

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 483 794**

51 Int. Cl.:

C12N 5/078 (2010.01)

A61K 35/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2007 E 11167308 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014 EP 2361972**

54 Título: **Células madre obtenidas a partir de médula ósea para la regeneración de tejidos**

30 Prioridad:

02.05.2006 EP 06252326

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

07.08.2014

73 Titular/es:

**PHARMA PASS II LLC (100.0%)
68 Discovery
Irvine, CA 92618, US**

72 Inventor/es:

**KLEINBLOESEM, CORNELIS H. y
GILLES, PAUL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 483 794 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

Células madre obtenidas a partir de médula ósea para la regeneración de tejidos

Campo de la invención

5 La invención se refiere a células y en particular a células madre obtenidas a partir de la médula ósea que se pueden utilizar como una preparación terapéutica para la reparación celular y mejorar la regeneración de tejidos.

Antecedentes de la invención

10 La cicatrización normal de la piel después de una herida o lesión es un proceso complejo y dinámico que implica la reparación de estructuras celulares y de capas tisulares después de una lesión en la piel y en otros tejidos blandos. El proceso de curación se considera generalmente que tiene lugar en tres fases.

En primer lugar hay una fase de coagulación en la que las proteínas que espesan la sangre y las plaquetas de la sangre taponan una herida para evitar la pérdida de sangre. Después hay una fase inflamatoria en la que los leucocitos son enviados a combatir la infección. Finalmente hay una fase de reparación en la que las células del tejido restauran la integridad de las áreas dañadas.

15 Todas las cicatrizaciones producen por lo general una cicatriz que está causada hasta cierto punto por la reparación incompleta de la estructura inicial de la piel y la alteración de la alineación normal de las fibras de colágeno.

20 Además, hay dolencias y enfermedades específicas que pueden dar como resultado heridas y lesiones crónicas de la piel, tales como las úlceras y las heridas ulcerosas de la diabetes. También otros trastornos, tales como la parálisis y la vejez, pueden dar lugar a lesiones graves de la piel como resultado de una presión infligida sobre heridas, como las escaras.

25 El tejido cardíaco muscular está formado por cardiomiocitos. Estas formas especializadas de células musculares no son capaces de regenerarse después de una lesión en una persona adulta. Las lesiones más comunes en el músculo cardíaco se producen en ataques cardíacos isquémicos durante los cuales está restringido el flujo sanguíneo hasta el corazón y el músculo cardíaco se daña por hipoxia. Los pacientes que padecen un infarto cardíaco requieren tanto la restauración del suministro sanguíneo al corazón como la regeneración del músculo cardíaco dañado.

30 El sistema nervioso central compuesto de neuronas y otras células nerviosas es incapaz generalmente de regenerarse en una persona adulta y el sistema nervioso periférico solo es capaz de una regeneración limitada. Las dolencias que generalmente dan lugar a lesiones en el sistema nervioso central son la esclerosis múltiple y la esclerosis lateral amiotrófica.

Los incidentes que comúnmente dan como resultado lesiones en el sistema nervioso central son lesiones de la médula espinal y los accidentes vasculares cerebrales.

La incontinencia urinaria puede ser el resultado de una lesión de los esfínteres de la uretra.

35 Diversos trastornos pueden dar lugar a una lesión hepática, incluyendo la hepatitis vírica, la cirrosis, la esteatohepatitis y el cáncer de hígado.

La diabetes puede dar como resultado una lesión similar y degeneración del páncreas.

La artritis es una forma de degradación y lesión en las articulaciones entre los huesos.

40 Por lo tanto, existe una necesidad de producir estrategias terapéuticas para mejorar estos trastornos, ya sean el resultado de una patología o la imperfección natural de la curación de la piel, o una incapacidad del tejido cardíaco o del tejido nervioso o del cartílago o de las articulaciones o del tejido hepático o de los esfínteres uretrales para regenerarse, o una diabetes causada por la degeneración del páncreas. Además, hay una necesidad de estrategias terapéuticas para favorecer la angiogénesis en general y específicamente para el tratamiento de la disfunción eréctil.

45 Fathke et al. (Stem Cells 2004; 22:812-822) han mostrado que después de una inyección de células madre de médula ósea en ratones, estas células madre colaboraban con la población de células de la piel regeneradas en condiciones normales. Se mostró además que las células madre de la médula ósea

5 contribuían en la regeneración de los fibroblastos dérmicos y transcribían colágeno de tipo I y III, siendo el colágeno de tipo III específico para estas células madre obtenidas a partir de la médula ósea. Las células madre fueron trasplantadas sistémicamente mediante inyección en el torrente sanguíneo de un animal diferente al donante o directamente en la médula ósea del receptor. No se mostró una mejora en la calidad o la velocidad de la curación.

10 En la publicación de Bang O.Y et al., Ann Neurology 2005, junio; 57(6): 874-82, se describe el trasplante de células madre mesenquimatosas autólogas que eran células mononucleares de la médula ósea, para el tratamiento de accidentes cerebrovasculares isquémicos. Estas células se separaron mediante separación de la médula ósea por densidad en Ficoll y se cultivaron y se expandieron antes de la reimplantación. Además no expresaban CD34 o CD45. No se observó ninguna mejoría funcional después del tratamiento.

15 En la publicación de Mazzini et al., (The Lancet 2004; 354: 1936-1937), se describe el trasplante en la médula espinal de células madre mesenquimatosas autólogas para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica. Los resultados descritos solo mostraron una ralentización de la disminución de la capacidad vital forzada de algunos pacientes, pero no una mejoría.

Compendio de la invención

El Solicitante ha descubierto un nuevo método de extracción y separación de células de la médula ósea que permite incrementar su potencia terapéutica. Las células extraídas por este método son capaces de regenerar *in vivo* la piel, los vasos sanguíneos, el sistema nervioso y el músculo cardíaco.

20 Por lo tanto, la invención se refiere a:

1. Un procedimiento para la separación de células de la médula ósea que comprende las etapas de:

a) centrifugar la médula ósea;

b) recoger la capa leucocitaria formada después de la etapa a);

c) centrifugar la capa leucocitaria obtenida en la etapa b); y

25 d) recoger la capa leucocitaria formada después de la etapa c).

2. El procedimiento para la separación de células de la médula ósea según el punto 1, en el que las etapas a) y c), se llevan a cabo a 1500 G.

3. El procedimiento para la separación de células de la médula ósea de acuerdo con el punto 1 o 2, en el que las etapas a) y c) se llevan a cabo a 18°C.

30 4. El procedimiento para la separación de células de la médula ósea de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en el que la etapa a) se lleva a cabo durante al menos aproximadamente 20 minutos y la etapa c) se lleva a cabo durante al menos aproximadamente 10 minutos, preferiblemente hasta 20 minutos y más preferiblemente durante al menos aproximadamente 20 minutos.

35 5. El procedimiento para la separación de células de la médula ósea de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en el que en la etapa b) los glóbulos rojos por debajo de la capa leucocitaria se recogen con la capa leucocitaria, y el volumen de glóbulos rojos recogidos está entre 1 a 20 veces, preferiblemente 1 a 10 veces, más preferiblemente 2 a 5 veces e incluso más preferiblemente 5 veces, el de la capa leucocitaria.

40 6 El procedimiento para la separación de células de la médula ósea de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, que comprende etapas adicionales entre la etapa b) y c), que comprenden las etapas de:

b1) recoger un volumen de glóbulos rojos por debajo del volumen recogido en la etapa b), en el que el volumen de glóbulos rojos recogidos está entre 1 a 20 veces, preferiblemente 1 a 10 veces, más preferiblemente 2 a 5 veces e incluso más preferiblemente 5 veces, el de la capa leucocitaria;

45 c1) centrifugar el volumen de glóbulos rojos recogidos en la etapa b1);

d1) recoger la capa leucocitaria formada después de la etapa c1); y

e1) mezclar la capa leucocitaria recogida después de la etapa d1) con la capa leucocitaria recogida después de la etapa c).

7. La capa leucocitaria obtenible mediante el procedimiento de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores.

5 8. La capa leucocitaria según el punto 7, en la que las células contenidas en la capa leucocitaria expresan CD 45 o CD 34.

9. Las células de la capa leucocitaria obtenidas a partir de la médula ósea de acuerdo con cualquiera de los puntos 7 o 8.

10. Las células de acuerdo con el punto 9, en donde las células son células madre.

10 11. Las células de acuerdo con los puntos 9 o 10, en donde las células expresan CD 45 o CD 34.

12. Las células de acuerdo con cualquiera de los puntos 9 a 11, en donde las células son de la estirpe hematopoyética o mesenquimatosas.

13. Las células de acuerdo con los puntos 9 a 12, para su uso en terapia,

14. Las células de acuerdo con el punto 13, para su uso en la regeneración de tejidos.

15 15. Las células de acuerdo con el punto 14 o 14, para su uso en el tratamiento terapéutico de una enfermedad o una lesión del sistema nervioso central.

