Posteriormente, se realiza la activación de las plaquetas contenidas en el PRP o plasma rico en factores de crecimiento (entendiéndose por activación la acción de provocar que las plaquetas liberen ciertos factores de crecimiento contenidos en su interior) por ejemplo mediante la adición de cloruro cálcico. Como consecuencia de la activación, y si se espera un tiempo suficiente, se produce la eventual polimerización de fibrina a partir del fibrinógeno contenido en el plasma, obteniéndose un compuesto final que es un coágulo de fibrina (también denominado gel o malla de fibrina por su consistencia semisólida, como una especie de esponja biológica). Este procedimiento es el que suele realizarse para obtener un gel de fibrina a partir de una sangre modificada con un anticoagulante, como por ejemplo con citrato sódico. Pero también se puede procesar la sangre sin mezclar ésta previamente con anticoagulante; en este caso, al centrifugar la sangre se consigue tanto separar el plasma de los glóbulos rojos como, al mismo tiempo, obtenerse el gel de fibrina sin necesidad de añadir cloruro cálcico u otro activador de las plaquetas. Algunos ejemplos de aplicación del gel o malla de fibrina son: formar un andamiaje biológico para rellenar defectos óseos; ser aplicado sobre heridas o lesiones para la liberación progresiva de los factores de crecimiento; ser empleado como matriz para el cultivo de células madre; ser empleado como una membrana para poder cerrar defectos o úlceras; ser empleado en la fabricación de tejidos, lo que se conoce como ingeniería de tejidos, donde además de células y factores de crecimiento es de especial importancia contar con una matriz o andamiaje donde las células puedan crecer.

Sin embargo, los preparados ricos en plaquetas (PRP, plasma rico en factores de crecimiento, PRF) tienen una capacidad limitada como adhesivo tisular. La importancia de poseer una propiedad adhesiva adecuada se destaca en que las heridas quirúrgicas y crónicas representan una carga socioeconómica a nivel mundial, a menudo subestimada, tanto para los pacientes como para los sistemas de salud. Una de las principales preocupaciones que nos encontramos a este nivel son las profundas y continuas hemorragias que puedan producirse durante una cirugía o en una herida crónica, y las molestias postoperatorias y complicaciones derivadas de las suturas quirúrgicas, como pueden ser los abscesos de sutura, la formación de granulomas o la necrosis tisular. A lo largo de los años, ha surgido una amplia gama de modalidades de tratamiento en el mundo de la cirugía con el objetivo de reducir dichas complicaciones, entre dichos tratamientos se encuentra el uso del pegamento/sellante de fibrina.

Los sellantes de fibrina alogénicos comerciales representan una alternativa no invasiva muy adecuada. Sin embargo, aunque funcionan de manera eficiente, su coste es elevado y podrían no estar disponibles en cada país o región. Además, debido a que el sellante de fibrina alogénico comercial se obtiene de plasma humano, existe un riesgo de transmisión de ciertas enfermedades y de que se produzcan reacciones de hipersensibilidad.

La forma más segura para preparar el sellante de fibrina es obtenerlo a partir de la sangre del propio paciente. Pero, el tiempo de preparación (normalmente utilizando técnicas de congelación o liofilización) es largo, requiriéndose al menos 24 horas para el procesamiento, por lo que no se puede hacer durante la cirugía o bien requiere que el paciente venga el día anterior a la cirugía para extraerle sangre. Estas técnicas de congelación o liofilización se basan en conseguir un aumento en la concentración del fibrinógeno y sufren de unas limitaciones tales como una concentración de fibrinógeno y proteínas de la coagulación baja por lo que el tiempo de sellado es largo y muy variable debido a la variabilidad biológica que existe en cada paciente. Otras metodologías utilizadas para agilizar la preparación de un sellante de fibrina autólogo usan productos químicos para favorecer la precipitación del fibrinógeno, pero dichos productos pueden producir

procesos irritativos e inflamatorios en los tejidos de aplicación.

La presente invención tiene como objetivo conseguir una formulación con propiedades biológicas o médicas deseables, obtenida de una composición sanguínea inicial rica en plaquetas y/o factores de crecimiento, que se pueda preparar en tiempos quirúrgicos y una adhesividad tisular aumentada. Entre otras aplicaciones, se desea que la formulación sirva como alternativa al sellador de fibrina comercial.

## 10 Descripción breve de la invención

Es objeto de la invención una formulación con propiedades biológicas o médicas deseables, que comprende o se deriva de una composición sanguínea inicial (de origen humano o animal; autóloga, homóloga u heteróloga), rica en plaquetas y/o factores de crecimiento y que comprende proteínas provenientes de la propia composición sanguínea inicial, con la particularidad de que la formulación presenta una adhesividad aumentada. Esta formulación puede ser autóloga (se prepara y se aplica en el mismo donante), homóloga (el donante y el receptor son de la misma especie) o heteróloga (el donante y el receptor son de diferentes especies y podría calificarse como un "sellador de fibrina" (usando una terminología análoga a la utilizada para referirse a la aplicación de preparaciones de fibrina para sellar) debido a que presenta una adhesividad aumentada y una coagulación acelerada. La composición presenta una configuración morfológica y biomecánica nueva en comparación con el resto de selladores de fibrina, composiciones sanguíneas ricas en plaquetas y/o factores de crecimiento, y similares conocidos en el estado de la técnica.

La formulación de acuerdo con la invención es biocompatible, biodegradable y presenta las propiedades biológicas o médicas deseables proporcionadas por la presencia de plaquetas o factores de crecimiento. Además, la formulación presenta una adhesividad tisular aumentada y se obtiene en tiempos cortos. La formulación según la invención es por tanto una alternativa ventajosa al sellador de fibrina convencional, debido al hecho de que la formulación es autóloga, adhesiva y se obtiene en tiempo cortos sin la adición de sustancias químicas. Además, la formulación

5 presenta una buena adhesividad a la compresión, similar o mejor que el sellador de fibrina alogénico convencional Tisseel® y el PRP (utilizado habitualmente como sellador), y soporta adecuadamente la resistencia que le puede ejercer un tejido; por tanto, la formulación resulta muy apta para ser utilizada como sellador de fibrina. Además, es inyectable.

