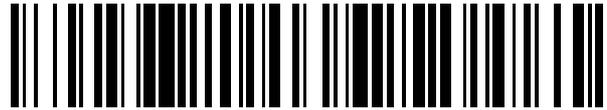


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 734**

51 Int. Cl.:

A61L 27/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2009 E 09801948 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2379122**

54 Título: **Preparación rápida y uso de tejidos y estructuras obtenidas por ingeniería tisular como implantes individuales**

30 Prioridad:

24.12.2008 EP 08022449

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

28.09.2015

73 Titular/es:

**BADER, AUGUSTINUS (100.0%)
Krankenhausstrasse 7
04668 Parthenstein / OT Klinga, DE**

72 Inventor/es:

BADER, AUGUSTINUS

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 546 734 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

Preparación rápida y uso de tejidos y estructuras obtenidas por ingeniería tisular como implantes individuales.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos, aparatos técnicos y composiciones para conseguir procesamiento a corto plazo para la fabricación de un injerto o trasplante "inteligente" en forma de una matriz de soporte que puede usarse para tratar o para curar lesiones y traumatismos de una gran diversidad de tejidos y órganos en una ubicación central o periférica del cuerpo humano o animal. La invención se refiere específicamente a regeneración tisular por medio de células madre y diferentes factores específicos que promueven la reparación tisular y orgánica que activan dichas células madre endógenas o exógenas para diferenciarse en células de tejido específico, reconstituyendo de este modo el microentorno original de la célula dañada por la lesión. La invención también se refiere a una escala temporal de procesamiento que es tan corta que puede realizarse en cuestión de minutos incluyendo la preparación, la integración, la activación y la determinación de células madre. Dependiendo del tamaño del defecto, las células madre se añadirán para defectos grandes pero también se reclutarán suficientemente a nivel local en defectos más pequeños. Una combinación de ambas opciones de reclutamiento de células es posible para garantizar la regeneración continuada durante un periodo de varias semanas dentro del cuerpo, hasta que se haya producido la completa restauración de la morfología y la función tisular.

En particular, la presente invención se refiere a un método novedoso capaz de iniciar un excelente proceso de preparación de células madre, que es tan corto que se aplica a un marco temporal de unos segundos a varios minutos.

El método se basa en el concepto de desencadenamiento extracorpóreo de la formación de un nicho que permite que las células madre sean guiadas para remodelación *ex vivo* / *in vivo* e *in situ* sin necesidad de ningún proceso de expansión o cultivo prolongado *in vitro*. Este novedoso método permite generar plantillas que se remodelarán espontáneamente en el tejido diana escogido una vez completados los procesos extracorpóreos. La invención está dirigida a casi todos los tipos de tejido humano o animal.

La invención también se refiere finalmente a composiciones y formulaciones o matrices de soporte revestidas con dichas composiciones que comprenden (i) preparaciones de células madre, (ii) eritropoyetina (EPO) y (iii) factores que promueven la diferenciación de células madre, (iv) factores que incrementan la disponibilidad de células madre, y opcionalmente (v) factores que están habitualmente presentes en el entorno de un traumatismo local.

La invención puede usarse para la preparación rápida y segura de injertos, trasplantes o implantes individuales obtenidos por ingeniería de tejidos, preferentemente en forma de una matriz de soporte para regeneración tisular rápida, de alta calidad y económica.

40 **Antecedentes de la invención**

La ingeniería tisular de implantes es un proceso largo y arriesgado con respecto al mantenimiento de la esterilidad, que implica la obtención de células del donante, la transferencia de las células a un laboratorio y la manipulación de dichas células para iniciar su expansión y/o diferenciación. Después del periodo de expansión, las células se retiran frecuentemente de un sustrato de fijación temporal mediante, a saber, tripsinización, y seguidamente se transfieren a una matriz de soporte y se cultivan de nuevo sobre esta matriz de soporte. Este proceso, por lo tanto, a menudo requiere no solamente días sino semanas para ser eficaz.

La rápida y correcta fabricación de complejos injertos en 3D actualmente no es conocida en la técnica. Es fundamental y, de hecho, contradictoria con la enseñanza actual, que se centra en tecnologías celulares para expandir y diferenciar células para desencadenar la determinación *in vitro* y sembrándolas seguidamente sobre matrices de soporte o cultivarlas directamente sobre estas matrices de soporte. Se espera que esas células se diferencien *in vitro*. Este proceso a menudo requiere de media al menos 1-2 semanas o incluso más.

Una segunda línea de enseñanza usa métodos de inyección para células madre indiferenciadas de médula ósea o sangre, o médula ósea sin procesar como una forma de terapia celular de forma intraoperatoria directamente en un tejido que incluye, por ejemplo, el músculo cardíaco. Para la reparación de lesión medular, se cultivaron células para expandirse o a partir de fuentes específicas tales como la nariz o de origen embrionario. Esto último presenta el riesgo de entrar en transformación o formación de un tumor. Las células derivadas de la nariz representan un entorno bastante infeccioso para la recogida y no fueron clínicamente convincentes como solución genérica. Las células procedentes de médula ósea están siendo investigadas.

Una alternativa adicional es la regeneración tisular *de novo*. Se esperaba que el entorno local ayudara finalmente a diferenciar estas células. Examinando el entorno receptor más estrechamente, se ha descubierto que las células no se diferencian en, por ejemplo, células de músculo cardíaco después de inyección en el corazón. En estos casos, no se ha informado en absoluto sobre la formación de células musculares. En su lugar, se postuló un efecto bastante

positivo de la actividad secretora de las células madre trasplantadas para el apoyo de la recuperación. Los efectos en conjunto de dichos estudios fueron solamente una mejora de la función cardiaca del 4% . Esto significa que esta hipótesis del microentorno no consigue el objetivo de la formación tisular *de novo*, sino que tiene solamente un papel adyuvante.

5 En otro estudio, MSC expandidas se inyectaron después de la expansión *in vitro* en una matriz de soporte valvular acelularizada. Durante el cultivo *in vitro*, las células se sometieron a un proceso de selección que consiguió seleccionar células que tienen un prominente carácter de célula madre (replicación más intensa) y que pueden causar una inflamación reducida *in vitro*.

10 Hasta la fecha no está claro qué papel pueden desempeñar las citoquinas en este contexto. Sin embargo, es bien conocido de la técnica anterior que pueden usarse moléculas *in vitro* para controlar la pluripotencia y para inducir la diferenciación y determinación a un tejido específico.

15 La cicatrización de heridas está estrechamente vinculada a las respuestas inflamatorias. Después de la implantación quirúrgica de una tráquea artificial, la velocidad y calidad de cicatrización local, la supervivencia e integración es crucial para la asimilación del injerto y el éxito a largo plazo del implante.

20 Durante la inflamación, son liberadas citoquinas tales como IL-6, IL-1 y TNF que sostienen la respuesta inflamatoria. La inflamación, no obstante, puede ser una espada de doble filo, si la inflamación no finaliza a su debido tiempo debido a la remodelación insuficiente de la matriz de soporte del implante.

25 La remodelación de la matriz de soporte en ingeniería tisular se concibió como un proceso bastante desconocido y los mecanismos de activación eran desconocidos o clínicamente no viables. Convencionalmente, las células habrían sido sembradas en el material escogido y la integración en este material era un proceso que se atribuyó a un tiempo de expansión célula de forma ideal y penetración migratoria.

30 Fundamentalmente, existe un lado positivo de la inflamación que es un beneficio adicional para cicatrización que es necesario tener en consideración para la ingeniería de implantes biológicos.

La técnica anterior no proporciona la información adecuada sobre el control del microentorno después del trasplante del injerto para una remodelación sostenible, sobre la diferenciación de las células indiferenciadas después del trasplante, y, ni sobre las células madre que detectan las zonas de herida ni tampoco acerca de la diferenciación de las células trasplantadas después de expandirse *in vitro* para conseguir una auténtica curación sin cicatrices.

35 Dicha pre-expansión ha demostrado ser capaz de activar oncogenes. Esto es causado por la exposición a un entorno artificial y posible también a la repetición de ciclos de proliferación que no sustentan mecanismos de control normales de reparación y remodelación de heridas. Esta situación artificial, por supuesto, no es coherente con la capacidad del cuerpo para la regeneración después de heridas y lesiones. La activación de las células madre en el hombre y la determinación de células madre requieren un completo control de la proliferación, mientras que al mismo tiempo, previenen la activación de oncogenes.

40 Se considera que estos requisitos son obligatorios y su omisión en la enseñanza convencional puede causar los inconvenientes más graves y perjudiciales de la tecnología actual de procesos celulares *in vitro* que, inevitablemente, no solamente son bastante complicados sino también arriesgados por estas razones.

45 La otra alternativa representa una simple inyección de células madre que por lo tanto, no es una solución dado que el punto de recepción de las células es altamente variable y no totalmente controlable desde el lado de la célula y el trasplantador de la matriz de soporte. En todos los casos descritos hasta la fecha, las células madre, mirado con detenimiento, no estaban consiguiendo completamente su objetivo original de dar como resultado una formación tisular *de novo* apropiada.

50 Por consiguiente, existe una necesidad de controlar la pluripotencia de las células madre después y en el momento del trasplante. La técnica anterior se centraba en controles de pluripotencia antes del trasplante. También existe una necesidad de evitar procesos de cultivo celular que puedan intentar controlar la diferenciación celular pero muestren condiciones secundarias artificiales que son perjudiciales para las células y además no son económicas.