16. Las células para el uso de acuerdo con el punto 15, en donde la enfermedad o la lesión se selecciona entre el grupo que consiste en lesión de la médula espinal, esclerosis múltiple, accidente vascular cerebral y esclerosis lateral amiotrófica

20 17. Las células de acuerdo con el punto 14 o 14, para su uso en la curación de una herida de la piel.

18. Las células para su uso de acuerdo con el punto 17, en donde la herida de la piel se selecciona entre el grupo que consiste en heridas de la piel a consecuencia de diabetes, úlceras, cirugía, cirugía estética y quemaduras.

19. Las células de acuerdo con el punto 14 o 14, para su uso para favorecer la angiogénesis.

25 20. Las células de acuerdo con el punto 14 o 14, para su uso en el tratamiento de la disfunción eréctil.

21. Las células de acuerdo con el punto 14 o 14, para su uso en el tratamiento de la diabetes de tipo 1 o de tipo 2.

22. Las células según el punto 14 o 14, para su uso en el tratamiento de la artritis.

23. Las células según el punto 14 o 14, para su uso en el tratamiento de una lesión hepática.

30 24. Las células de acuerdo con el punto 14 o 14, para su uso en el tratamiento de la incontinencia urinaria.

25. Las células de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 14 a 24, que son autólogas.

Breve descripción de las figuras

35 - La Figura 1 muestra la médula ósea después del primer ciclo de centrifugación, la capa leucocitaria resultante y la eliminación del plasma sobrenadante.

- La Figura 2 muestra la capa leucocitaria después de la eliminación del plasma sobrenadante tras el primer ciclo de centrifugación. Se muestra, además, la agrupación de la capa leucocitaria en el tubo CL y la agrupación opcional de los 0,5 ml superiores de la capa de glóbulos rojos en el tubo GR.

40 - La Figura 3 muestra la capa leucocitaria final después del segundo ciclo de centrifugación y la eliminación del plasma sobrenadante. El extracto de la capa leucocitaria final se agrupó en el tubo CLF.

Descripción detallada de realizaciones de la invención

El solicitante ha mostrado que es posible utilizar células obtenidas a partir de la médula ósea y en particular células madre para el tratamiento de tejidos dañados, promoviendo e incrementando la curación en seres humanos y otros mamíferos. El solicitante ha desarrollado un nuevo método de extracción y separación que permite la concentración de extractos de células de la médula ósea, el aumento de la potencia de estas células y la concentración y selección de células de la médula ósea terapéuticas específicas. Estas células se pueden usar para mejorar la curación de incisiones y heridas después de una cirugía en general y en cirugía estética.

Por herida, se entiende cualquier rotura, desgaste, pérdida de continuidad o incisión de la piel, existan o no complicaciones.

Las células extraídas a partir de la médula ósea y que son adecuadas para la invención, pueden ser células madre y también se conocen como células madre mesenquimatosas. Para los fines de esta descripción, se pretende que las células madre no estén estrictamente restringidas a células capaces tanto de una división en estado no diferenciado como de diferenciación, sino generalmente a células capaces de regenerar un tejido ya sea por diferenciación o favoreciendo la división y la regeneración de otra células o activando otras células.

Las células madre se pueden obtener a partir de cualquier fuente, pero también pueden ser autólogas y por lo tanto obtenerse a partir del individuo sobre el que se realizará el tratamiento, para evitar el rechazo desde el hospedador.

Las células madre obtenidas a partir de la médula ósea se pueden obtener mediante la extracción de médula ósea a partir de huesos largos o planos adecuados. Se prefieren los huesos planos ya que contienen más médula ósea. Un hueso especialmente adecuado es el hueso de la cadera.

La médula ósea se extrae primero quirúrgicamente. Se conocen en general diversos métodos en la cirugía para efectuar la extracción de la médula ósea. Las células madre se separan a continuación y se concentran en conformidad con el ejemplo 1. Las características importantes del procedimiento son las etapas de separación que emplean dos ciclos de centrifugación con una velocidad de centrifugado baja. Las etapas empleadas incluyen:

1) la separación por centrifugación de la capa leucocitaria, de las capas del plasma y de los glóbulos rojos.

2) El pipeteo de las capas de la capa leucocitaria con aproximadamente 0,5 ml de la capa de glóbulos rojos que está justo por debajo.

3) La separación adicional mediante centrifugación de la capa leucocitaria, de las capas del plasma y de los glóbulos rojos.

4) El pipeteo de la capa leucocitaria final.

De forma adicional y opcionalmente, después de la etapa 2) es posible pipetear en tubos distintos la parte superior de 0,5 ml de la capa de glóbulos rojos que queda después de la recogida de la capa leucocitaria. Esta nueva muestra se puede centrifugar como para la extracción de la capa leucocitaria en la etapa 3 y procesar para la extracción de la capa leucocitaria como en la etapa 4. El extracto adicional de capa leucocitaria resultante procedente de la parte superior de 0,5 ml de la capa de glóbulos rojos, se puede añadir al extracto de la capa leucocitaria final y es una fuente adicional de células madre obtenidas a partir de la médula ósea,

El perfil de centrifugación que implica una G baja y un aumento progresivo hasta el valor máximo, garantiza una separación máxima de la médula ósea en sus partes constituyentes, concentrándose las células madre en la capa leucocitaria y reduciendo la presencia de cualquier célula residual en las otras dos capas. El perfil de centrifugación también produce una capa leucocitaria que se puede manipular posteriormente.

La técnica utilizada en la manipulación de la capa leucocitaria asegura que las capas limitantes entre esta y las capas adyacentes, también son capturadas para garantizar una retención máxima de células. Posteriormente, el impacto de la inclusión del material de la interfaz se reduce en la siguiente etapa del procedimiento.

El uso de un segundo ciclo de centrifugado, con un perfil modificado, permite una mayor concentración de las células madre sin provocar un daño físico a las células y permite controlar tanto el volumen final como las concentraciones finales de células madre. Este control permite adaptar las muestras recuperadas a los requisitos del trasplante.

- 5 La consecuencia de utilizar una segunda centrifugación produce un mejor resultado, una separación adicional de las capas y, en consecuencia, una concentración de las células en la capa leucocitaria, pero no una reducción significativa de la viabilidad de las células.

10 Se ha observado que las células madre de la médula ósea adecuadas para la invención son células nucleadas que expresan CD 45 o CD 34 o, alternativamente, que están presentes en una mezcla con células nucleadas que expresan CD 45 o CD 34. Otros marcadores que se pueden utilizar para el control o para la clasificación, son marcadores de leucocitos. Las células madre adecuadas para la invención no se limitan, pero incluyen el conjunto de células madre hematopoyéticas o mesenquimatosas de la médula ósea.

15 Esta descripción no se debe entender como una limitación de la invención solo a las células madre que son portadoras de los marcadores descritos. Cualquier célula madre capaz de diferenciarse en un tipo de célula que participa o favorece la regeneración de tejidos, es igualmente adecuada para los fines de la presente invención.

20 Una cantidad adecuada de células que se va a entregar en un medio fisiológicamente compatible adecuado es desde 20 hasta 200 millones de células, de las que de 2 hasta 20 millones están expresando CD34, en una suspensión celular de 2 a 10 ml. El exceso de solución de células no utilizado se puede congelar para volverlo a utilizar en un tratamiento posterior.

Ejemplos

La siguiente sección proporciona ejemplos de la presente invención, así como los mejores modos que no deben ser considerados como limitativos del alcance de la presente invención.

25 Ejemplo 1 Extracción de la capa leucocitaria

En este ejemplo se describe la técnica para separar y concentrar las células obtenidas a partir de la médula ósea que se utilizan para el trasplante y la regeneración de tejidos de acuerdo con la invención. El procedimiento se debe llevar a cabo de forma aséptica en un ambiente limpio con un equipo con aislamiento biológico adecuado, bien conocido en la técnica.

30 Definiciones:

MO	Médula Ósea
CL	Capa Leucocitaria
ACP	Agente crioprotector
DMSO	Dimetil sulfóxido
35 CFL	Campana de Flujo Laminar
NL	Nitrógeno Líquido
GR	Glóbulo Rojo

1. Transferencia de la MO desde el dispositivo de recogida hasta los tubos de centrifuga

40 a) Tomar un tubo de recogida de médula ósea, comprobar que la tapa está ajustada y mezclar bien el contenido.

b) Retirar la pequeña tapa del conector tubular de recogida y dejarla a un lado sobre la gasa estéril.

c) Invertir el tubo de recogida directamente encima de uno de los tubos de centrifuga estériles y empujar suavemente el émbolo, o insertar y empujar el émbolo temporal para desplazar el contenido en el tubo de centrifuga. No se requiere un esfuerzo excesivo, no se debe utilizar.

d) Volver a colocar la tapa más pequeña y dejar a un lado el tubo de recogida vacío.

e) Repetir el procedimiento para todos los tubos de recogida.

f) Llenar los tubos de centrifuga hasta un nivel máximo de 14 ml. Volver a tapar cuando se llene antes de proceder con el siguiente tubo disponible.