10 Es también objeto de la invención un método de preparación de la formulación anterior, donde dicho método comprende los pasos de: disponer de una composición sanguínea inicial rica en plaquetas y/o factores de crecimiento cuya formulación de base puede variar; calentar la composición sanguínea para que tenga una temperatura de 40 a 55°C; centrifugar la composición sanguínea inicial durante al menos 1 minuto; reducir el volumen de la composición inicial. Este método de la invención comprende también la adición de una sustancia activadora de las plaquetas y la formación de fibrina para la obtención de una composición sanguínea rica en plaquetas y/o factores de crecimiento en forma gel.

### **Descripción breve de las figuras**

20 Los detalles de la invención se aprecian en las figuras que se acompañan, no pretendiendo éstas ser limitativas del alcance de la invención:

- 25 - La Figura 1 muestra el tiempo de coagulación de diferentes ejemplos de formulaciones según la invención.
- La Figura 2 muestra la adhesividad de diferentes ejemplos de formulaciones según la invención.
- La Figura 3 muestra el efecto del activador y las plaquetas en el tiempo de coagulación de las formulaciones según la invención.
- 30 - La Figura 4 muestra el efecto del activador y las plaquetas en la adhesividad de diferentes ejemplos de formulaciones según la invención.
- La Figura 5 muestra el efecto del activador y la eficacia de diferentes ejemplos de formulaciones según la invención y en comparación con el sellador comercial Tisseel® en la adhesividad.
- 35

- La Figura 6 muestra la eficacia como adhesivo tisular de diferentes ejemplos de formulaciones según la invención en comparación con el sellador comercial Tisseel® como adhesivo tisular.

5

### **Descripción detallada de la invención**

10 Con el fin de superar problemas aún existentes en el estado de la técnica relacionados con la adhesividad de los PRP, se propone una formulación alternativa con propiedades biológicas o médicas deseables y con una adhesividad mejorada. Dicha formulación comprende o se deriva de una composición sanguínea inicial que contiene plaquetas. Esta composición es adhesiva debido al tratamiento térmico y la formación de un coagulo de fibrina. Se ha comprobado que el sellador preparado según esta invención tiene una adhesividad tisular similar al sellador de fibrina Tisseel® y mejor que la adhesividad de un plasma rico en plaquetas o fibrina rica en plaquetas convencionales.

20 La composición sanguínea inicial puede ser, por ejemplo, un plasma sanguíneo rico en plaquetas, es decir, un plasma con una concentración elevada de plaquetas. Dicho plasma se ha obtenido generalmente mediante la técnica de centrifugar sangre (para separarla en una fracción de fracción de glóbulos rojos, una fracción de glóbulos blancos y una fracción de plasma rico en plaquetas (PRP)) y separar toda o parte de la fracción de plasma rico en plaquetas (PRP).

La composición sanguínea inicial puede contener o no leucocitos.

30 Para la activación de la composición sanguínea inicial se puede utilizar uno o más de: cloruro de calcio, trombina, gluconato sódico, colágeno, sobrenadante (una sustancia líquida que aparece sobre el coágulo cuando se causa la coagulación de un plasma rico en plaquetas (PRP) y su posterior retracción), sobrenadante de un plasma sanguíneo rico en factores de crecimiento, o cualquier otro agente que actúe activando las plaquetas e induciendo la formación de fibrina de manera que las plaquetas han liberado de su interior ciertos factores de crecimiento.

Se propone asimismo un método de preparación de una formulación con propiedades biológicas o médicas deseables, donde dicho método comprende los pasos de:

- 5
- a) disponer de una composición sanguínea inicial rica en plaquetas y/o factores de crecimiento con o sin anticoagulante, la cual es preferentemente un plasma rico en plaquetas con o sin leucocitos, o un plasma rico en factores de crecimiento con o sin leucocitos.
- 10
- b) Subir la temperatura de la composición inicial a una temperatura de 40 a 55°C.
- 15
- c) Centrifugar la composición sanguínea inicial durante al menos 1 minuto.
- d) Quitar al menos parte de la fracción de plasma obtenida como consecuencia del centrifugado.
- 20
- e) Activar la composición sanguínea que queda tras retirar al menos parte de la fracción de plasma como se indica en el paso d). La activación puede realizarse, por ejemplo, añadiendo cloruro de calcio, trombina, una combinación de cloruro de calcio y trombina, de gluconato sódico, de colágeno, sobrenadante (una sustancia líquida que aparece sobre el coágulo cuando se causa la coagulación de un plasma rico en plaquetas (PRP) y su posterior retracción), sobrenadante de un plasma sanguíneo rico en factores de crecimiento y/o cualquier otro agente activador de plaquetas. Como consecuencia, se produce la activación de las plaquetas y se induce la formación de fibrina de manera que las plaquetas liberen de su interior ciertos factores de crecimiento.
- 25
- 30

35 El método anterior produce una precipitación de sustancias proteicas sin la desnaturalización del fibrinógeno como evidencia la obtención de un coagulo de fibrina después de la activación. Al quitar parte del volumen de



la composición inicial, se incrementa la concentración de estas sustancias proteicas. De hecho, y además, el método produce una aceleración notable en la coagulación de la composición sanguínea y en su fuerza de adhesión. En resumen, como consecuencia del proceso térmico se logran nuevas  
5 formulaciones biocompatibles y biodegradables, con dos ventajas principales: un tiempo de coagulación corto y una adhesividad mayor lo que hace que esta formulación se pueda aplicar como un adhesivo o sellador de fibrina.

10 Preferentemente, la temperatura de la composición sanguínea inicial se incrementa a una temperatura en el rango de 40 a 53°C.

La composición sanguínea inicial rica en plaquetas y/o factores de crecimiento puede ser de origen humano o animal. Además, puede ser  
15 autóloga (perteneciente a un paciente al cual se desea tratar posteriormente con la formulación final), homóloga (perteneciente a un miembro de la misma especie que el paciente, los pacientes, las células u otra entidad biológica que vaya a ser tratada o procesada con la formulación final) o heteróloga (perteneciente a un miembro de diferente  
20 especie que el paciente, los pacientes, las células u otra entidad biológica que vaya a ser tratada o procesada con la formulación final).