55 Llevar a cabo estos métodos de acuerdo con la técnica anterior, es un gran problema en lo relativo a la calidad y funcionalidad del trasplante. Por consiguiente, existe una demanda de un método para suprimir todas estas limitaciones. La presente invención se preparó para superar los problemas descritos, y para proporcionar un método práctico para preparar rápidamente mediante ingeniería tejido de las vías respiratorias y válvulas, y en general, todos los tejidos del cuerpo animal o humano.

60

Resumen de la invención

5 Para resolver los problemas del cultivo celular o trasplante “a ciegas” de células, la presente invención proporciona un nuevo método y enfoque para controlar la diferenciación de las células madre, un proceso rápido preparatorio de implantes *ex vivo*, e implantación de estos implantes pretratados *in vivo* por un cirujano al mismo tiempo.

Todo esto puede conseguirse seleccionando una diana específica: la célula madre que es tratada específicamente de acuerdo con la invención, tal como se define mediante las reivindicaciones.

10 Se descubrió que las células madre endógenas o exógenas, o progenitoras de las mismas pueden activarse en tejidos lesionados y matrices de soporte artificiales o naturales exponiéndolas a las condiciones de un microentorno natural. Se descubrió que este microentorno resulta dañado cuando se producen lesiones más grandes. En dicha situación, las células y factores necesarios faltan en el entorno local del tejido dañado o han perdido su actividad o eficacia. De acuerdo con la invención, este microentorno puede conservarse si el tejido a regenerar o reparar, o las
 15 respectivas matrices de soporte o matrices tisulares son expuestas a las células y factores de apoyo de la reparación tisular, necesarios. En esta situación, factores endógenos, como citoquinas u otros factores inflamatorios que son habitualmente secretados al interior de la herida, también pueden ayudar y promover este proceso de reparación tisular. De acuerdo con el descubrimiento de las células madre de la invención, preferentemente las células madre positivas para CD90 desempeñan en este caso un papel importante. Sin embargo, es necesario que
 20 estas células madre sean activadas respecto a su capacidad de diferenciación específica para generar nuevo tejido específico sin la aparición de cicatrices u otros efectos no deseados.

De acuerdo con la invención, la activación de células madre *in situ* puede realizarse con varios factores diferentes que apoyan la consecución y la conservación del microentorno óptimo del tejido lesionado promoviendo de este
 25 modo la diferenciación y el crecimiento mejorados de tejido específico localmente regenerado.

Un **primer grupo** de factores de apoyo, tal como se definen mediante la presente invención, son células madre o células progenitoras de las mismas, que tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo de células de tejido, incluyendo células de tejido neuronal y linfático. Estos factores se denominan “**factores celulares**”. Estas células
 30 madre o células progenitoras de las mismas, de acuerdo con la invención, pueden ser asistidas por monocitos de sangre periférica (PBMC), por células positivas para CD90 o por células positivas para CD45.

Un **segundo grupo** de factores de apoyo que actúan de esta manera son factores que estimulan células madre y aceleran la remodelación de células de tejido. Estos factores se denominan “**factores potenciadores**”. Estos factores no son factores de crecimiento tal como esto es entendido por un experto en la materia. El factor
 35 potenciador de la invención es eritropoyetina (EPO).

Un **tercer grupo** de factores de apoyo de acuerdo con la invención se denominan “factores de determinación” que apoyan la diferenciación de células madre. El factor de determinación preferido para diferenciación de cartílago de la invención es el uso combinado de TGFβ.
 40

Un **cuarto grupo** de factores de apoyo de acuerdo con la invención incrementan la disponibilidad de células madre, lo que significa un incremento del número de células madre en el entorno tanto periférico como local de una lesión tisular, y se denominan “**factores de reclutamiento**”. El factor de reclutamiento preferido de la invención es G-CSF.
 45

Un **quinto grupo** de factores de apoyo de acuerdo con la invención se denominan “factores permisivos”. Estos factores, tales como citoquinas, habitualmente ya están presentes en tejido con traumatismo local o son secretados de forma endógena durante la inflamación acompañada por una lesión tisular local.

50 De acuerdo con el descubrimiento de la invención, los factores del primer, segundo, tercer y cuarto grupo son obligatorios de acuerdo con.

Los factores permisivos pueden aplicarse opcionalmente.

55 De acuerdo con la invención, el trasplante de células madre o la inducción de la activación de células madre endógenas está acompañada por una exposición a un conjunto de factores. Ninguno de esos factores en solitario permite que se complete el círculo de acontecimientos que causa la cicatrización y la remodelación sin cicatrices. Sin embargo, son adiciones importantes para controlar la pluripotencia de las células que actúan en una acción concertada entre sí.

60 La disponibilidad de esos factores puede realizarse en al menos tres variantes: A) adición durante la fase de aplicación celular o activación celular (por ejemplo como liofilizado para evitar la dilución del concentrado de médula ósea con células madre) B) Adición a la matriz de soporte durante la fase de producción. Una manera preferida es la degradación durante la producción de la matriz de soporte y la integración en el material. Esto puede hacerse, por ejemplo, mediante adición a matrices de soporte biológicas durante un procedimiento de liofilización de los factores
 65 junto con la matriz de soporte (por ejemplo colágeno, quitosano, sangre y componentes de la sangre) o durante un

proceso de electrohilado, siendo la ventaja una formación y combinación intrincadas y una manera de uso no dañina, buena capacidad de almacenamiento) C) uso de un sustituto idealmente autólogo. Muchos de estos factores, especialmente los factores de determinación, se producen en el tejido sano. Se prefiere una técnica de triturar pequeñas biopsias y distribuirlas en el revestimiento de las células madre en los concentrados de células madre. Una combinación con una concentración de plaquetas, los resultados de la trituración (por ejemplo fragmentos de cartílago, menisco, tendones, piel, corazón, tejido de esfínter, tejido valvular o aórtico y, de hecho, cualquier otro tejido) representa un importante acontecimiento desencadenante y es una valiosa alternativa y/o una adición al uso aislado de factores individuales. No todos ellos están disponibles clínicamente en este momento y necesitan más desarrollo para aplicabilidad clínica.

En un primer aspecto de la invención, se usa una matriz de soporte natural o sintética que imita el tejido específico lesionado. Este material de la matriz de soporte sirve como una copia que cataliza el proceso que finalmente da como resultado que se genere la matriz del tejido. En una realización específica de la invención, este material de la matriz de soporte contiene tejido específico individual para ser generado tomado a partir de una biopsia del paciente que padece una lesión o un defecto tisular. La matriz de soporte está revestida, o parcial o selectivamente cargada, con los factores especificados anteriormente (incluyendo "factores celulares") *in vitro* o *ex vivo*. En una realización específica de la invención, el tratamiento de la matriz de soporte con factores, y opcionalmente el tejido específico individual del paciente, se produce de forma intraoperatoria, esto significa en conjunción temporal con la cirugía del paciente. Preferentemente, los factores y/o las matrices de soporte son pretratados de acuerdo con la invención antes de combinarlos.

En un segundo aspecto de la invención, los factores, tal como se han especificado anteriormente, son llevados directamente al tejido lesionado o defectuoso en el paciente sin una matriz de soporte artificial o natural independiente pretratada con la combinación específica de factores. En este caso, los factores se formulan preferentemente como una composición de gel o pegamento que rellena el defecto o herida del tejido para sellarla.

La principal ventaja de este enfoque es que la necesidad de expansión y pre-diferenciación de las células madre antes del trasplante se suprime completamente. Además, se consigue la mejor calidad del implante, según lo medido mediante histología y función después de la remodelación. Una ventaja adicional es el modo de acción específico de sitio de los factores de determinación, que evita efectos secundarios sistémicos. De acuerdo con esta enseñanza, es la presencia local de factores permisivos la que, junto con los factores potenciadores administrados de forma exógena, permiten que se realice una preparación del injerto extremadamente rápida. Un resultado adicional de la invención es que la matriz de soporte usada es remodelada más rápida y un 40-50% de forma más eficiente respecto a un control que se prepara de manera convencional.

En una realización preferible del método, se obtienen células madre durante la misma sesión u operación que se usa para la implantación.

La invención es tan fundamental que permite superar barreras evolutivas con respecto a velocidad, calidad y tamaño de la reparación de los defectos y la sustitución del tejido. Permite la formación y reparación de neot Tejido en situaciones que no pueden ser reparadas por el cuerpo, y permite que se consigan fenómenos que no se producen normalmente en el cuerpo humano o animal. La invención fundamentalmente, por lo tanto, abre todas las aplicaciones necesarias para todos los tejidos humanos y animales de todos los tipos, dado que se centra en una tecnología de plataforma básica que funciona con todos los tejidos induciendo condiciones favorables de cicatrización de heridas en estados de enfermedad que, en caso contrario, no serían reparados normal o artificialmente.

Los campos de aplicación incluyen todos los estados de enfermedad con isquemia, inflamación y defectos de un tamaño tal que no se pueda cicatrizar espontáneamente o, si se produce un cierre, éste daría como resultado un tejido cicatricial. Un tejido cicatricial es una indicación de cicatrización de defectos de baja calidad que no puede reanudar la función tisular normal u original. Esto es importante para cualquier tejido en el cuerpo.