5 2. Centrifugación - 1ª rotación

a) Colocar los tubos de centrifuga en la cubeta interior.

b) Cargar dentro de la centrifuga y ejecutar la centrifuga. La centrifugación se realiza a 18°C durante 20 minutos con una FCR (fuerza centrífuga de rotación) de 1500 g. La aceleración hasta la g máxima y la desaceleración desde la g máxima se llevan a cabo en aproximadamente 60 segundos.

10 3. Captura de la capa leucocitaria - 1ª recogida

a) Al final de la primera rotación, sacar los tubos.

b) Retirar la tapa de un tubo de centrifuga que contiene médula ósea separada (el tubo "MO-centrifuga") y colocar sobre una gasa estéril.

15 c) Sacar una pipeta de su envoltorio estéril, y presionando positivamente la perilla, insertar en el cuello del tubo MO-centrifuga abierto. Retirar cuidadosamente el plasma, sin alterar la capa leucocitaria (repetir hasta que aproximadamente 0,2-0,5 ml de plasma permanecen por encima de la capa leucocitaria (Fig. 1). Cuando se retire la mayor parte del volumen de plasma, desecharlo en un vaso de precipitados. Repetir este procedimiento para todos los tubos MO-centrifuga hasta que se haya eliminado todo el exceso de plasma.

20 d) Regresar a cada tubo MO-centrifuga de uno en uno y capturar la capa leucocitaria. Agrupar la capa leucocitaria en tubos de centrifuga nuevos, vacíos e estériles (el tubo "CL- centrifuga") de la siguiente manera. Sacar una pipeta del envoltorio estéril y presionando positivamente la perilla, insertar en el cuello del tubo MO-centrifuga abierto. Pasar la punta de la pipeta a través de la capa delgada de plasma y acercarla a la capa leucocitaria. Girar la punta alrededor de la superficie de la capa leucocitaria y capturar la capa espesa y viscosa y hasta 0,5 ml de glóbulos rojos directamente por debajo de la capa (Fig. 2). Trasvasar a un tubo CL-centrifuga.

25 e) Opcionalmente, agrupar los 0,5 ml superiores de glóbulos rojos que permanecen después de que se ha pipeteado la capa leucocitaria, desde los tubos MO-centrifuga a los tubos "GR-centrifuga" (glóbulos rojos) (fig. 2), volver a tapar y poner en un estante.

30 4. Centrifugación - 2ª rotación

a) Colocar los tubos de centrifuga (CL y GR agrupados) en la cubeta interior.

35 b) Cargar dentro de la centrifuga y ejecutar la centrifuga. La centrifugación se realiza a 18°C durante 10 a 20 minutos con una FCR (fuerza centrífuga de rotación) de 1500 g. La aceleración hasta la g máxima y la desaceleración desde la g máxima se llevan a cabo en aproximadamente 60 segundos. El tiempo de centrifugación se selecciona según el estado de la Médula Ósea al final del primer ciclo de centrifugado; si se requiere un producto final altamente concentrado, la duración del centrifugado se incrementa hacia el tiempo máximo. Esto produce una capa leucocitaria muy concentrada y definida. Se puede realizar una inspección visual después de 10 minutos de rotación para evaluar el estado de la capa leucocitaria.

5. Captura de la capa leucocitaria - 2ª recogida

40 a) Al final de la segunda rotación, sacar los tubos.

b) Retirar la tapa de los tubos MO-centrifuga que contienen médula ósea separada y colocar boca a abajo sobre la gasa estéril.

45 c) Sacar una pipeta de su envoltorio estéril, y presionando positivamente insertar en el cuello del tubo MO-centrifuga abierto. Retirar cuidadosamente el plasma, sin alterar la capa leucocitaria. Repetir hasta que aproximadamente 0,2-0,5 ml de plasma permanecen por encima de la capa leucocitaria (Fig. 3). Repetir este procedimiento para todos los tubos MO-centrifuga hasta que se haya eliminado todo el

exceso de plasma.

5 d) Regresar a cada tubo MO-centrífuga de uno en uno y capturar la capa leucocitaria. Agrupar las capas leucocitarias en un tubo de centrifuga limpio de nuevo aporte (el tubo "CLF- centrifuga" (capa leucocitaria final)) de la siguiente manera. Sacar una pipeta del envoltorio estéril y presionando positivamente insertar en el cuello del tubo MO-centrífuga abierto. Pasar la punta de la pipeta a través de la capa delgada de plasma y acercarla a la capa leucocitaria. Girar la punta alrededor de la superficie de la capa leucocitaria y capturar la capa espesa y viscosa y hasta 0,5 ml de glóbulos rojos directamente por debajo de la capa (Fig. 3). Trasvasar a un tubo CLF-centrífuga nuevo.

10 e) Opcionalmente, el tubo GR una vez centrifugado habrá formado otra capa leucocitaria. Es posible llevar a cabo la misma captura de la capa leucocitaria para el tubo GR-centrífuga. Esta capa leucocitaria se puede mezclar opcionalmente con la capa leucocitaria en el tubo CLF-centrífuga,

Congelación opcional con DMSO

Es posible congelar las células obtenidas. Una ventaja es que la congelación detiene su degradación y aumenta su supervivencia y su potencia terapéutica. Las etapas necesarias son las siguientes:

15 a) Garantizar que el congelador con velocidad controlada está en la temperatura de inicio antes de añadir el DMSO.

b) Colocar bajo la CFL una ampolla-botella de DMSO.

c) Calcular el volumen de la mezcla de DMSO-dextrano requerido para lograr una mezcla de 10% v/v.

20 d) Colocar dos paquetes de gel frío alrededor del tubo con la capa leucocitaria y mantenerlo en posición vertical.

25 e) Añadir rápidamente el DMSO e iniciar una cuenta atrás de 10 minutos en un reloj digital ya preparado. Al volver a colocar la tapa, agitar el tubo para mezclar la capa leucocitaria y el DMSO. La adición de DMSO a las células produce una reacción exotérmica y el exceso de calor, se disipará a través los paquetes con gel refrigerado. Asegurar que los paquetes de gel permanecen en contacto con la muestra. Asegurarse de que la tapa está bien fijada.

f) Después de 2 minutos, repartir la mezcla de capa leucocitaria-DMSO en partes iguales en crioviales. Cerrar la tapa firmemente y ajustar cada tubo en la posición más baja de crio-cañas distintas (para asegurar que cada tubo se sumerge totalmente en nitrógeno líquido en la etapa de inmersión de la crio-operación). Ejecutar el congelador de velocidad controlada para llevar la temperatura a -140°C.

30 En general, las ventajas de esta técnica de extracción y de concentración son que:

1) El volumen de células trasplantadas se reduce al mínimo a la vez que se aumenta al máximo el número de células en buen estado recogidas.

2) El volumen de hematocrito y de plasma que no aporta nada al proceso de trasplante y que puede ser perjudicial, se reduce

35 3) La cantidad de crioconservante utilizado se reduce y por lo tanto se limitan los posibles efectos peligrosos en el paciente.

4) La concentración de las células resultantes se puede controlar y la relación de células totales/volumen se puede adaptar a los requisitos del tratamiento terapéutico.

Ejemplo 2: Recogida de células de la médula ósea:

40 Se utilizaron las siguientes herramientas y aparatos: el punto de recogida se esterilizó usando una 1 x capa de gasa estéril con un agujero de 75 x 90 cm, una almohadilla de gasa estéril de 20 x 20 cm y una solución estéril para esterilizar el punto de recogida, tal como isobetadina. La anestesia local se aplicó a través de una aguja de 21G (verde), una jeringa de 1 x 5 ml y una aguja subcutánea de 23G (azul). El agente anestésico era o bien 2% de Scandicain® o 2% de lidocaína. La aspiración de la médula ósea se realizó usando una aguja de aspiración médica de 16G esternón/iliaca de Sherwood Medical, jeringas Sarstedt Li-heparina con conexión tipo Luer y una pequeña bandeja para el transporte de las jeringas a la sala de operaciones.

La médula ósea se recogió en un ambiente aséptico y se llevaron a cabo las siguientes etapas:

1. El punto de recogida fue elegido para que fuera la espina iliaca posterior izquierda o derecha (SIPS).
2. El paciente se colocó en una posición adecuada (en la cama, horizontal o sentado).
3. La desinfección de la piel se realizó aproximadamente 10 cm alrededor de la SIPS con isobetadina polividona-yodo y tres gasas, varias veces.
4. El área esterilizada se cubrió con una capa de gasa estéril con un agujero (75 x 90 cm).
5. El anestésico local se aplicó con aproximadamente 5-10 ml de escandicaína al 2% en el punto de recogida, aproximadamente 1 cm alrededor de la SIPS utilizando la aguja de 23G (azul) con jeringa de 5 ml.
6. El área alrededor de la SIPS fue tratada con la aguja de anestesia local.
7. La escandicaína se aplicó y se requirieron aproximativamente 3-5 minutos de espera para comenzar.
8. La aguja para la aspiración de la médula ósea se colocó en el tejido esponjoso de la SIPS.
9. El catéter se retiró y se puso en un área estéril.
10. La jeringa de 9 ml de Li-Heparina estéril se ajustó.
11. Se aspiraron 9 ml de médula ósea por tubo y se mezclaron suavemente con la heparina y, la aguja Mandarin se posicionó aproximadamente 0,5 cm más profunda en el hueso.
12. La recogida se repitió varias veces con un nuevo tubo de 9 ml.
13. Se recogió un volumen total de 5 tubos de médula ósea a partir de al menos 5 a 10 posiciones de aguja diferentes.
14. Uso de una férula de bloqueo de la jeringa, para efectuar un cierre estéril

Ejemplo 3: Regeneración del sistema nervioso central

Un total de 10 pacientes con Lesión Medular Espinal (LME), 7 con Accidente Cerebral Vascular (ACV), 4 con Esclerosis Múltiples (EM) y 2 con Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) fueron tratados con células madre obtenidas a partir de su propia médula ósea. Las células madre se separaron en condiciones de ambiente aséptico y se congelaron hasta la administración de acuerdo con el ejemplo 1.