La invención contempla que la composición sanguínea inicial puede incorporar opcionalmente una o más sustancias adicionales, añadidas de  
25 forma previa al tratamiento térmico reivindicado. Dichas sustancias adicionales pueden ser:

- uno o más agentes bioactivos seleccionados entre proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, polisacáridos, lípidos, sustancias  
30 orgánicas no proteicas y sustancias inorgánicas;
- uno o más polímeros biodegradables seleccionados entre: ácido hialurónico, sales de hialuronato, chondroitín 4 sulfato, chondroitín 6 sulfato, dextrán, gel de sílice, alginato, hidroxipropilmetilcelulosa, derivados de quitín, preferiblemente  
35 chitosano, goma xanthan, agarosa; polietileno glicólicos (PEG), polihidroxietilenometacrilato (HEMA), proteínas sintéticas o

naturales, colágenos;

- uno o más polímeros orgánicos seleccionados del grupo de policarpolactona, poliglicólico, poliláctico, y sus co-polímeros;
- 5                   - uno o más de entre los siguientes agentes: antibióticos, antimicrobianos, anticancerígenos, analgésicos, factores de crecimiento, hormonas;
- uno o más componentes inorgánicos seleccionados del grupo de sales de calcio, sales de magnesio, y/o sales de estroncio.

10                   La invención contempla también que cualquiera de las sustancias anteriores puedan ser añadidas a la formulación después de realizado el tratamiento térmico.

15                   La formulación según la invención contempla modos de realización diversos en los que la formulación pueda comprender, además de los aspectos técnicos reivindicados, otros compuestos, componentes, moléculas, etc. que resulten convenientes para la aplicación concreta a la que vaya a estar destinada la formulación.

20                   Además, es posible realizar pasos adicionales sobre la formulación producida según el método descrito en esta invención que incluyen desecados para aumentar su versatilidad. Es decir, antes de su activación (la activación de las plaquetas y la formación de la fibrina), la formulación de acuerdo con la invención puede ser desecada (calor seco) o liofilizada.

25                   Esta formulación puede ser posteriormente rehidrata mediante diferentes alternativas tales como añadir una solución salina, un plasma rico en plaquetas, un sobrenadante de un plasma rico en plaquetas, un plasma rico en factores de crecimiento, un sobrenadante de un plasma rico en factores de crecimiento, o cualquier otra sustancia líquida.

30

### **Ejemplos**

#### Ejemplo 1

35                   Se parte de una muestra de 9 tubos (de 9ml) que contienen herméticamente sangre extraída de un paciente. Se centrifugan los tubos a

una velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a temperatura ambiente. Como consecuencia de la centrifugación, la sangre contenida en cada tubo se divide en varias fracciones. Se extrae la fracción superior, o fracción de plasma rico en plaquetas (PRP), a un tubo blanco, obteniéndose un total de 36 ml de plasma. Se reparte el plasma en 6 tubos, conteniendo cada tubo 6 ml de plasma. Seguidamente, la temperatura cada uno de los 6 tubos se sube a 37,55, 45,95, 51,05, 52,4, 53,9 y 55,35°C, respectivamente. Posteriormente, se centrifugan los 6 tubos a una velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a temperatura ambiente, produciendo la precipitación de las plaquetas y nuevas sustancias proteicas. Para concentrar estas sustancias proteicas y después de la centrifugación del plasma calentado, se quita la mitad superior del plasma. Finalmente se resuspende el precipitado en el plasma que se ha quedado en el tubo.

15

Seguidamente, se activan las formulaciones de los 6 tubos añadiendo un sobrenadante de PRP (333µl) y 20 µl de calcio por cada 1ml de formulación, lo cual inicia la formación de fibrina en las formulaciones.

20

Se ha medido el tiempo de coagulación (el tiempo en el que tarda la composición sanguínea en cambiar su estado de líquido a gel) debido a la formación de fibrina. La Figura 1 muestra la capacidad del método de la invención de acelerar el tiempo de coagulación. Ha de hacerse notar que el tiempo de coagulación de un PRP convencional, activado de la misma manera que las formulaciones según la invención anteriores (es decir, con sobrenadante de PRP (333µl) y 20 µl de calcio por cada 1ml) ha sido de 4,5 minutos. Como puede observarse en la gráfica, las formulaciones según la invención presentan tiempos de coagulación inferiores o acelerados con respecto a dicho PRP convencional. Dicha aceleración de la coagulación es mayor para la temperatura de 51,05°C, seguida de las temperaturas de 52,4 y 53,9°C. No se ha obtenido un coagulo estable cuando la temperatura es de 55,3°C.

25

30

### Ejemplo 2

35

Se parte de una muestra de 9 tubos (de 9ml) que contienen

herméticamente sangre extraída de un paciente. Se centrifuga la sangre a una velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a una temperatura ambiente. Como consecuencia de la centrifugación, la sangre contenida en cada tubo se divide en varias fracciones. Se extrae la fracción superior, o fracción de plasma rico en plaquetas (PRP), a un tubo blanco, obteniéndose un total de 36 ml de plasma. Se reparte el plasma en 6 tubos, conteniendo cada tubo 6 ml de plasma. Seguidamente, se sube la temperatura de cada uno de los tubos a 37,55, 45,95, 51,05, 52,4, 53,9 y 55,35°C, respectivamente. Posteriormente, se centrifuga a velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a una temperatura ambiente, produciendo la precipitación de las plaquetas y nuevas sustancias proteicas. Para concentrar estas sustancias proteicas y después de la centrifugación del plasma calentado, se ha quitado la mitad superior del plasma. Finalmente se resuspende el precipitado en el plasma que se ha quedado en el tubo.

Seguidamente, se activan las formulaciones de los 6 tubos añadiendo un sobrenadante del PRP (333µl) y 20 µl de calcio por cada 1ml de formulación, lo cual inicia la formación de fibrina en las formulaciones.

Se han pegado dos portas de cristal con la formulación después de su activado. Después de la coagulación, se han incubado las portas pegadas en agua destilada durante 3 minutos y luego se ha medido la fuerza de la adhesión de la formulación utilizando pesos en gramos. La Figura 2 muestra la fuerza de la adhesión de las formulaciones. La mayor fuerza de adhesión es la correspondiente a la temperatura de 51,05°C, seguida por las temperaturas de 37,55 y 45,95°C. La menor fuerza de adhesión es para la temperatura de 55,3°C, seguida por la de 53,9°C.