La invención puede usarse para tratar, por ejemplo, lesión de la médula espinal o para interponerse para curar un tejido nervioso desconectado, lesionado o traumatizado en una ubicación central o periférica del cuerpo humano o animal. La invención se refiere a la preparación de un implante autólogo, señalización de células madre para inducir remodelación tisular de un injerto específico, aunque sin limitarse a estos tejidos, dado que también puede aplicarse a tejido neuronal adicional (nervios, médula espinal, apoplejía cerebral, traumatismo craneoencefálico) piel, ojo, córnea, músculo (corazón, tejido de esfínter, músculo esquelético, músculo de tejido vascular), aparatos vasculares (venas, arterias, capilares), piel, tejido linfático, vejiga, uretra, pene, ovarios, a una tráquea, una válvula cardíaca, un tejido urológico, un sustituto óseo o de cartílago o todos los demás tejidos del cuerpo humano. La razón para esta aplicabilidad es que funciona como una acción concertada de manipulación de células madre que permite conseguir reparación como una interacción coordinada de células, materiales y señalización.

El siguiente protocolo genérico forma, de acuerdo con la invención, la base para conseguir una completa remodelación usando una matriz de soporte. Este protocolo no es limitante de la invención: las etapas individuales puede repetirse, enmendarse, abandonarse, añadirse, sustituirse o llevarse a cabo en una secuencia diferente si

fuera necesario. La secuencia de las etapas en el método de la presente invención en combinación con el aparato (unidad móvil de producción autónoma, UM):

- 5 (i) preparación de la matriz de soporte de manera estéril. El material sirve como material para iniciar un proceso de copia que finalmente da como resultado la matriz del tejido deseado a generar. La matriz de soporte puede ser sintética, tal como una malla de colágeno o de origen natural (por ejemplo una válvula de cerdo);
- 10 (ii) recogida y preparación estéril de las células madre adultas/mesenquimales (“factores celulares”) a partir de fuentes adecuadas, tales como sangre periférica o médula ósea, mediante concentración o preparación de la capa leucocitaria;
- 15 (iii) recogida estéril de monocitos procedentes de sangre periférica (PBMC) mediante concentración o preparación de la capa leucocitaria;
- 20 (iv) incubación del concentrado de células madre con un factor potenciador de acuerdo con la invención, que es EPO, obteniendo de este modo células madre pretratadas.
- (v) incubación de la matriz de soporte natural o artificial con un factor potenciador de acuerdo con la invención, que es la EPO;
- 25 (vi) integración o inyección de las células madre pre-tratadas u opcionalmente no tratadas, recogidas en/sobre la matriz de soporte pre-tratada u opcionalmente no tratada, *in vitro/ex vivo* en una forma difusa o estructurada dependiendo de la estructura a generar deseada (por ejemplo cartílago, hueso, válvula u otros). En sistemas tubulares, la inyección de las células madre pre-tratadas se produce en/sobre las zonas por debajo de la superficial;
- 30 (vii) integración o inyección (tal como se especifica en (vi)) adicionalmente de células de tejido (por ejemplo células epiteliales) obtenidas mediante biopsia individual del tejido específico del paciente lesionado o defectuoso a regenerar, en/sobre dicha matriz de soporte;
- 35 (viii) incubación de dichas matrices de soporte pre-tratadas u opcionalmente no tratadas, con un factor potenciador, EPO) y un factor de determinación (preferentemente TGF β) y un factor de reclutamiento (preferentemente G-CSF), o, como alternativa, solamente con un factor de determinación y un factor de reclutamiento, opcionalmente por medio de una composición/formulación similar a un gel o similar a un pegamento que comprende dichos factores;
- 40 (ix) opcionalmente, incubación, tal como se especifica en (viii), de manera adicional, con una preparación de PBMC;
- 45 (x) preparación de fragmentos específicos de tejido (por ejemplo cartílago triturado del recipiente, epitelio u otros para el co-revestimiento del implante).
- (xi) uso de un biorreactor o dispositivo cerrado para inoculación y posicionamiento o mezcla de células con la matriz de soporte del implante (por ejemplo hueso, válvula, malla de colágeno) para requisitos de GMP y automatización, si fuera necesario.
- 50 (xii) proporcionar la matriz de soporte preparada de este modo al cirujano para la implantación en la ubicación del tejido lesionado o defectuoso del paciente.
- (xiii) revestimiento intra-operatorio e *in situ* de implantes desde los sitios que son accesibles para reducir la pérdida de células. Se aplican geles de células por vía tópica después de la inducción de la coagulación en el concentrado de médula ósea con células madre. Los geles de células contienen uno o más factores potenciadores, de determinación y de reclutamiento.
- 55 Las etapas (i) - (ix) se llevan a cabo, de acuerdo con la invención, en una cabina de flujo de aire laminar, biorreactor o dispositivo cerrado respectivamente, preferentemente en conjunción temporal con cirugía en el plazo de 10-30 minutos sin replicación celular o necesidades de transporte provisionales (todas realizadas en el mismo quirófano).
- 60 Después de la implantación, se prefiere, de acuerdo con la enseñanza de esta invención, tratar la matriz de soporte implantada con composiciones similares a gel o similares a pegamento que comprenden preferentemente todos los factores: factores celulares (células madre), factores de determinación, factores potenciadores, factores de reclutamiento y opcionalmente factores permisivos, tal como se definen de acuerdo con la invención. Las composiciones se aplican *in situ* encima de todos los sitios que son accesibles para reducir la pérdida de células.
- 65 El método, tal como se ha descrito anteriormente, crea una cascada regenerativa que permite la remodelación de la matriz *in situ* o matrices de soporte coadministradas. Las inyecciones/incorporaciones llevadas a cabo con dicha

composición de gel o pegamento que comprende células y factores, tal como se ha descrito, crea un efecto de liberación lenta del depósito, que es eficaz durante el proceso de cicatrización *in vivo*.

5 Las inyecciones (por ejemplo, también sin coadministración de células en las articulaciones) crean una cascada regenerativa que permite la remodelación de la matriz *in situ* o de las matrices de soporte coadministradas.

10 En un aspecto adicional y completamente nuevo de la invención, un método que respeta completamente prerequisites sociológicos y regulatorios proporcionando una tecnología que acelera drásticamente la velocidad de preparación del implante, destinado a la implantación quirúrgica en el paciente. Este concepto sigue los principios biónicos del cuerpo humano (Figura 1). La fabricación del injerto no debe requerir 2 - 3 semanas de acuerdo con la enseñanza de la técnica anterior, pero puede llevarse a cabo en el plazo desde minutos a menos de una hora para preparar diferentes tipos de tejido deseado. Todo el proceso se realiza idealmente de forma intraoperatoria y, por lo tanto, elimina la necesidad de enviar las células respectivas a laboratorios. Esto resuelve la limitación de la logística, anestesia innecesaria y costes, incluyendo el tiempo que puede ahorrarse mediante este proceso de ingeniería de implante intraoperatorio. En las manos del doctor que trata al paciente y que no abandona el quirófano, el proceso cumple completamente los actuales requisitos regulatorios y de calidad. Por lo tanto, el implante no es el producto particular que es manejado por separado, sino el proceso para preparar el implante como parte de la terapia. Ésta es la metodología más segura que existe con respecto a evitar transformación y riesgos infecciosos, proporcionando de este modo una mayor calidad. La matriz de soporte a usar de acuerdo con la invención es capaz de reaccionar para remodelar los estímulos y, preferentemente, se prepara usando dispositivos de una vía completamente cerrados que cumplen GMP, tal como se conoce y se usa principalmente en la técnica. Esta tecnología está caracterizada anteriormente por el hecho de que la replicación celular *in vitro* se evita completamente usando y aplicando los factores especificados anteriormente, que son: factores celulares ("las células"), factores potenciadores (EPO), factores de determinación (TGF β 3, VEGF, hormonas o vitaminas), factores de reclutamiento (G-CSF, GM-CSF) y opcionalmente factores permisivos (preferentemente moléculas biológicas de origen natural, tales como citoquinas de traumatismo). El resultado de este enfoque es la remodelación rápida, eficiente y perfecta de tejido defectuoso o lesionado, es decir el 40 - 50% más rápido respecto a enfoques respectivos que no usan dichos factores de apoyo estimulantes. El nuevo concepto de tecnología biónica, tal como se presenta en el presente documento, se beneficia de los mecanismos innatos de reparación de heridas específicas usándolos como acontecimientos co-desencadenantes, y la capacidad del cuerpo para formular una respuesta específica de sitio, independiente del tipo y la ubicación de un tejido.

35 Una de las ventajas de la invención es que la aplicación de EPO a la matriz de soporte da como resultado una expansión más rápida de las células progenitoras endoteliales y de músculo liso desde las áreas circundantes para poblar la matriz de soporte. La técnica empleada, como alternativa, se refiere a entremezclar una estructura de células diana normales o fragmentos de tejido en la preparación de células madre para intensificar la señalización paracrina.

40 También es asunto de la presente invención un método para cicatrizar tejido lesionado, traumatizado o defectuoso en un paciente, consiguiendo de este modo *restitutio ad integrum*, en el que las células sanas del tejido a tratar sirven como células de copia, comprendiendo el método las etapas:

- 45 (i) reclutar células madre autólogas obtenidas del paciente a tratar mediante extracción de médula ósea, sangre u otros tejidos;
- (ii) reclutar células sanas circundantes o supervivientes como células codiferenciadoras obtenidas del tejido defectuoso, traumatizado o lesionado o el entorno del mismo,
- (iii) aplicar al paciente mediante administración intravenosa, subcutánea o tópica una composición o formulación que comprende (A) las células madre de la etapa (i), (B) las células de tejido sano de la etapa (ii) y (C) una preparación que comprende (a) al menos un factor que estimula células madre y acelera la remodelación de células de tejido, (b) al menos un factor que es capaz de controlar y dirigir la diferenciación de dichas células madre, y (c) al menos un factor que incrementa el número de células madre tanto *in situ* como en la circulación periférica.