Las células se aplicaron directamente a la médula espinal o al cerebro. Los pacientes con ACV, EM y ELA se trataron con una administración intratecal e intravenosa (i.v.). Tanto en los pacientes con LME como con ACV se observaron mejoras significativas en la sensibilidad y el capacidad de movimiento en la gran mayoría de los pacientes. El desarrollo de estas recuperaciones funcionales se llevó a cabo durante varios meses.

También en pacientes con EM y ELA se observaron mejoras significativas. Todos los pacientes fueron estabilizados y durante el período de observación no se observaron deterioros. La observación más sorprendente es que el espasmo desapareció en todos los casos de accidente cerebrovascular y EM y en la mayoría de los pacientes con LME.

Los trasplantes de células fueron seguros y bien tolerados. No hubo complicaciones a excepción de un paciente en el que hubo exudación de una herida durante 3 semanas. Después de la administración intratecal, los pacientes tuvieron malestar general, dolor de espalda y vómitos durante un máximo de 5 días. De lo contrario, los tratamientos fueron bien tolerados.

Los tratamientos se llevaron a cabo de la siguiente manera.

Métodos

Pacientes con LME

Se seleccionaron pacientes estables (con lesiones desde hacía más de 9 meses). La médula espinal no

tenía una atrofia profunda o no mostraba una disección completa en la RM. Participaron pacientes parapléjicos y tetrapléjicos.

Pacientes con AVC

- 5 Se seleccionaron pacientes estables (lesiones de más de 1 año). Al área infartada se debía poder acceder mediante neuronavegación, reduciendo al mínimo la posibilidad de lesiones en zonas no afectadas. Los pacientes debían tener síntomas neurológicos graves (hemiparesia, espasmos). En pacientes en los que no era posible llegar con neuronavegación debido a un infarto profundo, se realizó una administración intratecal seguida de infusión i.v.

Pacientes con EM

- 10 Se seleccionaron pacientes con formas progresivas secundarias de EM. Los pacientes tenían una lesión clara en la RM en el cerebro y/o en la columna vertebral.

Pacientes con ELA

Para los pacientes con ELA no se utilizaron criterios de exclusión específicos, salvo que, en opinión del médico que trataba al paciente, éste debía estar suficientemente estable para el tratamiento.

- 15 Células madre

Las células madre se obtuvieron a partir de médula ósea autóloga. Se recogieron hasta 200 ml de médula ósea. El procesamiento se realizó bajo condiciones de GMP.

- 20 Las células madre se separaron de acuerdo con la invención y el volumen total se redujo aproximadamente 50 veces. La muestra se congeló a una velocidad controlada hasta tener una temperatura final inferior a -180°C en vapor de nitrógeno hasta el transporte. Como crioprotector se añadió 10% de DMSO-dextrano. Inmediatamente después del trasplante, la muestra se descongeló y se administró. Se administraron al menos 5 millones de células madre. La concentración de células CD34 positivas estaba en el intervalo de 5-17 millones.

Procedimiento quirúrgico para LME

- 25 Bajo anestesia general, se realizó una laminectomía a nivel de la lesión. La duramadre se cortó y las células madre se inyectaron con una microjeringa en la lesión, con vista microscópica. Esto comenzó en la parte superior de la lesión seguido de varias inyecciones en la lesión. En total, se realizaron 50 a 20 miniinyecciones de 50 a 100 microlitros. El volumen total fue como máximo de 1,5 ml de suspensión celular. Después de la terminación, la duramadre se cerró y 2 a 3 días después de la cirugía los
30 pacientes volvieron a casa para una recuperación adicional y rehabilitación durante al menos 4 a 6 meses.

Procedimiento quirúrgico para AVC

- 35 Se realizó una incisión con anestesia general en el cráneo. Se perforó un orificio y se cortó la duramadre. Mediante navegación con un dispositivo de Medtronic, un catéter con múltiples orificios separados entre sí por aproximadamente 1 cm, fue guiado a la zona infartada. La suspensión celular (hasta 8 ml) se inyectó en al menos dos áreas diferentes. Después de 1 a 3 días los pacientes volvieron a casa para una recuperación y rehabilitación adicionales

Administración intratecal y administración i.v. en pacientes con accidente cerebrovascular, EM y ELA.

- 40 En primer lugar se administró una infusión intravenosa (i.v.) de 250 ml de solución salina durante 10 minutos. Una aguja de 16 G se colocó a nivel lumbar inferior en el canal espinal. Esto se realizó con anestesia local. Se tomaron aproximadamente 2 ml de líquido en una jeringa y se mezclaron con 2 ml de suspensión celular. Esta se inyectó lentamente durante 2 min por vía i.v., la administración se realizó a través de una vena en el brazo del paciente durante 5 min.

Evaluación de los pacientes

- 45 Se realizaron evaluaciones neurológicas antes y 1, 2 y 6 meses después de la intervención quirúrgica. A partir de las mismas, se realizó una descripción individual.

Pacientes con LME

Un resumen de los datos demográficos de los pacientes se proporciona en la Tabla 1. Un resumen de los resultados obtenidos después del trasplante de células madre se proporciona en la Tabla 2. Una descripción individual de cada paciente se proporciona a continuación.

5 Paciente 1

El Paciente 1 era un varón de 39 años. Padecía una complicación quirúrgica después de una intervención quirúrgica de hernia 9 meses antes. Su lesión era completa a nivel C5-C6. No tenía ninguna sensibilidad ni podía realizar movimientos desde el pecho hacia abajo. Padecía espasmos en la pierna izquierda. No tenía ninguna sensibilidad ni podía realizar movimientos con los dedos de la mano izquierda. En su mano derecha podía mover ligeramente dos dedos. Su presión arterial era normal. Tenía vejiga neurogénica y no tenía control de los esfínteres.

Después de 1 mes la sensibilidad en ambos brazos y dedos, regresó. Podía mover tres dedos de su mano izquierda y todos los dedos de su mano derecha. Podía mover los dedos de los pies y tenía sensaciones de frío/calor en sus piernas. Después de 3 meses podía mover todos los dedos de las manos y era capaz de realizar tareas complejas, como escribir a mano. Con capacidad de movimiento en la pierna (estirar y encoger) usando un andador, fue capaz de caminar aproximadamente 20 pasos. Después de mucho ejercicio su rendimiento fue aumentando semanalmente. Podía sentir claramente el abdomen y la vejiga. Sin embargo todavía no tenía control sobre los esfínteres o la vejiga. También recuperó la erección del pene. A los 6 meses la mejora continuaba, pero a un ritmo muy lento. Una Sep-EMG mejoró en gran medida 3 meses después de la cirugía. La RM a los 6 meses sugería que la lesión era por lo menos un 30% menor.

Paciente 2

El paciente 2 era un varón de 36 años con una lesión completa en C4-C5. No tenía ninguna sensibilidad por debajo del pecho. Tampoco tenía sensibilidad en las manos y en los dedos de las manos. Su accidente fue un accidente de buceo hacía 2 años. Padecía espasmos en las dos piernas. Tenía vejiga neurogénica con infecciones muy frecuentes de las vías urinarias y no tenía control de los esfínteres. Un mes después de la intervención quirúrgica el paciente tenía sensaciones de quemazón y de electricidad en sus dos brazos y piernas. A los 3 meses podía mover la mano izquierda y los dedos de esa mano y los dedos del pie de la pierna izquierda. Después de 4 meses podía caminar algunos pasos con andador. La sensibilidad en la vejiga y el abdomen regresó al cabo de 2 meses. También regresó la sensibilidad al calor y al frío. Una Sep-EMG después de 6 meses parecía que era casi normal. La RM mostró una disminución en el área de la lesión de aproximadamente un 50%.

Paciente 3

El Paciente 3 era un varón de 21 años. Tuvo 2 años antes un accidente de coche y estaba lesionado a nivel T7. Su lesión era completa. En la TC se sugirió una disección casi completa. Sin embargo, padecía espasmos graves en su pierna izquierda. Incluso después de 6 meses, no se observó ninguna mejora en su estado clínico y en la TC no se observó ninguna diferencia.