### 30 Ejemplo 3

Se parte de una muestra de 9 tubos (de 9ml) que contienen herméticamente sangre extraída de un paciente. Se centrifugan los tubos a una velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a temperatura ambiente. Como consecuencia de la centrifugación, la sangre contenida en cada tubo se divide en varias fracciones. Se extrae la fracción superior, o

fracción de plasma rico en plaquetas (PRP), a un tubo blanco, obteniéndose un total de 36 ml de plasma. Se reparte el plasma en 6 tubos, conteniendo cada tubo 6 ml de plasma. Las muestras se procesan según lo siguiente:

- 5                   - Muestra control: El PRP que se activa con iones de calcio en una relación de 20 µl de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP.
- Muestra control-activador: PRP que se activa con sobrenadante del PRP (333 µl) y 20 µl de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP.
- 10                   - Muestra control-método: PRP que se centrifuga a una velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a una temperatura ambiente. Se quita 2/3 del volumen inicial y se resuspende el precipitado plaquetario en el restante 1/3 del volumen inicial. Se activa con sobrenadante del PRP (333 µl) y 20 µl de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP.
- 15                   - Muestra formulación 1: La temperatura de PRP se sube a 51°C. Posteriormente, se centrifuga a una velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a una temperatura ambiente. Se quita 2/3 del volumen inicial y se resuspende el precipitado plaquetario y proteico en el restante 1/3 del volumen inicial. Se activa la formulación con sobrenadante del PRP (333 µl) y 20 µl de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP.
- 20                   - Muestra formulación 2: La temperatura de PRP se sube a 51°C. Posteriormente, se centrifuga a una velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a una temperatura ambiente. Se quita 1/2 del volumen inicial y se resuspende el precipitado plaquetario y proteico en el restante 1/2 del volumen inicial. Se activa la formulación con sobrenadante del PRP (333 µl) y 20 µl de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP.
- 25                   - Muestra formulación 3: La temperatura de PRP se suba a 51°C. Posteriormente, se centrifuga a una velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a una temperatura ambiente. Se resuspende el precipitado plaquetario y proteico en el total del volumen inicial. Se activa la formulación con sobrenadante del PRP (333 µl) y 20 µl de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP.
- 30                   - Muestra formulación 3: La temperatura de PRP se suba a 51°C. Posteriormente, se centrifuga a una velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a una temperatura ambiente. Se resuspende el precipitado plaquetario y proteico en el total del volumen inicial. Se activa la formulación con sobrenadante del PRP (333 µl) y 20 µl de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP.
- 35                   - Muestra formulación 3: La temperatura de PRP se suba a 51°C. Posteriormente, se centrifuga a una velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a una temperatura ambiente. Se resuspende el precipitado plaquetario y proteico en el total del volumen inicial. Se activa la formulación con sobrenadante del PRP (333 µl) y 20 µl de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP.

- Muestra formulación 4: Al PRP se le quitan las plaquetas mediante la filtración con filtros con tamaño de poro de 20  $\mu$ l. Luego se sube la temperatura del PRP a 51°C. Posteriormente, se centrifuga a una velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a una temperatura ambiente. Se quita 2/3 del volumen inicial y se resuspende el precipitado plaquetario y proteico en el restante 1/3 del volumen inicial. Se activa la formulación con sobrenadante del PRP (333  $\mu$ l) y 20  $\mu$ l de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP.

5

10

Los resultados del tiempo de coagulación en la Figura 3 indican que: el uso del activador trombina (sobrenadante del PRP) + calcio, utilizado en el control-activador, control-método y formulaciones 1-4, acelera la coagulación del PRP con respecto al uso solo de iones de calcio (muestra control). También una segunda centrifugación del PRP antes de la activación (control-método y formulaciones 1-4) acelera todavía más la coagulación posiblemente por el aumento en la concentración de las plaquetas al quitar parte del volumen inicial. Sin embargo, el método según la invención acelera la coagulación de manera independiente de la concentración plaquetaria tal como muestran los resultados de la formulación 3 (sin incremento en la concentración plaquetaria) y la formulación 4 (sin plaquetas). Los tiempos de coagulación menores fueron los correspondientes a la formulaciones 1 y 2. Así el tiempo de coagulación indica la novedad y la eficacia del método de la invención para acelerar el proceso de la coagulación.

15

20

25

#### Ejemplo 4

Se parte de una muestra de 9 tubos (de 9ml) que contienen herméticamente sangre extraída de un paciente. Se centrifugan los tubos a una velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a temperatura ambiente. Como consecuencia de la centrifugación, la sangre contenida en cada tubo se divide en varias fracciones. Se extrae la fracción superior, o fracción de plasma rico en plaquetas (PRP), a un tubo blanco, obteniéndose un total de 36 ml de plasma. Se reparte el plasma en 6 tubos, conteniendo

30

35

cada tubo 6 ml de plasma. Las muestras se procesan según lo siguiente:

- 5 - Muestra control: PRP que se activa con iones de calcio en una relación de 20 µl de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP.
- 5 - Muestra control-activador: PRP que se activa con sobrenadante del PRP (333 µl) y 20 µl de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP.
- 10 - Muestra control-método: PRP que se centrifuga a una velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a una temperatura ambiente. Se quita 2/3 del volumen inicial y se resuspende el precipitado plaquetario en el restante 1/3 del volumen inicial. Se activa con sobrenadante del PRP (333 µl) y 20 µl de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP.
- 15 - Muestra formulación 1: La temperatura de PRP se sube a 51°C. Posteriormente, se centrifuga a una velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a una temperatura ambiente. Se quita 2/3 del volumen inicial y se resuspende el precipitado plaquetario y proteico en el restante 1/3 del volumen inicial. Se activa la formulación con sobrenadante del PRP (333 µl) y 20 µl de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP.
- 20 - Muestra formulación 2: La temperatura de PRP se sube a 51°C. Posteriormente, se centrifuga a una velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a una temperatura ambiente. Se quita 1/2 del volumen inicial y se resuspende el precipitado plaquetario y proteico en el restante 1/2 del volumen inicial. Se activa la formulación con sobrenadante del PRP (333 µl) y 20 µl de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP.
- 25 - Muestra formulación 3: La temperatura de PRP se sube a 51°C. Posteriormente, se centrifuga a una velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a una temperatura ambiente. Se resuspende el precipitado plaquetario y proteico en el total del volumen inicial. Se activa la formulación con sobrenadante del PRP (333 µl) y 20 µl de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP.
- 30 - Muestra formulación 4: Al PRP se le quitan las plaquetas mediante la filtración con filtros con tamaño de poro de 20 µl.
- 35 - Muestra formulación 4: Al PRP se le quitan las plaquetas mediante la filtración con filtros con tamaño de poro de 20 µl.