55 **Descripción detallada de la invención:**

(A) Definiciones:

60 La expresión "**factores de apoyo**", tal como se usa en esta invención, comprende un grupo de factores que constan de: "factores celulares", "factores potenciadores", "factores de determinación", "factores de reclutamiento" y "factores permisivos".

65 La expresión "**factores celulares**" se refiere, en particular, no realmente a factores como factores de crecimiento y similares, sino a células específicas, que desencadenan o han conservado su capacidad de diferenciarse en células de tejido de fenotipo específico y con función biológica específica. Los factores celulares o células de acuerdo con la invención son células madre adultas, tales como células madre mesenquimales, por ejemplo, obtenidas de sangre

periférica o células de médula ósea. Las células madre están presentes en todos los tejidos que son positivos para CD90. Estas células pueden aislarse mediante digestión con colagenasa desde tejido cutáneo, hepático y cardiaco entre la mayoría de los demás tejidos. Las células no solamente expresan CD90 sino también otros marcadores que se encuentran típicamente en células de médula ósea.

5 Las células, sin embargo, no solamente expresan el receptor para eritropoyetina sino también para su subunidad beta-cR. Beta-cR es una diana para la EPO y su actividad de remodelación de la matriz extracelular en células CD 90+. Esto demuestra que existe en tejidos tales como la piel, el bazo y el riñón una coexpresión de la beta-cR en paralelo a la expresión del receptor de la hormona del crecimiento GHR. La expresión de la beta-cR se ha descubierto, de hecho, en todos los tejidos junto con la GHR. Por lo tanto, todas las células que expresan la beta-cR son “factores celulares” adecuados de acuerdo con la invención. La expresión de la beta-cR se ha descubierto, de hecho, en todos los tejidos junto con la GHR. En la Figura 1, la expresión de la beta-cR y de la hormona del crecimiento se muestra en la piel, en el bazo y en el riñón de manera ejemplar, dado que no está limitada a estos tejidos sino que se coexpresa genéricamente. La expresión “injerto inteligente” o “matriz de soporte inteligente” significa una plantilla tisular altamente específica que detecta un entorno de la herida en la que está implantada y reacciona en consecuencia usando este entorno para conseguir su propia remodelación a un tejido diana específico mediante activación de células madre que conduce a un resultado específico tisular sin cicatrices, de alta calidad.

20 La expresión “**factores potenciadores**”, tal como se usa en esta invención, describe respectivamente moléculas biológicas, preferentemente naturales, que estimulan los receptores mencionados anteriormente en células positivas para CD90, preferentemente las células madre. El objetivo de estos “factores potenciadores” es intensificar la remodelación, para reducir la inflamación y para activar las células madre para propagar y para proteger contra isquemia y otros daños tisulares. El grupo de factores incluye, además, eritropoyetina, trombopoyetina y HGH. Esto incluye también derivados y secuencias peptídicas de eritropoyetina que, por ejemplo, estimulan la subunidad beta-CR del receptor de eritropoyetina, el receptor de TPO o el receptor de la hormona del crecimiento. Las citoquinas inflamatorias muestran un efecto estimulador sobre las células madre mesenquimales, cuando son co-estimuladas en presencia de eritropoyetina. En esta situación, las células madre positivas para CD90 (progenitoras similares a fibroblastos) podrían ser desencadenadas para activarse *in vitro*. La eritropoyetina en solitario no tiene ningún efecto desencadenante sobre las células completamente diferenciadas, lo que significa que no actúa como lo haría típicamente un factor de crecimiento, pero tiene, de acuerdo con la invención, un papel de detección que vincula una activación de células madre dependiente de traumatismo con una respuesta de crecimiento regenerativa. Esto significa que un proceso de activación específico de sitio es proporcionado por el entorno local de herida en el momento del trasplante. El cuerpo humano aparentemente es capaz de reaccionar a traumatismos localizados desencadenando una respuesta específica de sitio que causa la reparación. El conocimiento para la reparación específica de sitio debe estar vinculado al modo combinado de actividad de citoquinas de traumatismo y factores potenciadores. De acuerdo con la presente invención, los “factores potenciadores” son idealmente co-trasplantados preincubando las células durante las fases preparatorias o integrándolas (grosor completo, microestructuración) y/o situándolas junto con otros factores de apoyo en la matriz de soporte para trasplante. De este modo, la matriz de soporte se convierte en un material que puede liberar factores de señalización a las células en el momento de la inoculación e idealmente durante el periodo total o parcial de duración de su existencia. Esto representa un mecanismo de liberación extendido. Ejemplos de factores potenciadores adecuados de acuerdo con la invención son: EPO, TPO y la hormona humana del crecimiento (HGH).

45 La expresión “**factor de reclutamiento**” significa, de acuerdo con la invención, preferentemente aunque sin limitarse a ello, una molécula biológica natural que es capaz de incrementar el número de células madre tanto *in situ* como en la circulación periférica. Pueden añadirse factores de reclutamiento además de o como alternativa a la carga *in situ* del injerto con células madre preparadas de forma intraoperatoria.

50 La expresión “**factor de determinación**” significa, de acuerdo con la invención, preferentemente aunque sin limitarse a ello, una molécula biológica natural que es capaz de controlar y dirigir la diferenciación, preferentemente *in situ* en lugar de *in vitro*, de células madre, células progenitoras de las mismas, y células que no están completamente diferenciadas. Ejemplos para dicho factor de acuerdo con la invención son: algunas hormonas, vitaminas tales como vitamina C, A, y E, TGFβ y VEGF.

55 La expresión “**factor permisivo**” significa, de acuerdo con la invención, preferentemente aunque sin limitarse a ello, una molécula biológica natural que está habitualmente presente o se genera durante la inflamación de una herida, tal como las citoquinas de traumatismo típicas. *In vitro*, estas moléculas de traumatismo habitualmente no están presentes y pueden añadirse adicionalmente a las células obtenidas y tratadas mediante la enseñanza de esta invención. Otro factor permisivo está constituido por la propia isquemia. Estas moléculas y afecciones indican especificidad de sitio y necesitan y aportan factores permisivos para la activación de las células madre en presencia simultánea de los factores de apoyo y de determinación. Esto indica por qué este proceso es tan rápido en inducir la remodelación del injerto y representa un potente conjunto de herramientas para conseguir remodelación de injertos si se aplica simultáneamente de acuerdo con la enseñanza de la presente invención. En caso de afecciones crónicas o degenerativas que carecen de afecciones inflamatorias o en ausencia de traumatismo o lesión alguna, existen al menos dos maneras de acuerdo con la invención que se usan para conseguir un panel completo de estimulación de células madre: A) coadministración de citoquinas de traumatismo tales como IL-1, TNFalfa, IL-6 de

maneras muy bajas y preferentemente restringidas de forma tópica. Esto incluye, por ejemplo, revestimiento o integración en las matrices de soporte usadas. B) En casos secundarios (considerando el tamaño del defecto a regenerar) la estimulación mecánica con, por ejemplo, una aguja, frote superficial para enrojecimiento, exposición a UV, exposición a láser, y corte con un cuchillo, que da como resultado una liberación endógena de dichos factores permisivos. Este proceso debe realizarse, por lo tanto, simultáneamente para la aplicación de los otros factores y con y sin las células madre.

El posible problema de la disponibilidad de los factores de acuerdo con la invención puede sortearse usando células de tejido autólogo recién recogidas, obtenidas del tejido a generar o cicatrizar del mismo paciente. Estas células de tejido pueden aplicarse en forma de trozos de tejido mezclados, que pueden añadirse al concentrado o composición de células madre proporcionado para la implantación, revistiendo la matriz de soporte o administración sistémica exclusivamente o además de la implantación.

Todos y cada uno de estos factores y su uso de acuerdo con la invención pueden superar el problema de la limitación de un trasplante "a ciegas" en un entorno tisular o una matriz de soporte sintética o biológica/natural.

La expresión "intraoperatorio/a" o "proceso intraoperatorio" o "proceso de ingeniería de implante intraoperatorio" de acuerdo con la invención significa un proceso, en el que la preparación del implante/matriz de soporte *ex-vivo* y cirugía del cuerpo humano o animal en el sitio donde el tejido es defectuoso, traumatizado o lesionado, se consigue en principio en paralelo, incluyendo biopsia de células respectivas para cargar la matriz de soporte *ex vivo* en conjunción temporal. Esto significa que las actividades *ex vivo* respecto a la preparación de células madre u otras células, y el pre-tratamiento de las mismas, que incluye la incubación de las matrices que soportan (matrices de soporte), se inician brevemente antes o simultáneamente antes de la cirugía del tejido, órgano, articulación, etc., enfermo, y termina como muy tarde después de haber implantado la matriz de soporte cargada con células y factores tal como se ha descrito anteriormente. La expresión también incluye la aplicación de las células y factores obtenidos de este modo, o tratados de este modo, en forma de una composición o preparación adecuada, preferentemente como una formulación de gel o pegamento, para tratar la matriz de soporte implantada y el entorno tisular alrededor del implante y el tejido defectuoso o lesionado que rodea a la matriz de soporte recién implantada.