Paciente 4

El Paciente 4 era un varón de 42 años. Tuvo 2 años antes un accidente de moto y estaba lesionado a nivel C4-C5. No tenía ninguna sensibilidad o capacidad de movimiento desde el pecho. A veces tenía algunas sensaciones en los músculos de sus piernas. Padecía espasmos graves en las dos piernas. No tenía ninguna sensibilidad en su mano izquierda y alguna sensibilidad en su dedo medio de la mano derecha. Podía mover el brazo izquierdo y el derecho. Tenía vejiga neurogénica y no tenía control de los esfínteres. Tenía una presión arterial de 100/70 mm de Hg o ligera tendencia a mareos. Después de un mes, volvió la sensibilidad a su brazo izquierdo, a los dedos de la mano izquierda y la derecha. El nivel de sensibilidad bajó a la cintura. También tenía sensibilidad al frío/calor en la pierna y sensibilidad en los dedos del pie. También tenía sensibilidad en su abdomen. La presión arterial es normal (130/80 mm Hg). Tenían lugar espasmos pero ya no eran dolorosos. A los 2 meses sentía una sensación de quemazón (de electricidad) a través de los brazos y las piernas y dolor muscular en los brazos, pecho, espalda y piernas. También le dolían los músculos de los dedos de la mano. A los 4 meses tenía sensibilidad hasta los dedos de los pies. Sus músculos de la espalda, así como del abdomen se recuperaron por completo, lo que le permitió mover su cuerpo hacia arriba y hacia abajo cuando estaba sentado en su silla de

ruedas. También recuperó la sensibilidad en su abdomen y esfínteres. La sensación de electricidad se intensificó.

Paciente 5

5 El Paciente 5 era una mujer de 55 años. Padecía un infarto de médula debido a un coágulo de sangre a nivel T4-T5. Era una lesión incompleta con sensibilidad limitada. Además, no tenía sensación de frío/calor. Debido a un espasmo grave en ambas piernas tenía una bomba de baclofeno. Podía estar de pie con el espasmo durante unos segundos. Padecía vejiga neurogénica y no tenía control de los esfínteres. Después de la intervención quirúrgica experimentó algunos problemas de cicatrización, pero se curó al cabo de 4 semanas. Un mes después de la intervención quirúrgica tenía sensibilidad en el
10 intestino y algunas sensaciones de frío/calor. Mejoró la fuerza de los músculos de sus piernas, pero no se observó ningún cambio en el espasmo. Cuatro meses después de la operación tenía sensibilidad en la vejiga y sus fuerzas continuaron desarrollándose.

Paciente 6

15 El Paciente 6 era un varón de 36 años de edad. Padecía una lesión completa a nivel C4-C5, debido a un accidente de trabajo como obrero de la construcción. No tenía sensibilidad desde el pecho, espasmo ligero, no tenía dedos funcionales, vejiga neurogénica y los esfínteres no funcionaban. El paciente recuperó un poco de sensibilidad en el brazo y las piernas. No se observaron movimientos. La mejora era muy lenta.

Paciente 7

20 El Paciente 7 era un varón de 22 años. Padecía una lesión completa a nivel T6 debida a un accidente de coche. Era una lesión completa que produjo una falta de sensibilidad, de movimiento y también no había espasmo. El paciente tenía vejiga neurogénica y no tenía control de los esfínteres. No hubo mejoras aparentes al cabo de 3 meses.

Paciente 8

25 El Paciente 8 era un varón de 21 años. Padecía una lesión completa en T7 debido a un accidente de coche 8 años atrás. No tenía sensibilidad ni capacidad de movimiento. Padecía vejiga neurogénica y no tenía control de los esfínteres. Después de 4 semanas, recuperó la sensibilidad de la vejiga y una sensación de quemazón descrita como electricidad en las piernas. También recuperó funciones del sistema nervioso autónomo, incluyendo la falta de sensación de frío en las piernas. Después de 2
30 meses, se incrementó la sensibilidad y a veces consiguió un control de la vejiga.

Paciente 9

35 El Paciente 9 era un varón de 40 años que padecía una lesión completa en C4-C5, debido a un accidente de coche. El paciente tenía algún espasmo, no tenía control de la mano y no podía mover los dedos ni tenía sensibilidad. Padecía vejiga neurogénica y una ausencia de control de los esfínteres. El paciente padecía decúbito grave. Después de cuatro semanas, sintió sensaciones de quemazón. La sensibilidad volvió a sus brazos y a los dedos de la mano. Los espasmos se redujeron y ya no eran dolorosos. Después de 3 meses era capaz de mover los dedos en ambos brazos. La sensación de quemazón fue aumentando todo el tiempo.

Paciente 10

40 El Paciente 10 era un varón de 32 años con lesión incompleta en C5-C6, con cierta sensibilidad y capacidad de movimiento en la mano y los dedos y algunas sensaciones de frío/calor. Tenía abducción a la izquierda y a la derecha. Padecía espasmos y vejiga neurogénica y no tenía control de los esfínteres. No tenía ventilación asistida. Después de 4 semanas volvió la transpiración y la sensación de quemazón en las piernas. Podía mover los dedos de la mano con mucha más facilidad. También padecía un menor
45 número de espasmos. El paciente también recuperó la sensibilidad intestinal.

Datos demográficos de pacientes con LME antes de la cirugía.

En las tablas 1a y 1b mostradas a continuación, se resume el resultado de la evaluación clínica del pretratamiento de los pacientes.

Nº	Edad	Lesión	Completa	Sensibilidad en la vejiga	Sensibilidad en el intestino	Espasmo	Ventilación asistida
1	39	C5-C6	s	n	n	s	n
2	36	C4-C5	s	n	n	s	n
3	21	T7	s	n	n	s	n
4	42	C4-C5	s	n	n	s	n
5	55	T4-T5	n	n	n	s	n
6	36	C4-C5	s	n	n	s/n	n
7	22	T6-T7	s	n	n	n	n
8	21	T7-T8	s	n	n	s	n
9	40	C4-C5	s	n	n	s	n
10	32	C5-C6	s	n	n	s	n

Tabla 1a: s significa si, n significa no

Nº	Sensibilidad						Movimiento					
	pierna		brazo		dedos mano		pierna		brazo		dedos mano	
	I	D	I	D	Mi	Md	I	D	I	D	Mi	Md
1	n	n	s	n	n	s	n	n	s	s	n	s
2	n	n	s	n	n	n	s	n	s	n	n	n
3	n	n	s	s	s	s	n	n	s	s	s	s
4	n	n	s	s	s	n	n	n	s	s	n	n
5	n	n	s	s	s	s	n	n	s	s	s	s
6	n	n	s	s	n	n	n	n	s	s	n	n
7	n	n	s	s	s	s	n	n	s	s	s	s
8	n	n	s	s	s	s	n	n	s	s	s	s
9	n	n	s	n	n	n	n	n	s	n	n	n
10	n	n	s	n	s	n	n	n	s	s	s	n

Tabla 1b: s significa si, n significa no

Resultados de pacientes con LME después de la intervención quirúrgica.

5 En las tablas 2a y 2b mostradas a continuación, se resume el resultado de la evaluación clínica del postratamiento de los pacientes.

Nº	Tiempo después de la cirugía	Lesión	Sensibilidad en la vejiga	Sensibilidad en el intestino	Espasmo	Ventilación asistida
1	9 meses	C5-C6	s	s	n	n
2	9 meses	C4-C5	s	s	n	n
3	9 meses	T7	n	n	s	n
4	5 meses	C4-C5	s	s	s/n	n
5	5 meses	T4-T5	s	s	s	n
6	3 meses	C4-C5	n	n	n	n

Nº	Tiempo después de la cirugía	Lesión	Sensibilidad en la vejiga	Sensibilidad en el intestino	Espasmo	Ventilación asistida
7	3 meses	T6-T7	n	n	s	n
8	2 meses	T7-T8	s	n	s	n
9	2 meses	C4-C5	n	n	n	n
10	2 meses	C5-C6	n	n	n	n

Tabla 2a: s significa si, n significa no

Nº	Sensibilidad						Movimiento					
	pierna		brazo		dedos mano		pierna		brazo		dedos mano	
	I	D	I	D	Mi	Md	I	D	I	D	Mi	Md
1	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
2	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
3	n	n					n	n				
4	s	s	s	s	s	s	n	n	s	s	n	n
5	s	s	s	s	s	s	s/n	s/n	s	s	s	s
6	s	s	s	s	s	s	n	n	n	n	n	n
7	n	n	s	s	s	s	n	n	s	s	s	s
8	s	s	s	s	s	s	n	n	s	s	s	s
9	s	s	s	s	s	s	n	n	n	n	s	s
10	s	s	n	n	s	s	n	n	n	n	n	n

Tabla 2b: s significa si, n significa no

Pacientes con AVC

5 Un resumen de los datos demográficos de los pacientes se proporciona en la Tabla 3. Un resumen de los resultados obtenidos después del trasplante de células madre se proporciona en la Tabla 4. Una descripción individual de cada paciente se proporciona a continuación.