5 Luego se sube la temperatura del PRP a 51°C. Posteriormente, se centrifuga a una velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a una temperatura ambiente. Se quita 2/3 del volumen inicial y se resuspende el precipitado plaquetario y proteico en el restante 1/3 del volumen inicial. Se activa la formulación con sobrenadante del PRP (333 µl) y 20 µl de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP.

10 Se han pegado dos portas de cristal con las muestras anteriormente descritas después de su activación. Las muestras se han incubado en agua destilada y luego se ha medido la fuerza de la adhesión de la formulación utilizando pesos en gramos. La Figura 4 muestra la fuerza de la adhesión de las formulaciones. Los resultados indican claramente que la mejora en la adhesión se produce sólo en las formulaciones según la presente  
15 invención (formulaciones 1 y 2) ya que el uso de trombina + calcio (control-activador) o aumentar la concentración plaquetaria (control-método) no han mejorado la adhesión del PRP activado con iones de calcio. La mejor adhesión ha sido obtenida por las formulaciones 1 y 2 de la presente invención.

20

#### Ejemplo 5

Se parte de una muestra de 8 tubos (de 9ml) que contienen herméticamente sangre extraída de un paciente. Se centrifugan los tubos a una velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a temperatura  
25 ambiente. Como consecuencia de la centrifugación, la sangre contenida en cada tubo se divide en varias fracciones. Se extrae la fracción superior, o fracción de plasma rico en plaquetas (PRP), a un tubo blanco, obteniéndose un total de 30 ml de plasma. Se reparte el plasma en 5 tubos, conteniendo  
30 cada tubo 6 ml de plasma. Las muestras se procesan según lo siguiente:

- Muestra control-activador: PRP que se activa con sobrenadante del PRP (333 µl) y 20 µl de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP.
- 35 - Muestra formulación 1: La temperatura de PRP se sube a 51°C. Posteriormente, se centrifuga a una velocidad de 580 g, durante



- 5 un tiempo de 8 minutos y a una temperatura ambiente. Se quita 2/3 del volumen inicial y se resuspende el precipitado plaquetario y proteico en el restante 1/3 del volumen inicial. Se activa la formulación con sobrenadante del PRP (333  $\mu$ l) y 20  $\mu$ l de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP.
- 10 - Muestra formulación 2: La temperatura de PRP se sube a 51°C. Posteriormente, se centrifuga a una velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a una temperatura ambiente. Se quita 1/2 del volumen inicial y se resuspende el precipitado plaquetario y proteico en el restante 1/2 del volumen inicial. Se activa la formulación con las siguientes ratios de volumen activador/formulación:
- 15 1. Sobrenadante del PRP (333  $\mu$ l) y 20  $\mu$ l de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP (formulación 2).
  2. Sobrenadante del PRP (235,8  $\mu$ l) y 14,2  $\mu$ l de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP (formulación 2 A)
  3. Sobrenadante del PRP (166,7  $\mu$ l) y 10  $\mu$ l de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP (formulación 2 B)
- 20 - Muestra Tisseel®: Se ha adquirido y usado un adhesivo y sellador comercial Tisseel® (Baxter S. L., Valencia, España) según las instrucciones del fabricante.

25 Se han pegado dos portas de cristal con las muestras anteriormente descritas después de su activación. Las muestras se han incubado en agua destilada y luego se ha medido la fuerza de la adhesión de la formulación utilizando pesos en gramos. La Figura 5 muestra la fuerza de la adhesión de las formulaciones según la presente invención se pueden mejorar también mediante la optimización del volumen de activador añadido

30 (Formulación 2 B). Los resultados también que la fuerza de adhesión de la formulación según la invención (Formulación 2 B) es comparable con el sellador comercial de la marca Tisseel®.

### 35 Ejemplo 6

Se parte de una muestra de 7 tubos (de 9ml) que contienen

herméticamente sangre extraída de un paciente. Se centrifugan los tubos a una velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a temperatura ambiente. Como consecuencia de la centrifugación, la sangre contenida en cada tubo se divide en varias fracciones. Se extrae la fracción superior, o fracción de plasma rico en plaquetas (PRP), a un tubo blanco, obteniéndose un total de 24 ml de plasma. Se reparte el plasma en 4 tubos, conteniendo cada tubo 6 ml de plasma. Las muestras se procesan según lo siguiente:

- 10 - Muestra control-activador: PRP que se activa con sobrenadante del PRP (333  $\mu$ l) y 20  $\mu$ l de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP.
- 15 - Muestra formulación 1: La temperatura de PRP se sube a 51°C. Posteriormente, se centrifuga a una velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a una temperatura ambiente. Se quita 2/3 del volumen inicial y se resuspende el precipitado plaquetario y proteico en el restante 1/3 del volumen inicial. Se activa la formulación con sobrenadante del PRP (333  $\mu$ l) y 20  $\mu$ l de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP.
- 20 - Muestra formulación 2: La temperatura de PRP se sube a 51°C. Posteriormente, se centrifuga a una velocidad de 580 g, durante un tiempo de 8 minutos y a una temperatura ambiente. Se quita 1/2 del volumen inicial y se resuspende el precipitado plaquetario y proteico en el restante 1/2 del volumen inicial. Se activa la formulación con las siguientes ratios de volumen activador/formulación:
  - 25 1. Sobrenadante del PRP (333  $\mu$ l) y 20  $\mu$ l de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP (formulación 2).
  - 30 2. Sobrenadante del PRP (166,7  $\mu$ l) y 10  $\mu$ l de 10% cloruro cálcico por cada 1ml del PRP (formulación 2 B)
- Muestra Tisseel®: Se ha adquirido y usado un adhesivo y sellador comercial Tisseel® (Baxter S. L., Valencia, España) según las instrucciones del fabricante.