(B) Descripción de los detalles y las realizaciones específicas

La invención se caracteriza por el hecho de que las células son co-trasplantadas con diversos factores diferentes, tal como se ha especificado anteriormente. Estos factores están actuando de acuerdo con la enseñanza de la invención *in situ* y también controlan e inducen la diferenciación y el crecimiento *in situ*.

La invención se caracteriza además porque, aplicando los factores de acuerdo con la invención, evita completamente realizar un cultivo *in vitro* que incluye cualquier expansión de células, incluyendo células madre. Una ventaja de esta realización es que el marco temporal necesario para la fase preparatoria de las células puede acortarse a una cuestión de minutos, eliminando de este modo las desventajas de la expansión celular y la diferenciación celular *in vitro*. Si no existe replicación celular *in vitro*, los riesgos se reducen y/o se suprimen significativamente. Por otro lado esta realización permite el control de la diferenciación *in situ* en el traumatismo (sitio del implante) en combinación con exposición a un factor potenciador, como EPO.

Los factores individuales, tal como se especifica en la invención, interactúan entre sí y con las células, preferentemente con las células madre *in situ* en el sitio del traumatismo:

Los factores se usan para coincubar las células progenitoras en el momento del trasplante, o pueden usarse para revestir directamente la matriz de soporte. Un "factor de determinación", tal como se especifica mediante la invención, puede aplicarse, por lo tanto, también de manera estructurada a una matriz de soporte. En una esponja de colágeno o hialurónico y/o quitosano-a, se usa TGF beta 1, 2 ó 3 para desencadenar la diferenciación de células madre mesenquimales en el sitio del implante. De este modo, se facilita la interacción de los mecanismos potenciadores y los de determinación, causando una forma de regeneración tisular significativamente más rápida y cualitativamente mayor. La diferencia se explica por el hecho de que convencionalmente las células diferenciadas en caso de células de cartílago procedentes de MSC (células madre mesenquimales), necesitan 2-4 semanas para ser preparadas antes de la implantación. Más tarde, las células sueltas no necesariamente mantienen su diferenciación *in vivo* después de la implantación. Es bien conocido en la técnica, que el cartílago generado normalmente *in vitro* o *in vivo* se desdiferencia en tejido fibrótico en el plazo de unos meses. De acuerdo con la invención, se produce cartílago hialino de alta calidad que se mantiene en animales durante al menos 1 año (equivalente a 5-7 años en el hombre). La tecnología de acuerdo con la invención da como resultado una fase preparatoria más rápida (eliminando completamente los cultivos de una semana de duración), esto es mejor desde un punto de vista de la calidad (fibrosis/sin cicatrices) y es más económico desde un punto de vista de la producción. La producción celular cumple las condiciones GMP (buenas prácticas de fabricación).

En una matriz de soporte traqueal, por ejemplo, los anillos del cartílago tienen una disposición circunferencial y una anchura de 3-4 mm. En este caso, cada muy pocos milímetros puede marcarse otra zona de diferenciación. De este

modo, puede usarse una combinación de factores de acuerdo con la invención, por ejemplo, factores de determinación, para estructurar las matrices de soporte. Un factor de determinación es, por ejemplo, la vitamina C que puede estructurarse en áreas entre anillos de cartílago para apoyar la síntesis y el desarrollo de la matriz. Otro ejemplo de un factor de determinación es IL-15 que apoya el desarrollo epitelial bronquial y puede situarse en la luz de la matriz de soporte traqueal.

Tal como se ha perfilado anteriormente, los factores potenciadores, tales como EPO o GH están, por definición, cooperando con condiciones de traumatismo locales y reaccionan a ellas de manera sensible. Como cuestión de completitud, esto se explica mediante la expresión de citoquinas de traumatismo, que es conocida en la técnica, (J Trauma, 2008, vol. 65, n°6, págs. 1374-1378). Existe una aparición fisiológica de estos factores incluyendo citoquinas de traumatismo. IL-12 (p70) e IL-18 y las citoquinas de tipo Th2 IL-4, IL-10 e IL-11 se determinaron usando la técnica de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima en pacientes y en controles sanos. IL-2 e interferón eran raramente detectables. Todos los demás mediadores se incrementaron significativamente emparejados con los controles ($p < 0,05$). Todas las citoquinas se elevaron de la forma más prominente durante las semanas 1 y 2 postraumatismo y disminuyeron seguidamente. Otras citoquinas incluyen IL-1, IL-6 y TNF alfa, y apoyan el efecto potenciador de EPO/TPO y la hormona del crecimiento. Los factores permisivos permiten la generación de células CD90 en áreas del traumatismo en el momento de la estimulación con EPO (factor potenciador) de cicatrización sin la formación de cicatrices. Esto es relevante, por ejemplo, para isquemia cardiaca, lesión de la médula espinal, reparación de cartílago, regeneración de tendones y todos los demás tejidos, dado que esto significa "*restitutio ad integrum*" en lugar de defecto (similar a una cicatriz de curación).

Una importante función de los factores de acuerdo con la invención, tales como los factores potenciadores, es incrementar la expresión de células madre (tales como las células positivas para CD90) en presencia del traumatismo. En la Figura 2, se muestra que CD90+ (Thy1) se producen normalmente en los árboles vasculares. A y B muestran parénquima hepático normal en un modelo en roedor. Si el tejido es expuesto a EPO (250 unidades/kg de peso corporal) la expresión de células CD90+ se activa en todas partes en el parénquima en el plazo de 24-48 horas alcanzando alturas máximas de 1 en 5-10 células que son CD90+. También se muestra en la figura 2(C) que el traumatismo en solitario como afección patológica no es en absoluto diferente de una afección no traumatismo con respecto a CD90+, es decir, el parénquima está libre de células CD90+. (B) también muestra que este efecto no depende de la EPO dado que, en ausencia de traumatismo, las células CD90+ no son estimuladas para aparecer. El resultado estimulador es bastante dependiente de una función sensorial y sensible de EPO para estimular la expresión de células CD90+ en el caso de traumatismo (D). Esta función sensorial se muestra en la Figura 2. Solamente en las afecciones acompañadas por traumatismo, el uso de EPO causa la expresión de las células CD90+. Estas células asumen un papel fundamental en ayudar a la curación sin cicatrices o sin fibrosis en todas las situaciones de lesión (Figura 2).

La tecnología de acuerdo con la invención, conlleva la posibilidad de realizar un reclutamiento simultáneo de células madre coadministrando moléculas tales como GM-CSF o GSF, para incrementar la disponibilidad de MSC a partir de la médula ósea en los sitios que lo necesitan. Es importante que estas actividades de reclutamiento celular se realicen en condiciones temporalmente idénticas o solapantes. La integración tópica proporciona de nuevo un componente de liberación lenta y la posibilidad de usar concentraciones muy bajas de menos de 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ de superficie corporal.

También en una situación cuando se aplican células madre obtenidas de forma exógena, por ejemplo, recogiéndolas de la médula ósea o de cualquier otro sitio en el cuerpo, la coadministración de dichos factores de reclutamiento garantiza un mantenimiento de la señalización regenerativa que ya no se produce fisiológicamente en condiciones de lesión de gravedad.

De acuerdo con la invención, para completar la red de interacción simultánea y el inicio de la regeneración, los "factores de reclutamiento" se añaden preferentemente para incrementar el número de células madre tanto en la circulación periférica como para ejercer un reclutamiento tópico de células madre. La novedad respecto a la invención, es su temporización simultánea y el papel en la regeneración en combinación con, por ejemplo, una propia matriz de soporte (libre de células en el momento de la implantación) y como alternativa, una matriz de soporte inoculada con células madre en el momento de la implantación. Una tercera alternativa es que no se use matriz de soporte. Esto es especialmente ventajoso en enfermedades neuronales incluyendo esclerosis múltiple, apoplejía, Alzheimer, enfermedades psiquiátricas y trastornos neurodegenerativos que no responden a una estimulación aislada con un único factor (por ejemplo EPO) de manera completa y sostenible.

La Figura 3 muestra un resumen de la invención e interacción de los componentes que contribuyen para conseguir la máxima respuesta de cicatrización. Con este fin, los factores de apoyo pueden aplicarse como un revestimiento pero preferentemente integrarse en (dentro de) los materiales de la matriz de soporte. Esto permite que, durante el proceso de remodelación de la matriz de soporte trasplantada, se consiga una liberación concomitante para estimular las células que avanzan durante el proceso de remodelación. Esto significa que se proporciona un proceso de activación específico de sitio mediante el entorno de la herida local en el momento del trasplante. El cuerpo humano aparentemente es capaz de reaccionar a traumatismo localizado desencadenando una respuesta específica de sitio que causa la reparación. El conocimiento para la reparación específica de sitio debe estar vinculado al modo

combinado de la actividad de citoquinas de traumatismo y de factores potenciadores.

El proceso comienza con la obtención de aproximadamente 100 a 200 ml de sangre periférica (en adultos, 10-50 ml en niños) y el centrifugado para obtener la llamada capa leucocitaria, que contiene las células progenitoras CD45+.