Paciente 1

10 El Paciente 1 era un varón de 54 años. Tuvo un derrame cerebral hace 4 años debido a una insuficiencia valvular. Tuvo un infarto medio del lado derecho lo que produjo una hemiparesia con afasia y trastornos cognitivos. También tenía "visión en túnel", alteraciones del sentido del gusto y no tenía sensación de calor/frío. Su coordinación estaba alterada. El espasmo en la pierna y el brazo/mano izquierdos era grave. Estaba mentalmente deprimido. Tenía una presión arterial alta y sudaba en el sitio paralizado, lo que indicaba un sistema nervioso autónomo alterado. La sensibilidad en su lado izquierdo regresó un mes después de la intervención quirúrgica, así como el control del tronco. Recuperó completamente el sentido del gusto. La sensación de frío de su brazo desapareció. El espasmo desapareció casi por completo en la pierna. Su capacidad para caminar mejoró notablemente después de 3 meses. No hubo necesidad de emplear una silla de ruedas en condiciones normales. También mejoraron el habla y su estado de ánimo. Ya no tuvo más problemas de defecación. El paciente pudo abrir su mano afectada. El paciente realizó con regularidad una terapia física y todavía está mejorando. Nueve meses después de la intervención, sus movimientos con motricidad fina siguen mejorando. Puede usar su mano izquierda para coger objetos. También mejoró adicionalmente su capacidad para caminar, así como el habla. El espasmo ha desaparecido por completo. Una nueva RM mostró que el tamaño del infarto se había reducido un 20-25%.

Paciente 2

El paciente 2 era un varón de 69 años que había padecido un derrame cerebral hacía 5 años. Tenía infarto parietal frontal muy extenso en el lado derecho. Este dio como resultado una hemiparesia con afasia. Tenía sensibilidad doble en la lengua y pérdida del gusto. También tenía espasmos en los pies y las piernas. La presión arterial era normal. La memoria también se vio afectada.

Un mes después de la intervención quirúrgica volvió la sensación de frío/calor y sus piernas tenían "cosquilleos" y sensación de electricidad. También volvió parcialmente el sentido del gusto. Fumar volvió a ser una sensación placentera. Después de 3 meses desapareció el espasmo en el pie, pudo mover de nuevo los dedos de los pies. También recuperó algo de fuerza es su pierna. Sin embargo 4 meses después de la intervención tuvo un accidente de coche grave que supuso un reemplazo de cadera. Después de este accidente la mayoría de las mejoras desaparecieron.

Paciente 3

El Paciente 3 era un varón de 34 años. Tuvo 2 accidentes de coche hace 2 y 6 años respectivamente. Tenía un infarto parietal frontal extenso en el lado izquierdo, pero también temporal derecho, de acuerdo con un traumatismo craneal que produjo una conmoción cerebral. Esto dio lugar a una tetraparesia, espasmo grave en el lado derecho de ambos brazos y piernas, afasia y falta de memoria. También perdió la sensibilidad en el lado derecho. Tres semanas después de la intervención quirúrgica tenía menos espasmo en el brazo y la pierna. También tenía una coordinación mejor. El habla mejoró entonces enormemente. Después de 3 meses pudo caminar con más facilidad y más derecho. También estaba más vivaz que antes.

Paciente 4

El Paciente 4 era un varón de 42 años. Padece un derrame cerebral hace un año. Tuvo un infarto medio en su lado izquierdo, debido a la hipertensión y el tabaquismo. Esto provocó una hemiparesia en su lado derecho, con afasia y falta de memoria. Sudaba abundantemente en su lado derecho, lo que sugiere también un efecto sobre el sistema nervioso autónomo. Tampoco tenía ninguna sensibilidad en la boca y no tenía más sentido del gusto. Padece espasmos en su lado derecho (brazo y pierna). Después de la intervención quirúrgica recuperó la sensibilidad en la boca y en la parte derecha de su pecho. La sudoración desapareció por completo y la marcha también mejoró. El espasmo desapareció casi por completo. Podía mover la pierna y el brazo y abrir su mano en donde había estado ubicado el espasmo. El habla era más fluida. Su pierna tenía una temperatura normal y la sudoración también se normalizó. Después de 3 meses, su bienestar general y su calidad de vida habían mejorado mucho.

Paciente 5

El Paciente 5 era un varón de 61 años. Padece un derrame cerebral debido a una fibrilación del atrio. Esto dio lugar a una hemiparesia total del lado izquierdo, sin sensibilidad, parálisis facial, problemas del habla, abandono y afasia. También hubo un fenómeno de extinción visual del lado izquierdo. El paciente también tenía espasmos en la mano, el brazo y las piernas. Tres semanas después de la cirugía, el paciente fue menos sensible a la luz del día. El habla mejoró de forma marginal. De lo contrario, nada cambió. Después de 3 meses, los signos no mejoraron exceptuando la capacidad de atención.

Paciente 6

El Paciente 6 era una mujer de 62 años. Padece hace 6 años un infarto del tronco cerebral en el lado izquierdo mientras que bailaba. Esto produjo una hemiparesia en el lado derecho. Tanto la pierna como el brazo eran espásticos. El habla estaba gravemente afectada. Su ojo izquierdo también se vio afectado, lo que provocó una ceguera casi completa. Durante las primeras 8 semanas después de la infusión no cambió nada. Luego, el espasmo desapareció lentamente, el reflejo luminoso en su ojo izquierdo regresó y 2 semanas más tarde también la visión en más del 80%. Informó espontáneamente que era capaz de leer. La sensibilidad en su lado derecho se recuperó parcialmente. También se mejoró ligeramente la coordinación. El habla también mejoró y fue más fluida. La mejora siguió avanzando.

Paciente 7

El Paciente 7 era una mujer de 42 años. Padece una lesión cerebral grave por falta de oxígeno durante el parto. Estaba en silla de ruedas y no podía hablar con normalidad. También era deficiente mental con

5 espasticidad grave y alteración del tono facial. Después de 1 mes, la espasticidad disminuyó mucho en las piernas y los brazos. Se sentaba más erguida en la silla de ruedas. Se observó una importante mejora en el nivel de capacidad de atención. La parálisis facial disminuyó y no hubo más pérdida involuntaria de saliva. Su fuerza muscular en el brazo mejoró y durante el ejercicio físico pudo levantar un objeto de 1 kg, con el brazo derecho.

Datos demográficos de los pacientes con AVC antes de la cirugía.

Las tablas 3a y 3b mostradas a continuación, resumen el resultado de la evaluación clínica del pretratamiento de los pacientes.

Nº	Edad	Lesión	Sabor	Visión	Habla	Memoria	Observaciones
1	54	hd	-	-	-	-	
2	69	hd	-	+	-	-	
3	34	hi / hd	+	+	-	+ / -	tetraparesia
4	42	hi	-	+	-	-	
5	61	hi	+	+	-	-	fotosensibilidad
6	62	hi	+	-	-	-	
7	42	hi	-	+	-	-	

Tabla 3a: hi significa hemisferio izquierdo, hr significa hemisferio derecho.

10

- significa afectado, + significa no afectado.

Nº	Espasmo				Sensibilidad				Movimiento			
	pierna		brazo		pierna		brazo		pierna		brazo	
	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D
1	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
5	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
6	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3b: - significa afectado, + significa no afectado.

Resultados para los pacientes con AVC después de la cirugía.

En las tablas 4a y 4b mostradas a continuación, se resume el resultado de la evaluación clínica del postratamiento de los pacientes.

Nº	Tiempo después de la cirugía	Sabor	Visión	Habla	Memoria	Observaciones
1	8 meses	+	+	+	+	Visión: visión en túnel y defecación mejoradas.
2	8 meses	+	-	+	-	Tuvo un accidente grave de coche 14 semanas después de la intervención quirúrgica con reemplazo de cadera.
3	3 meses	-	-	+	+	

Nº	Tiempo después de la cirugía	Sabor	Visión	Habla	Memoria	Observaciones
4	3 meses	-	-	+	-	Sensibilidad en la boca, acaba la transpiración en el lado paralizado.
5	3 meses	-	+	+	-	Menos fotosensible.
6	6 meses	-	+	+	+	
7	7 meses	-	-	+	+	Menos parálisis facial.

Tabla 4a: hi significa hemisferio izquierdo, hr significa hemisferio derecho.

- significa afectado, + significa no afectado.

Nº	Espasmo				Sensibilidad				Movimiento			
	pierna		brazo		pierna		brazo		pierna		brazo	
	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D
1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
2	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
3	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
4	+	(+)	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

Tabla 4b: - significa afectado, + significa no afectado.

Pacientes con ELA

- 5 Una descripción individual de cada paciente se proporciona a continuación.

Paciente 1

10 El Paciente 1 era una mujer de 72 años de edad con ELA desde hacía 3 años. No podía hablar y estaba totalmente inválida. Solo podía estar tumbada en la cama. El movimiento de las piernas y los brazos era posible, pero con dificultad. El uso de los dedos de la mano era limitado. Su capacidad pulmonar no era medible. Inmediatamente después del tratamiento con células madre su estado general mejoró. Hablar era más fácil y su estado se estabilizó 2 meses después de la terapia.