35 Se han preparado muestras biológicas de piel de cerdo. Las muestras de piel se han pegado a un soporte mediante un adhesivo

universal. Luego se han pegado dos especímenes de piel con las muestras anteriormente descritas. Luego se ha medido la fuerza de la adhesión de la formulación utilizando pesos en gramos y colgándolos en el soporte de un espécimen de piel. La Figura 6 muestra la novedad y la eficacia de la invención en mejorar la fuerza de la adhesión y que la capacidad de adhesión se puede incrementar aún más mediante la optimización del volumen de activador añadido (Formulación 2 B). Los resultados también indican que la fuerza de adhesión de la formulación según la presente invención (Formulación 2 B) es comparable con la fuerza de adhesión del sellador comercial de la marca Tisseel®.

## REIVINDICACIONES

- 5           1. Método de preparación de una formulación adhesiva a partir de una composición sanguínea inicial, que se caracteriza por que comprende los pasos de:
- a) obtener una composición sanguínea inicial, de origen humano o animal, que es un plasma sanguíneo rico en plaquetas;
  - 10           b) subir la temperatura de la composición sanguínea inicial a una temperatura de 40 a 53°C;
  - c) centrifugar la composición sanguínea y
  - d) activar las plaquetas y formar una formulación que contiene fibrina.
- 15           2. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que la composición sanguínea inicial comprende además factores de crecimiento liberados.
- 20           3. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que comprende un paso adicional de quitar parte del volumen de la composición inicial después del paso b).
- 25           4. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el paso de activar las plaquetas comprende añadir al menos uno de: calcio, trombina, gluconato sódico, colágeno, sobrenadante de plasma sanguíneo, y sobrenadante de plasma sanguíneo rico en factores de crecimiento.
- 30           5. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que la formulación comprende uno o más agentes bioactivos seleccionados entre proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, polisacáridos, lípidos, sustancias orgánicas no proteicas y sustancias inorgánicas.
- 35           6. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que la formulación comprende uno o más polímeros biodegradables seleccionados entre: ácido hialurónico, sales de hialuronato, chondroitín 4 sulfato, chondroitín 6 sulfato, dextrán, gel de sílice, alginato,

hidroxipropilmetilcelulosa, derivados de quitín, preferiblemente quitosano, goma xanthan, agarosa; polietileno glicólicos (PEG), polihidroxietilenometacrilato (HEMA), proteínas sintéticas o naturales, colágenos.

5

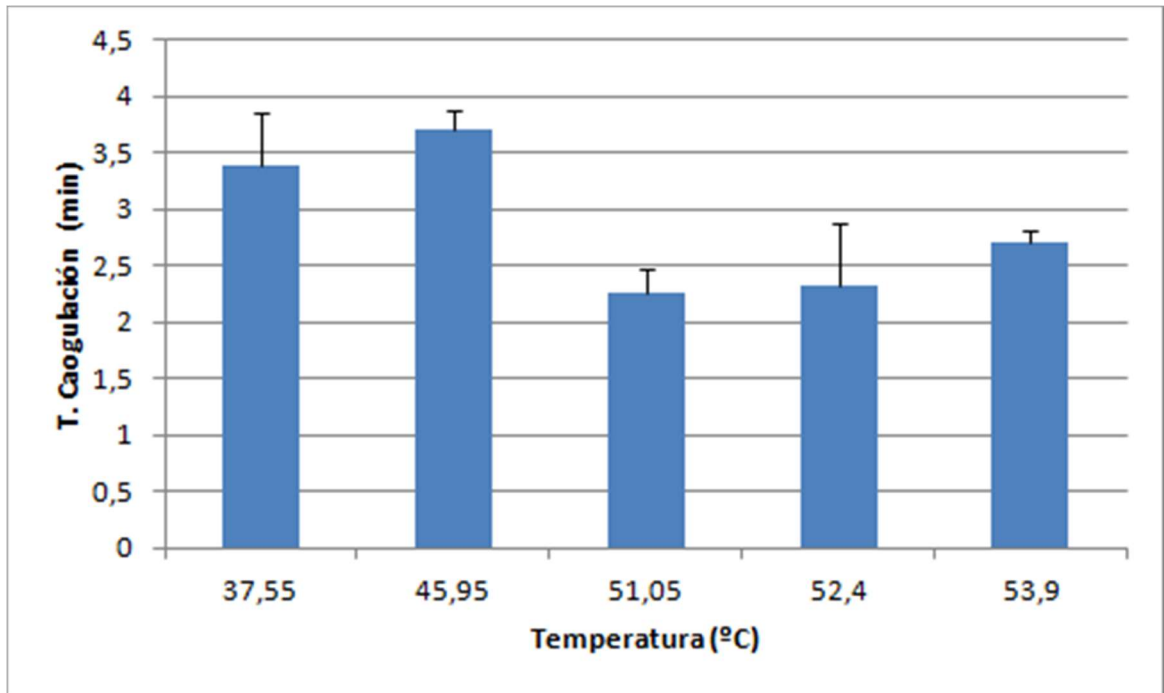
7. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que la formulación comprende uno o más polímeros orgánicos seleccionados del grupo de policarpolactona, poliglicólico, poliláctico, y sus co-polímeros.