5 Como alternativa, pueden obtenerse células madre por aspiración de médula ósea. Estas células madre se preparan de manera que impida la coagulación del aspirado mediante adición de heparina o un agente quelante. El aspirado de células puede concentrarse o usarse directamente después de la inducción de la polimerización y aplicarse al injerto como revestimiento biopolimérico. En este caso, los componentes de la sangre o del plasma del aspirado de células madre son inducidos a coagularse por adición de, por ejemplo, trombina o Ca^{++} . Además, una esponja a base de colágeno, fragmentos de esponja o polvo de colágeno pueden mezclarse en esta preparación para intensificar la fuerza cohesiva y adhesiva del resultado de la polimerización. Simultáneamente, esta preparación similar a gel necesita ser aplicada a las superficies del material de la matriz de soporte, por ejemplo, una matriz traqueal. En este caso, el gel de células madre se aplica en su mayoría en el lado externo del implante. Antes de eso, las células madre son incubadas con TGF beta3 y eritropoyetina. Estas células se aplican en una preparación circunferencial y similar a un anillo sobre la matriz de soporte. El lado luminal y el sitio periférico también son pretratados con EPO y TGF beta3 (tráquea). La adición de las células madre de esta manera también contribuye a conseguir una intensificación simultánea de la vascularización del injerto mediante la activación de células madre. La aplicación tópica de los diversos factores nombrados, da como resultado una concentración tópica bastante alta pero con muy baja disponibilidad sistémica. Puede seguirse una aplicación sistémica puede seguirse de manera convencional.

De acuerdo con esta invención, cualquier matriz de soporte de injerto (por ejemplo, una válvula cardiaca acelularizada o nativa, o tráquea acelular o nativa) puede iniciarse como plantilla para remodelar rápidamente. Todo el proceso requiere solamente minutos o justamente 30-45 minutos para prepararlo. En este sentido, el material a remodelar se convierte en un material que proporciona la copia - información para el resultado sin ser un injerto completamente desarrollado.

La principal ventaja de este enfoque es que la necesidad de expansión y prediferenciación de células madre antes del trasplante se suprime completamente. Además, la mejor calidad del implante se consigue según lo medido mediante histología y su función después de la remodelación. Una ventaja adicional es el modo de acción específico de sitio de los factores de determinación, que evita efectos secundarios sistémicos. De acuerdo con esta enseñanza, es la presencia local de factores permisivos la que, junto con los factores potenciadores administrados de forma exógena, permiten que se realice una preparación del injerto extremadamente rápida.

35 Como alternativa, pueden obtenerse células madre por aspiración de médula ósea. Estas células madre se preparan de manera que impida la coagulación del aspirado mediante adición de heparina o un agente quelante. El aspirado de células puede concentrarse o usarse directamente después de la inducción de la polimerización y aplicarse al injerto como revestimiento biopolimérico. En este caso, los componentes de la sangre o del plasma del aspirado de células madre son inducidos a coagularse por adición de, por ejemplo, trombina o Ca^{++} . Además, una esponja a base de colágeno, fragmentos de esponja o polvo de colágeno pueden mezclarse en esta preparación para intensificar la fuerza cohesiva y adhesiva del resultado de la polimerización. Simultáneamente, esta preparación similar a gel necesita ser aplicada a las superficies del material de la matriz de soporte, por ejemplo, una matriz traqueal. En este caso, el gel de células madre se aplica en su mayoría en el lado externo del implante. Antes de eso, las células madre son incubadas con TGF beta3 y eritropoyetina. Estas células se aplican en una preparación circunferencial y similar a un anillo sobre la matriz de soporte. El lado luminal y el sitio periférico también son pretratados con EPO y TGF beta3 (tráquea). La adición de las células madre de esta manera también contribuye a conseguir una intensificación simultánea de la vascularización del injerto mediante la activación de células madre. La aplicación tópica de los diversos factores nombrados, da como resultado una concentración tópica bastante alta pero con muy baja disponibilidad sistémica. Puede seguirse una aplicación sistémica puede seguirse de manera convencional.

De acuerdo con esta invención, cualquier matriz de soporte de injerto (por ejemplo, una válvula cardiaca acelularizada o nativa, o tráquea acelular o nativa) puede iniciarse como plantilla para remodelar rápidamente.

55 Se desarrolló el siguiente protocolo ejemplar, aunque no limitante, para la remodelación de la matriz de soporte:

1) preparación de la matriz de soporte de manera estéril

60 2) Integración de eritropoyetina como un polvo estéril en el grosor de la matriz de soporte para conseguir efectos de depósito, inyección

3) Incubación de las células madre mesenquimales que han sido recogidas recientemente de médula ósea con EPO (250 IU/Kg de peso corporal), tiempo

65 4) Incubación de las células mononucleares de sangre periférica que han sido recogidas recientemente con EPO (250 IU/Kg de peso corporal)

5) Se recomienda preferentemente PBMC procedentes de sangre dentro, médula ósea fuera, en la mezcla con las islas de epitelio local y los fragmentos de biopsia tisular de tejido sano.

5 6) Incubación/revestimiento de la matriz de soporte con TGF β , hormona paratiroidea, insulina, dex (como alternativa, la formulación de liberación lenta forma nanoportadores tales como ácido hialurónico)

7) Inoculación intraoperatoria de estas células en un dispositivo estéril para siembra (proceso rotacional o de revestimiento).

10 8) Implantación después de aproximadamente 45 minutos.

15 La Figura 4 describe gráficamente el diagrama de flujo del método para conseguir curación sin cicatrices y “*restitutio ad integrum*” en un paciente. Una ventaja fundamental de la tecnología es que forma la base para el estándar más alto alcanzable hasta la fecha, si se compara con el estado de la técnica con respecto a esterilidad, seguridad, reproducibilidad, ahorro, calidad del resultado y aplicabilidad en masa. Después de la obtención de las células madre en condiciones estériles y su preparación, todos los procesos continúan de forma inmediata directamente en paralelo al tratamiento médico u operatorio en curso, en un procesamiento cercano al paciente o intraoperatorio. La principal ventaja procede de la secuencia temporal de acontecimientos, que evita procesamiento extramural, saliendo del quirófano, saliendo del hospital, expansión celular, logística de transporte compleja (coche, tren, aeroplano y otros servicios de mensajería) y transformación celular y activación de oncogén, selecciones o clonación de células debido a condiciones de cultivo *in vitro* artificial y manipulaciones no deseadas y desdiferenciación de las células, así como riesgos infecciosos.

25 La manipulación puede realizarse inmediatamente en una situación de sala limpia, que se beneficia al no tener que salir de la zona de tratamiento inmediato, que es, en todas las situaciones operatorias, el quirófano siendo la sala limpia primaria. Esto ya ofrece una serie de ventajas de seguridad y GMP. El procesamiento de las células se realiza entonces en un entorno de «clase A» equipado con biorreactores, recipientes estériles, hielo estéril, gradillas de soporte para tubos, cubiertas de tela estériles y herramientas preesterilizadas. El concentrado de células madre es transferido desde el recipiente de recogida para inocular la matriz de soporte que ha sido preparada en un envase estéril (por ejemplo una matriz de soporte de válvula cardiaca, una esponja de colágeno). Los biorreactores pueden contener ya la matriz de soporte y los respectivos liofilizados de las moléculas potenciadoras, de determinación o de reclutamiento. En un primer dispositivo, las células madre, proporcionadas en un concentrado de sangre o de médula ósea o de otra forma (células madre grasas especialmente), son expuestas a estos factores y almacenadas en hielo. Mientras tanto, la matriz de soporte se prepara mediante la inyección de los factores potenciadores, de determinación y/o de reclutamiento en el flujo de aire laminar. El biorreactor o dispositivo que contiene la matriz de soporte se coloca sobre un instrumento que mide el peso para documentar los aumentos de peso. Este instrumento es registrado en línea usando un software específico. Este software también registra los aumentos de peso cuando en la siguiente etapa el concentrado de células madre se aplica a la matriz de soporte. Dentro de la campana, la temperatura y las concentraciones de partículas en el aire se registran en línea y se visualizan en una pantalla próxima a la campana. El software también documenta el tiempo desde el comienzo de filtración del aire hasta el comienzo del protocolo para garantizar la esterilidad. Dado que se requiere un tiempo mínimo para limpiar los filtros, el dispositivo se enciende apropiadamente. La persona que maneja el procesamiento de células está usando, por ejemplo, un instrumento controlable con el pie enlazado al servidor (PC, o evitando contaminación a las manos) para confirmar que se han completado las etapas específicas, para que se permita avanzar a las siguientes etapas del procesamiento de las células y la matriz de soporte. El software, por lo tanto, tiene una función de control y liberación además de la documentación del proceso. Esto convierte al dispositivo de acuerdo con la Figura 10 en una unidad de producción GMP autocontrolada de forma autónoma para el procesamiento de células madre. Todo el proceso es grabado en video desde una cámara integrada que también suministra los datos al software. Esto es importante para la documentación de que los procesos se han respetado de acuerdo con los protocolos GMP. La finalización del proceso preparatorio y la confirmación por el trabajador específico que lo está realizando permite la liberación del biorreactor y el transporte a la mesa de operaciones. Antes del transporte, el biorreactor/dispositivo se cierra o se cubre para descartar la entrada de contaminantes desde el aire dentro del quirófano (habitualmente calidad de clase B o C). En caso de que se use una centrífuga para la preparación de las células madre, la centrífuga puede colocarse fuera de la unidad de producción si es posible un procesamiento cerrado. La centrífuga y sus etapas manipulativas son también registradas por el software específico. Después de la retirada del implante, la unidad de producción es limpiada y descontaminada para prepararla para el siguiente paciente. Ambas cosas son también registradas por el software y confirmadas por el trabajador que las realiza. Toda la información recopilada es transferida en línea cuando es posible a un registro centralizado. En este registro, los datos del paciente, que incluyen el diagnóstico, los estados de enfermedad y la evolución postratamiento son introducidos por los médicos/personal de tratamiento. Esto garantiza un completo control de la calidad y accesibilidad a controles de calidad independientes de una tercera parte. Este enfoque de procesamiento intraoperatorio, provisión de tecnología y dirección y control de software permite, en asociación con un control de calidad de una tercera parte, el estándar más elevado del mundo de producción de implantes de células madre mientras, al mismo tiempo, se rebaja el coste de fabricación en un factor de 10-100 respecto al procesamiento convencional. La combinación de estas ventajas del flujo del proceso representa la clave para la producción en masa y la disponibilidad en masa de implantes individualizados/implantes basados en células madre personalizados. La invención científica, por lo tanto, abre la vía

para una tecnología de industrialización crítica que complementa completamente las ventajas científicas, tecnológicas y de cicatrización del proceso y método de esta invención.