Paciente 2

15 El Paciente 2 era un varón de 52 años diagnosticado con ELA hacía 3 meses. Los únicos síntomas eran problemas del habla. Después de 2 meses, su estado no había empeorado. Su habla mejoró ligeramente.

Pacientes con EM

Una descripción individual de cada paciente se proporciona a continuación.

Paciente 1

20 El Paciente 1 era un varón de 42 años diagnosticado con EM hacía 12 años. Hace 3 años se volvió secundaria progresiva. No podía mover las piernas y tampoco tenía sensibilidad en las piernas. Además estaba muy cansado. Tenía problemas de defecación y padecía espasmos continuos en sus piernas. Estaba obligado a utilizar una silla de ruedas.

Recibió una inyección i.v. de células madre ya que la administración intratecal no era posible (punción seca). La misma tarde el espasmo desapareció. Estuvo muy cansado durante 3 días, pero se recuperó

rápidamente. Después de 2 semanas, la sensibilidad en los dedos de los pies y las piernas volvió lentamente. Después de 2 meses era capaz de mover los dedos de los pies y la parte inferior de las piernas. Recuperó fuerzas y ahora puede hacer ejercicios de aproximadamente 4-5 vatios durante 15 minutos. Su nivel previo de ejercicio era nulo. Su defecación era casi normal y recuperó las erecciones matutinas. La función mental mejoró. El paciente tenía lucidez y se podía expresar bien. Los reflejos de su pierna eran similares a los de los brazos y no tuvo más reflejos hiperactivos. Su visión también había mejorado. No era necesaria ninguna medicación contra el espasmo.

Paciente 2

El Paciente 2 era una mujer de 41 años de edad con EM secundaria progresiva desde hacía 15 años. Estaba totalmente inválida y no podía hablar ni tragar. La visión estaba alterada. No tenía ninguna sensibilidad y no podía mover las piernas. Tenía espasmos y era incontinente. La paciente recibió una inyección i.v. de células madre. El número de células de la médula ósea se redujo a $1,5 \times 10^6$ células. Después de 3 semanas, los espasmos desaparecieron de sus piernas y brazos. El habla mejoró lentamente. La defecación mejoró. Después de 3 meses no se observaron otras mejoras y se planificó una segunda infusión.

Paciente 3

El Paciente 3 era una mujer de 62 años de edad que padecía EM desde hacía más de 15 años. Desde hacía 3 años tenía la forma progresiva secundaria. Padecía fuertes dolores y espasmos en las piernas y en el cuerpo entero. Tenía dificultad para tragar y comer. Tenía muchas úlceras de aproximadamente 1 mm^2 en sus piernas. Estaba permanentemente en una silla de ruedas. La piel de la cara le picaba todo el tiempo. Tres días después de la terapia celular, la espasticidad disminuyó y al cabo de 2 semanas había desaparecido por completo. Sus úlceras en las piernas se cerraron completamente al cabo de 3-5 días. Después de 2 semanas era capaz de estar de pie sin ayuda durante 30 segundos, lo que era imposible anteriormente. Comer y tragar los alimentos era completamente normal. Su visión mejoró (no tenía más visión doble) y el habla también. El dolor de la EM había desaparecido casi por completo y mentalmente estaba bien. El cansancio típico de la EM había desaparecido. La medicación contra espasmos se redujo hasta casi desaparecer.

Paciente 4

El Paciente 4 era un varón de 39 años con antecedentes de EM durante los últimos 12 años y los últimos 3 años con la forma secundaria progresiva. Podía caminar sin ayuda durante un máximo de 100 metros. Padecía espasmos en los brazos. Estaba muy cansado y tenía problemas de defecación. Su visión también estaba alterada. Hasta una semana después de la administración intratecal, el paciente estaba muy cansado y sufría dolores en la parte inferior de la espalda y las piernas. El espasmo en sus brazos desapareció por completo después de 1 semana. Su bienestar general mejoró y volvió a iniciar el ejercicio.

Discusión y Conclusiones

Las células madre obtenidas a partir de la médula ósea obtenidas con las técnicas de extracción de acuerdo con el Ejemplo 1, se aplicaron para terapia a 16 pacientes, 11 con lesión de médula espinal (LME) y 5 con accidente vascular cerebral (AVC). La cirugía no tuvo complicaciones, a excepción de 1 paciente con LME, que tuvo una herida supurante durante 3 semanas. El tratamiento con células madre fue bien tolerado y no se observaron reacciones adversas a la terapia en ningún paciente.

Había una gran variabilidad entre los individuos de la cantidad de células recogidas. Había por lo menos un intervalo que era múltiplo de 5. Dado que el volumen de inyección es muy reducido en los pacientes con LME (aproximadamente 1,5 ml), las células se concentraron lo más posible. El número exacto de células que se iban a aplicar no se pudo calcular con precisión. Solo en un paciente no hubo ningún efecto observado. En todos los demás pacientes se observó al menos alguna mejora o una mejora marcada. La duración de la recuperación es también un factor importante. El paciente tratado durante más tiempo, tenía el mayor efecto. La recuperación parece, por tanto, que progresa lentamente durante meses. La duración de los efectos que se observaron era variable.

La terapia con células madre aplicada a pacientes con LME, AVC, EM y ELA parece segura y se tolera bien.

Ejemplo 4: Tratamiento de la diabetes y retorno de la función eréctil

En esta prueba, 6 pacientes diagnosticados con diabetes mellitus de tipo 2 y que padecían problemas eréctiles fueron tratados con células madre adultas autólogas, extraídas del hueso de la cadera. La Tabla 5a muestra una descripción de los pacientes.

Descripción de los pacientes	Pac. 1	Pac. 2	Pac. 3	Pac. 4	Pac. 5	Pac. 6	promedio
Duración de las dolencias (años)	7	6	1	1	0,3	1	2,7
Tratamiento previo	Sildenafil	Sildenafil	Ajustes del estilo de vida	Sildenafil	Sildenafil		
	Bandas elásticas						
	Inyecciones						
Otras enfermedades	Diabetes tipo 2	Diabetes tipo 2	Diabetes tipo 2	Diabetes tipo 2	Diabetes tipo 2	Diabetes tipo 2	
		Dislipidemia	Hipertensión arterial	Hipertensión arterial	Hipertensión arterial		
		Obesidad		Tratamiento previo de fimosis	Psoriasis		
		Enfermedad cardiovascular	Sin sensibilidad en el glande del pene	Depresión			
Nivel de discapacidad	Total	Total	Total	Total	Parcial	Total	
Edad	48	64	49	51	52	53	52,8

Tabla 5a: descripción del estado de los pacientes.

La muestra de médula ósea de aproximadamente 150 ml se obtuvo con anestesia local. La médula ósea se recogió a través de una aguja que se insertó en la cresta ilíaca (crista iliaca).

Las células madre se aislaron y se prepararon para la reimplantación, tal y como se ha descrito en los ejemplos 1 y 2.

- 5 Las células madre se reimplantaron inyectándolas en los cuerpos cavernosos. Los pacientes fueron tratados con antibióticos profilácticos.

El efecto del tratamiento se evaluó mediante una anamnesis subjetiva en varias fechas posteriores, así como mediante una evolución previa y una evaluación posterior del flujo sanguíneo en las arterias de los cuerpos cavernosos (arterias dorsales)

10 Resultados

Los 6 pacientes notificaron un aumento de la calidad, la duración y la tumescencia. Solo un paciente no notificó un efecto sobre que fuera capaz de tener una eyaculación. Este paciente sufría las secuelas posteriores de una operación de fimosis previa, que lo dejó sin sensibilidad en el glande del pene.

- 15 Como promedio, los pacientes experimentaron un cambio en su capacidad para mantener una erección después de 16 días. Estos datos coincidían con el periodo de tiempo hasta que los pacientes fueron capaces de tener una eyaculación.

La Tabla 5b muestra los resultados de este estudio.

Cambio en la duración de la erección						
	Pac. 1	Pac. 2	Pac. 3	Pac. 4	Pac. 5	Pac. 6
Día 0						
Día 8		X	X			X
Día 16				X		
Día 24	X					
Día 32					X	
Día 40						

Tabla 5b: cambios en la duración de la erección después del tratamiento

- 20 Los pacientes notificaron un aumento gradual de la calidad de sus erecciones. El hecho de que los 6 pacientes notificaran tener una mayor capacidad para mantener sus erecciones durante más tiempo, estaba respaldado con las mediciones Doppler del riego sanguíneo de los cuerpos cavernosos (que se muestran en la tabla 5c).

Velocidad sistólica de la arteria derecha del pene (cm/s)			
Paciente	Antes	Después	% de cambio
Pac. 1	15	19	26,6
Pac. 2	11	26	136
Pac. 3	23	30	30,4
Pac. 4	30	37	23,3
Pac. 5	15	20	33,3
Pac. 6	30	32	6,66
PMD	20,7	27,3	42,7

Velocidad sistólica de la arteria izquierda del pene (cm/s)			
Paciente	Antes	Después	% de cambio
Pac. 1	30	46	53
Pac. 2	11	28	154,54
Pac. 3	23	40	74
Pac. 4	30	37	23,3
Pac. 5	10	29	190
Pac. 6	30	32	6,66
PMD	22,3	35,3	83,6

Tabla 5c: cambios del riego sanguíneo en los cuerpos cavernosos después del tratamiento

No hubo notificaciones de eventos adversos durante el período de evaluación.