10

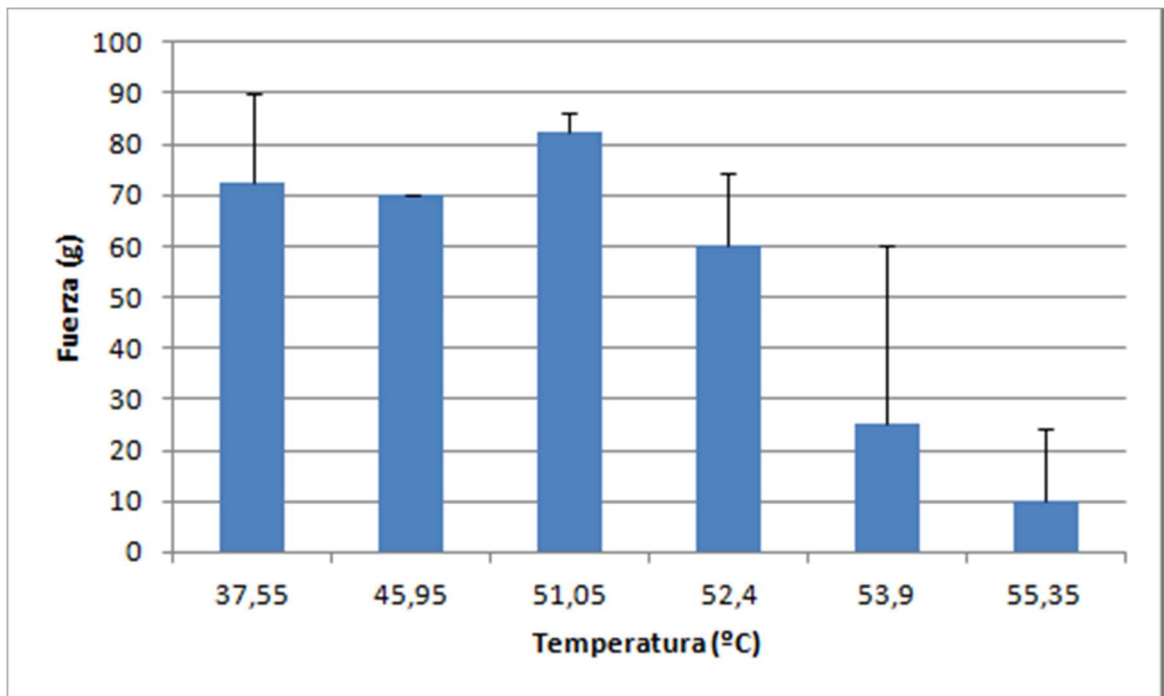
8. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que la formulación comprende uno o más de entre los siguientes agentes: antibióticos, antimicrobianos, anticancerígenos, analgésicos, factores de crecimiento, hormonas.

15

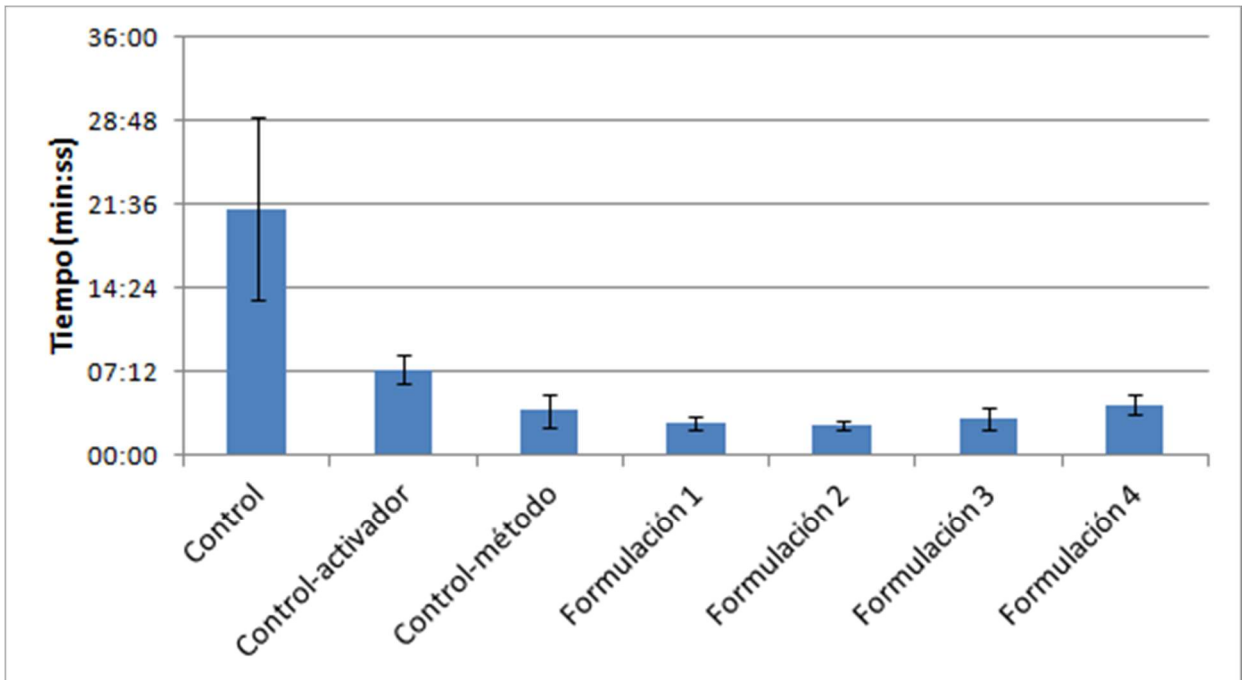
9. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que la formulación comprende uno o más componentes inorgánicos seleccionados del grupo de sales de calcio, sales de magnesio, y/o sales de estroncio.