La Figura 11 resume la integración del flujo para los componentes del control de calidad de acuerdo con la invención. El control de calidad incluye la recogida de las células madre, la preparación de las células madre, las etapas de inoculación dentro de la unidad de producción móvil. Todas las etapas se registran en línea a tiempo real y son independientes de la intervención manipulativa del trabajador (que realiza la manipulación de las células madre) mediante recopilación automática de datos. El control de los parámetros precede a la liberación del implante. El biorreactor/dispositivo de suministro se sella/cierra antes de la transferencia al operador. La apertura está documentada de nuevo. El proceso termina mediante la documentación de las condiciones del paciente.

El dispositivo de la Figura 10 se define como una unidad de producción, que contiene los siguientes componentes de manera modular para funcionar apropiadamente de acuerdo con la invención: un software maestro que controla todas las operaciones y que, de este modo, forma una unidad operativa que tiene funciones sensorial, de medición y de control, así como un propósito de documentación global. Los componentes instrumentales del conjunto completo incluyen condiciones de flujo de aire laminar de clase A, un biorreactor o dispositivo de cultivo celular, una videocámara, un instrumento que detecta la temperatura. Mientras exista variabilidad con respecto a la diferente inoculación de instrumentos de procesamiento de cultivo celular (biorreactores) o placas petri, la ventaja básica de la unidad de producción es su flexibilidad en este diseño modular vinculada a un componente de cerebro de control igualmente flexible que permite su función como unidad de producción autónoma en cualquier entorno operativo o de tratamiento para conseguir la producción en masa personalizada de implantes individuales *ad hoc* de la mejor calidad posible.

Además, y de acuerdo con la invención, un aparato tal como un biorreactor rotatorio, como se ha descrito anteriormente, se usa para realizar los procedimientos de inoculación en un entorno estéril directamente dentro del quirófano. La principal ventaja de la invención se vuelve evidente en el mejor de los casos, si dichos aparatos se usan dentro de un sistema de flujo de aire laminar que proporciona una cabina de inoculación de sala limpia de clase A. Los biorreactores montados dentro de estos sistemas podrían hacerse funcionar como unidades móviles dentro del quirófano justo para un paciente cada vez. En este sentido, se crea un entorno de producción completamente cerrado de acuerdo con la invención que consta de un sistema de flujo de aire laminar móvil o aislador que contiene en su interior la unidad de procesamiento, que se pone en contacto con la célula o sangre del paciente. Estos dispositivos internos (biorreactores) son idealmente sistemas de uso único (una vía) que están situados sobre soportes de montaje que son reutilizables. Es esta combinación del dispositivo de un solo uso, la movilidad, inoculación y procesamiento de clase A y el tamaño reducido, lo que permite usar todo el sistema como una cabina de producción de forma intraoperatoria para el procesamiento de células madre de acuerdo con el método descrito anteriormente.

De acuerdo con la invención, se añade EPO, por ejemplo, al concentrado de células madre como solución o como un liofilizado, preferentemente como un liofilizado, a una concentración de 150-300, preferentemente 200-250 unidades/kg de peso corporal. Para administración tópica, las dosis pueden ser más altas.

El concentrado de células madre se ajusta en volumen al tipo de tejido a regenerar. Es de 0,5-1 ml en una aplicación tópica, 2-3 ml para un posicionamiento transcutáneo, por ejemplo encima de una zona infartada en el corazón. Puede ser de 10-30 ml para regeneración ósea en la mandíbula.

Esta flexibilidad se consigue centrifugando la médula ósea completa, el tejido adiposo, el volumen de sangre obtenido a una velocidad que permite la sedimentación de todas las células contenidas en el volumen original. Además, se produce una separación del plasma (sin células). Aunque el mismo fondo contiene un apilamiento de células, la integración de más volumen siempre es posible con esta técnica, teniendo de este modo acceso a un concentrado de médula ósea enriquecido con plaquetas y glóbulos rojos. Previamente, estos otros componentes estaban destinados a ser desechados. Una ventaja de este enfoque es beneficiarse del potencial de integración de esas células, lo que suministra resultados superiores respecto al uso aislado de, por ejemplo, células CD133+ aisladas inmunológicamente, que marca la diferencia entre curación sin cicatrices respecto a con cicatrices.

La aplicabilidad tópica de G-CSF o GM-CSF en combinación con células madre permite usar una concentración muy baja si se compara con las aplicaciones sistémicas convencionales. En un enfoque convencional, 200 µg se aplican como revestimiento sobre, por ejemplo, la matriz de soporte a remodelar en 10-20 sitios de inyección. EPO puede administrarse simultáneamente o poco un antes o seguidamente, mediante administración sistémica. La inyección usaba el concentrado de células madre. Durante un periodo posterior de 1-2 semanas, los compuestos se inyectan, por ejemplo s.c. en las mismas cantidades.

Para la regeneración del cartílago, se añade TGFβ a estas inyecciones en una matriz de soporte de 100-500 ng para un parche de 10 cm².

Se añade vitamina C especialmente para proliferación de neuronas en una matriz de soporte a 500 µg. Se añade vitamina E especialmente para diferenciación neuronal con 30 000 IU.

Diversos geles o hidrogeles que comprenden factores biológicos o células de tejido son bien conocidos en la técnica. De acuerdo con la invención, preferentemente composiciones poliméricas tales como geles de celulosa polimérica basados, por ejemplo, en carboximetilcelulosa, pueden usarse para fabricar las respectivas formulaciones.

5

Descripción de las figuras:

Figura 1: Expresión de EpoR, beta-cR y el receptor de la hormona del crecimiento en paralelo en tejidos y células madre.

10

Figura 2: Este ejemplo muestra el uso de la invención para inducir la expresión de células madre en el parénquima hepático: A y B representan los grupos no de traumatismo, C y D los grupos con traumatismo. La adición de rhEPO genera la expresión de células CD90+ en el parénquima hepático solamente en los grupos con traumatismo.

15

Figura 3: Esto resume la interacción del uso de factores de reclutamiento, potenciadores y de determinación en presencia de una situación permisiva (por ejemplo, traumatismo). El proceso preparatorio de las células madre se ajusta en consecuencia y puede ser, por lo tanto, extremadamente rápido requiriendo solamente minutos y se realiza de forma intraoperatoria. Se usa una plantilla para remodelación dependiendo del tamaño del defecto a reparar.

20

Figura 4: Este ejemplo muestra un flujo del proceso que vincula la invención con una secuencia intraoperatoria de acontecimientos que se divide en II fases. La fase I es una fase *in vitro* de preparación y estimulación celulares. La fase II incluye una aplicación de las células madre sobre un injerto después del posicionamiento *in situ*. Por ejemplo, una válvula cardíaca puede revestirse desde el lado periférico, reduciendo los riesgos de estrés manipulativo y el desprendimiento de células en el momento de la implantación.

25

Figura 5 (a) (parte superior) y (b) (parte inferior): Este ejemplo muestra la superficie de un injerto sintético después de la inoculación con células progenitoras (células madre) recogidas de la cresta ilíaca y de sangre periférica. Las células se mezclaron en plasma autólogo (3 ml). Este plasma se llevó a polimerización mediante la adición de trombina (0,1 unidades/ml) y se aplicó al exterior del injerto. Una ventaja del proceso de acuerdo con la invención es que se forma un coágulo que permite iniciar procesos como en la cicatrización normal de heridas. La cinética de coagulación, la estructura del coágulo y la fibrinólisis del coágulo crean un micronicho que, si se combina con factores potenciadores, factores de determinación y factores de reclutamiento de acuerdo con la invención, es ideal para comenzar un proceso de curación sin cicatrices. El injerto se crea después dentro del cuerpo receptor en el plazo de 1-2 semanas.

30

En el interior (b) las células se aplicaron gota a gota sobre la superficie luminal usando una jeringa. En (b) se muestra el uso continuado *in vitro* a los 14 días. El cultivo continuó en condiciones convencionales.

35

Figura 5 (c) (parte superior) y (d) (parte inferior): Este ejemplo muestra un injerto preparado de acuerdo con la invención. Este está abierto en corte longitudinal y muestra un lumen muy bonito y brillante (no trombógeno). En este modelo en animal grande, a las 4 semanas los controles siempre (d) se coagulaban. Esto sería un fallo clínico competente.

40

Las células fluorescentes indican casi el 100% de viabilidad tanto a nivel luminal como en el exterior. El gel de médula ósea/plasma representa un microentorno nutricional en 3D que forma una zona de crecimiento en 3D incluso si existieran condiciones desfavorables inicialmente en los materiales de injerto (ver más adelante válvulas cardíacas alogénicas o xenogénicas que son revestidas de la misma manera).