Ejemplo 5: Tratamiento de la artritis

5 En este estudio, 12 pacientes con osteoartritis fueron tratados con células madre autólogas extraídas del hueso de la cadera (cresta ilíaca). 9 mujeres y 3 varones fueron tratados y evaluados al cabo de 30, 60 y 90 días. La edad promedio de los pacientes era de 69,3 años (55-76). Padeían un promedio de 5,4 años con osteoartritis (0,2-10 años)

10 Los pacientes fueron evaluados por la cantidad de dolor experimentado, el uso de analgésicos, la estabilidad de las articulaciones implicadas en el trasplante y la estabilidad de la flexión y la extensión de las articulaciones involucradas.

La muestra de médula ósea de aproximadamente 150 ml se retiró bajo anestesia local. La médula ósea se recogió a través de una aguja que se había insertado en la cresta ilíaca (crista iliaca). Las células madre se aislaron y se prepararon para la reimplantación de acuerdo con el ejemplo 1 y 2.

15 Las células madre fueron reimplantadas inyectando 20 ml de la preparación de células madre directamente en la articulación de destino. Los pacientes fueron tratados con antibióticos profilácticos.

Después del tratamiento, 11 de 12 pacientes notificaron una mejoría en el dolor que experimentaban en las articulaciones tratadas. El 12º paciente notificó esto con el segundo resultado el día 60.

Los pacientes experimentaron un beneficio significativo con el tratamiento (véanse las tablas 6a, 6b y 6c).

Dolor	antes	después
Pac. 1	9	0
Pac. 2	9	3
Pac. 3	8	4
Pac. 4	7	4
Pac. 5	8	4
Pac. 6	9	2
Pac. 7	9	3
Pac. 8	9	3
Pac. 9	9	2

Dolor		
	antes	después
Pac. 10	9	3
Pac. 11	8	3
Pac. 12	8	4
Promedio	8,5	2,9
Desviación típica	0,67	1,16

Tabla 6a, medición del dolor antes y después del tratamiento.

Esto se corroboró por un cambio significativo en la flexibilidad de las articulaciones tratadas (tabla 6b).

Flexión/extensión		
	antes	después
Pac. 1	2	8
Pac. 2	2	6
Pac. 3	4	6
Pac. 4	3	7
Pac. 5	2	6
Pac. 6	2	6
Pac. 7	2	6
Pac. 8	2	6
Pac. 9	4	7
Pac. 10	4	9
Pac. 11	2	7
Pac. 12	4	6
Promedio	2,75	6,67
Desviación típica	0,97	0,98

Tabla 6b, medición de la flexibilidad de las articulaciones antes y después del tratamiento.

La estabilidad de las articulaciones tratadas se incrementó después del tratamiento (tabla 6c).

Estabilidad		
	antes	después
Pac. 1	4	7
Pac. 2	4	7
Pac. 3	4	6
Pac. 4	3	6
Pac. 5	4	7
Pac. 6	3	8
Pac. 7	4	6
Pac. 8	6	9

Estabilidad		
	antes	después
Pac. 9	5	9
Pac. 10	2	7
Pac. 11	5	7
Pac. 12	4,0	7,2
Desviación típica	1,10	1,08

Tabla 6c, medición de la estabilidad de las articulaciones antes y después del tratamiento.

Cinco pacientes notificaron eventos adversos. Los 5 tenían dolor en el área del sitio de recogida de la médula ósea, 2 tenían dolor en las articulaciones tratadas y 1 experimentó una reacción de hipersensibilidad al vendaje usado y experimentó un dolor inexplicable en las rodillas y los dedos de las manos.

5

Ejemplo 6: Tratamiento de la diabetes mellitus de tipo 2

Se incluyeron cinco pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

Su edad oscilaba entre 49-77 años.

Las células madre se extrajeron de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo I y II.

10 Se infundieron 25 ml de extracto de médula ósea mediante angiografía través de la arteria esplénica y la arteria hepática.

Se obtuvieron los siguientes resultados para cada uno de los 5 pacientes.

Paciente 1: reducción del uso de insulina en un 60 por ciento después de 3 meses

Paciente 2: eliminación de la insulina después de 2 meses

15 Paciente 3: reducción del uso de insulina en un 50 por ciento

Paciente 4: reducción de los antidiabéticos orales en un 80 por ciento después de 2 meses

Paciente 5: reducción del uso de insulina en un 60 por ciento después de 2 meses

La glucosa en sangre era normal después de las reducciones de la dosis.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la separación de células de la médula ósea que comprende las etapas de:
 - a) centrifugar la médula ósea;
 - 5 b) recoger la capa leucocitaria formada después de la etapa a) con un volumen de glóbulos rojos por debajo de la capa leucocitaria, el volumen de glóbulos rojos recogido es 1 a 20 veces, preferentemente 1 a 10 veces, más preferentemente 2 a 5 veces e incluso más preferentemente 5 veces el de la capa leucocitaria;
 - c) centrifugar la capa leucocitaria con el volumen de glóbulos rojos por debajo de la capa leucocitaria,
10 obtenida en la etapa b); y
 - d) recoger la capa leucocitaria formada después de la etapa c).
2. El procedimiento para la separación de células de la médula ósea según la reivindicación 1, en el que las etapas a) y c), se llevan a cabo a 1500 G.
3. El procedimiento para la separación de células de la médula ósea según la reivindicación 1 o 2,
15 en el que las etapas a) y c) se llevan a cabo a 18°C.
4. El procedimiento para la separación de células de la médula ósea según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa a) se lleva a cabo durante al menos aproximadamente 20 minutos y la etapa c) se lleva a cabo durante al menos aproximadamente 10 minutos, preferiblemente hasta 20 minutos y más preferiblemente durante al menos aproximadamente 20 minutos.
- 20 5. El procedimiento para la separación de células de la médula ósea según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende etapas adicionales entre las etapas b) y c), que comprenden las etapas de:
 - b1) recoger un volumen de glóbulos rojos por debajo del volumen recogido en la etapa b), en el que el
25 volumen de glóbulos rojos recogido está entre 1 a 20 veces, preferiblemente 1 a 10 veces, más preferiblemente 2 a 5 veces e incluso más preferiblemente 5 veces, el de la capa leucocitaria;
 - c1) centrifugar el volumen de glóbulos rojos recogido en la etapa b1);
 - d1) recoger la capa leucocitaria formada después de la etapa c1); y
 - e1) mezclar la capa leucocitaria recogida después de la etapa d1) con la capa leucocitaria recogida después de la etapa c).
- 30 6. La capa leucocitaria obtenida al recoger la capa leucocitaria formada después de la etapa c) del procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
7. La capa leucocitaria según la reivindicación 6, en la que las células contenidas en la capa leucocitaria expresan CD 45 o CD 34.
8. La capa leucocitaria según la reivindicación 7, en la que las células son células madre.
- 35 9. La capa leucocitaria según las reivindicaciones 7 u 8, en la que las células expresan CD 45 o CD 34.
10. La capa leucocitaria según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la que las células son de la estirpe hematopoyética o mesenquimatosa.
11. La capa leucocitaria según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en la que la
40 concentración de las células es de 20-200 millones por 2 a 10 ml, y en donde 2-20 millones de esas 20-200 millones de células expresan CD 34.
12. La capa leucocitaria según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, para su uso en terapia.
13. La capa leucocitaria según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, para su uso en la regeneración de tejidos.

14. La capa leucocitaria según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, para su uso en el tratamiento terapéutico de una enfermedad o una lesión del sistema nervioso central.
15. La capa leucocitaria según la reivindicación 14, para el uso según la reivindicación 14, en donde la enfermedad o la lesión se selecciona entre el grupo que consiste en lesión de la médula espinal, esclerosis múltiple, accidente vascular cerebral y esclerosis lateral amiotrófica.
16. La capa leucocitaria según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, para su uso en la curación de una herida de la piel.
17. La capa leucocitaria según la reivindicación 16, en donde la herida de la piel se selecciona entre el grupo que consiste en heridas de la piel a consecuencia de diabetes, úlceras, intervención quirúrgica, cirugía estética y quemaduras.
18. La capa leucocitaria según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, para su uso para favorecer la angiogénesis.
19. La capa leucocitaria según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, para su uso en el tratamiento de una disfunción eréctil.
20. La capa leucocitaria según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, para su uso en el tratamiento de la diabetes de tipo 1 o de tipo 2.
21. La capa leucocitaria según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, para su uso en el tratamiento de la artritis.
22. La capa leucocitaria según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, para su uso en el tratamiento de una lesión hepática.
23. La capa leucocitaria según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, para su uso en el tratamiento de la incontinencia urinaria.
24. La capa leucocitaria según las reivindicaciones 12 a 23, en donde la capa leucocitaria es autóloga.

Figuras