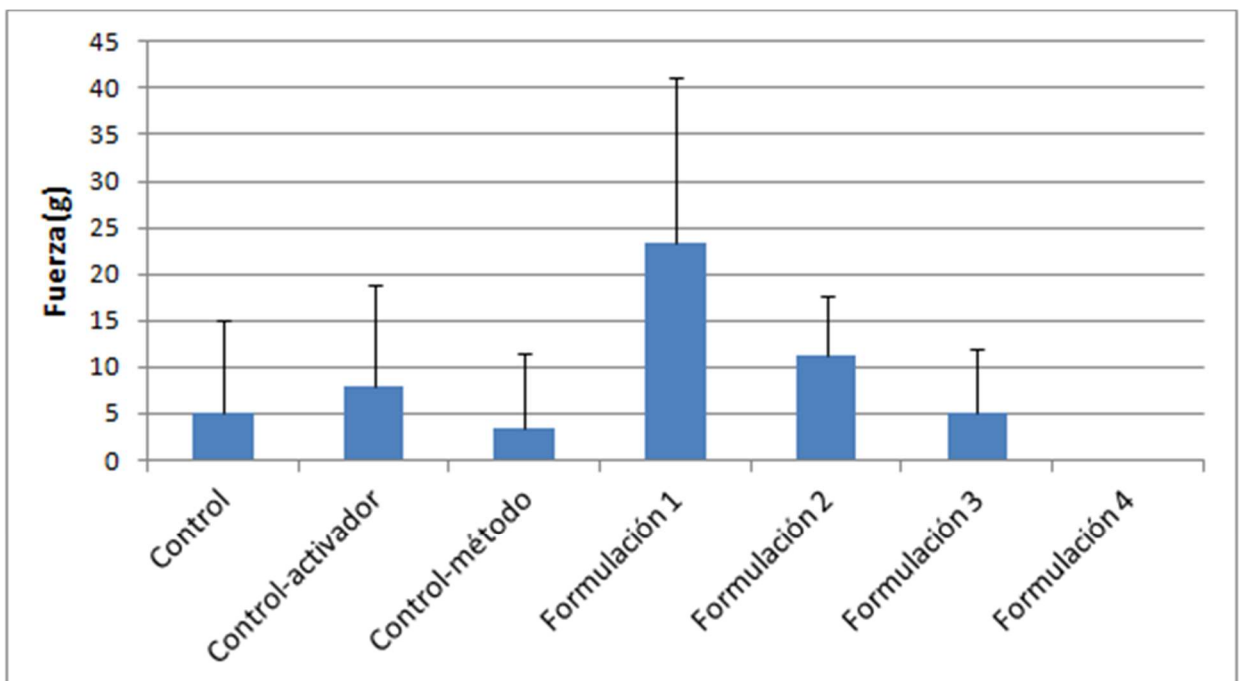
**FIG. 1**



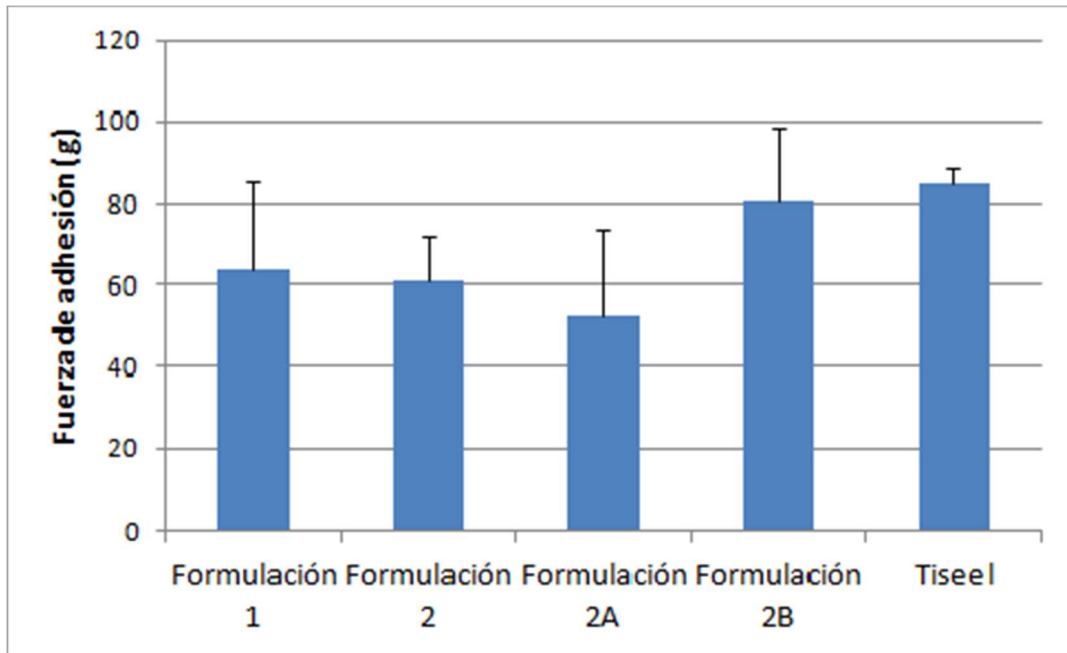
**FIG. 2**



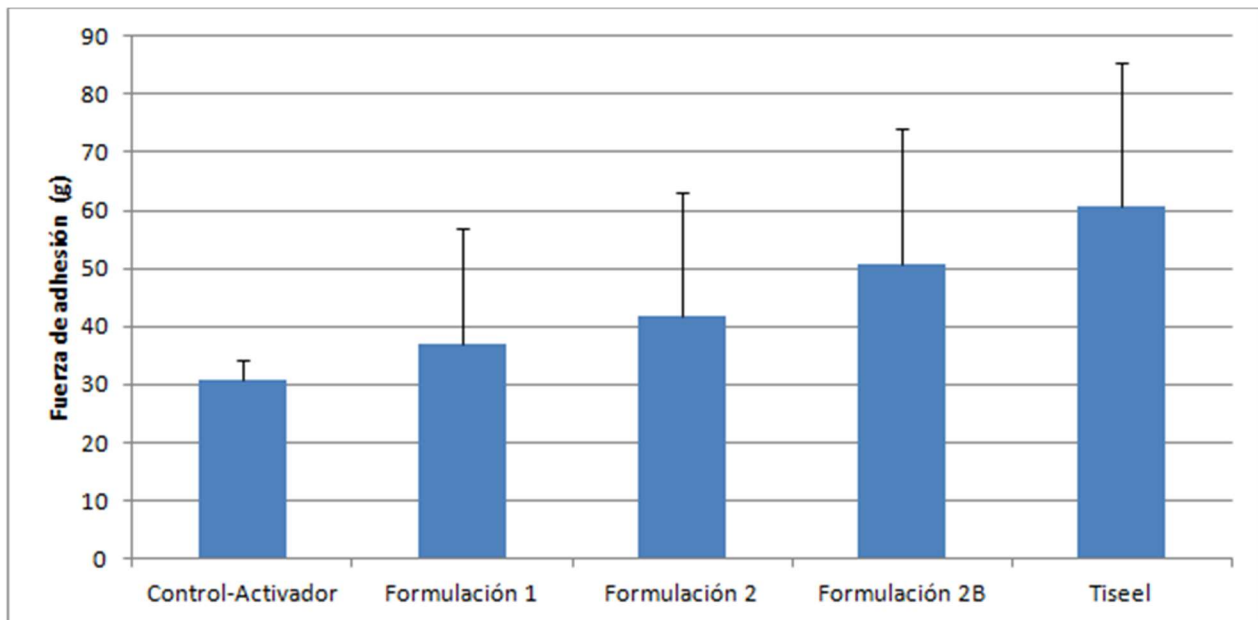
**FIG. 3**



**FIG. 4**



**FIG. 5**



**FIG. 6**