45

Figura 5 (e) (parte superior) y (f) (parte inferior): Estas figuras reiteran los resultados de un injerto implantado a las 4 semanas y preparado de acuerdo con la invención, observando la histología. En 5 (e), el núcleo polimérico del injerto se muestra con neot Tejido generado hacia el lado luminal y periférico. El injerto no sembrado muestra un trombo hacia la luz. En la figura 5 (f), el neot Tejido generado se muestra rodeando al material de fibra del núcleo sintético (no degradable).

50

Figura 5 (g) (parte superior) y (h) (parte inferior): La figura 5 (g) muestra la tinción con CD31 (marcador endotelial) del lado luminal de un injerto preparado siguiendo la invención. Se ha producido una neoformación de un endotelio vascular que impide la formación del trombo. La figura 5 (h) muestra una matriz de soporte biológica que demuestra que la reendotelialización de progenitores puede producirse también usando una matriz biológica (xenoinjerto)

55

60

Figura 6: Se prepara una válvula cardíaca después de una descelularización. Se muestra que, de acuerdo con la invención, se consigue una fisiología indistinguible de una válvula normal. Las válvulas se implantan en la posición aórtica. No se ha producido ningún fallo a partir de la zona de alta presión.

65

Figura 7 (a) y (b): La figura 7 (a) (parte superior) muestra la implantación después de un cultivo en biorreactor con células madre preparadas en un gel de plasma. El cultivo *in vitro* se realizó durante 1 semana. Estos

resultados de rayos X corresponden al grupo D de 7 (b) (parte inferior) y muestran una buena evolución del reforzamiento óseo durante los periodos de observación de 2, 4 y 6 semanas. En el lado inferior (Figura 7 (b)) la foto A es el defecto del control (defectos de tamaño crítico se establecieron en un modelo en cerdo), la foto B: la inoculación de fosfato tricálcico con sangre en solitario da como resultado una formación de trabéculas óseas débiles, la foto C: mezcla intraoperatoria (tal como se realizó en el estado de la técnica, no de acuerdo con la invención) del material de sustitución ósea con médula ósea del receptor, que muestra solamente una evolución parcial de consolidación. La foto D muestra, en contraste en este experimento, el mejor resultado de regeneración ósea completa en un modelo de tamaño crítico de un defecto óseo. Esto prueba que el mero uso de médula ósea para inocular los materiales no es suficiente para conseguir la misma evolución de regeneración que será capaz de alcanzar un cultivo celular convencional con una expansión y diferenciación de osteoblastos respectivas de células madre. Esta inferior calidad del estado de la técnica es una forma convencional de uso intraoperatorio de médula ósea para soporte óseo. Tal como se muestra en las siguientes figuras, las ventajas del proceso y la tecnología de acuerdo con la invención se vuelven claramente evidentes.

Figura 8 (a) (parte superior, de acuerdo con el estado de la técnica, 6 y 16 semanas después de la implantación) y (b) (parte inferior, ejemplo que usa la invención, 6 semanas después de la implantación). La Figura 8 (b) muestra los resultados del cultivo en biorreactor (cultivo en biorreactor 7 días/semana) respecto a los controles A: material (TCP+sangre) sobre la tecnología intraoperatoria de acuerdo con la invención combinada con EPO. D es un defecto de control sin carga. Todo se muestra a las 6 semanas. Es evidente que el proceso intraoperatorio (IO) de acuerdo con la invención es ahora tan eficiente como un proceso de cultivo celular de una semana de duración. También es evidente a partir de la Figura 8 (a) que una siembra intraoperatoria que se está realizando a la manera del estado de la técnica, añadiendo justamente médula ósea, no causa una formación ósea adecuada (un gran agujero en el hueso sigue estando presente a las 16 semanas, 8 (a) técnica intraoperatoria convencional). 8 (b) muestra, por lo tanto, respecto a 8 (a), claramente la ventaja de un proceso combinado de acuerdo con la invención, dado que la consolidación está completa a las 6 semanas ya en todos los grupos. La técnica intraoperatoria del estado de la técnica convencional de 8 (a) deja, en contraste, un gran defecto tanto a las 6 como también a las 16 semanas.

En defectos más grandes, las células de médula ósea preparadas de acuerdo con la invención, sin embargo, serán ventajosas respecto al mero uso de sangre.

Figura 9 (a), (parte superior) (b) (parte inferior): Esta figura muestra un paciente que ha recibido un tratamiento con células madre de acuerdo con la invención con un tamaño de defecto que es 100 veces más grande que el defecto de tamaño crítico usado en las figuras 8. El proceso de consolidación es rápido (b) y muestra una sostenibilidad a largo plazo del neohueso con una excelente calidad de formación de hueso trabecular. Normalmente dicho implante habría resultado aplastado (estado de la técnica usando cultivos de células madre de hueso) a las 6-8 semanas o no se habría remodelado a este tipo de hueso de calidad en absoluto. Normalmente el material usado permanece con poca remodelación durante muchos años o es sustituido por tejido fibrótico. En el proceso de acuerdo con la invención no fue necesaria expansión celular, no se produjeron cicatrices o fibrosis y el hueso es estable durante años.

Figura 9 (c): Resultado final después de 1,5 años que muestra buena morfología ósea, sin aplastamiento pero con sostenibilidad del resultado.

Figura 10: Muestra una unidad móvil ideal que consta de un biorreactor de una vía (1, un dispositivo cerrable) montado sobre una estación de acoplamiento o soporte (tal como se ha descrito anteriormente), una centrífuga (3, puede estar fuera, como alternativa) y un dispositivo de esterilización tal como luz UV. 4 representa los sistemas de filtración de aire estéril, es una especialidad de este dispositivo combinado que representa un laboratorio miniaturizado dentro del quirófano. Este dispositivo puede usarse para realizar procesos de cultivo celular que solían requerir 2-3 semanas, en menos de 1 hora de acuerdo con el método de la invención. Es una característica importante, que 1, que simboliza cualquier biorreactor para ingeniería de tejidos, es idealmente un dispositivo de una vía. El sistema puede moverse con una ventana frontal cerrada y mantener la esterilidad completamente incrementando la presión del aire en el interior por encima de la presión del aire ambiental para mantener un flujo de aire estéril en el interior (37°C temperatura controlable). Con este fin, el aire es retirado al exterior por 2 válvulas unidireccionales (6a y 6b) que son activadas cuando el panel de la ventana frontal está cerrado. Además, está incluido un sistema de monitorización que documenta completamente todas las actividades del biorreactor (posición, temperatura, rotaciones, actividad de bombeo con respecto a presión, velocidad y volumen, ventana abierta y cerrada). El sistema también mide las concentraciones de las partículas en el aire en el interior y provoca alarmas cuando los umbrales de clase A oficialmente requeridos son violados. Todas estas tecnologías son conocidas individualmente en la técnica, pero si se combinan crean un valor incrementado significativamente y aplicabilidad para una producción móvil de injertos de células madre obtenidos por ingeniería de tejidos dentro de una sala de operaciones. El dispositivo es completamente independiente y viene con su propia fuente de energía eléctrica (funciona con batería).

El sistema puede esterilizarse en el interior con gas o peróxido de hidrógeno. Además, el sistema tiene una superficie antimicrobiana que contiene en una realización un revestimiento de plata conseguido por ionización de plasma.

Figura 11: Integración del control de calidad y documentación que acompaña y completa los requisitos de producción.

5 **Ejemplos:**

Los siguientes ejemplos describen la invención con más detalle.

10 Ejemplo 1:

- 10 • 24 horas antes del comienzo de la operación: eritropoyetina sc (dosis única normal de acuerdo con la recomendación del fabricante, 10.000 unidades) y GM-CSF (dosis única normal de acuerdo con la recomendación del fabricante 250 unidades/m², 1 vial) para activar la producción de células madre en la médula ósea y para dirigir células madre autólogas con EPO.
- 15 • Comienzo de la anestesia del paciente con el defecto traqueal a reparar.
- Recogida de 100 ml de sangre para obtener plasma autólogo (anticoagular con una baja cantidad de heparina).
- 20 • Extraer 30-60 ml de aspirado de médula ósea del paciente a partir de la cresta ilíaca.
- Colocación de la sangre/médula ósea en hielo (4°C) con envasado secundario estéril en tubos heparinizados.
- 25 • Preparación de situs operatorio y recuperación de biopsias adicionales con un diámetro de 1-2 mm si todavía hay disponible tejido diana comparable. Almacenamiento en hielo en recipiente estéril en solución salina normal estéril.
- Transferencia del aspirado de médula ósea y las biopsias de tejido a flujo de aire laminar ubicado idealmente directamente dentro o muy cerca del quirófano
- 30 • Preparación del aspirado de médula ósea y/o sangre u otra fuente de células madre, para conseguir la concentración y/o acceso de células. Preparación de las células madre con todos, aunque sin limitarse a todos los posibles procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo preparación por gradiente de densidad, separación inmunológica, concentración, filtración, digestión o troceado de la matriz y lavado.
- 35 • Preparación de soluciones de inyección dividiendo en alícuotas los concentrados de las células madre o como alternativa, el plasma, y uso como disolvente para los factores potenciadores, de determinación y/o de reclutamiento.
- 40 • Incubación provisional de las células madre mesenquimales que se acababan de recoger de la médula ósea con la mezcla EPO/TGFbeta3 (500 µl)- almacenamiento en hielo estéril/temperatura ambiente (dependiendo del intervalo disponible y la evolución de la operación paralela) y acondicionamiento con esos factores *in vitro*.
- 45 • Inyección de soluciones específicas en sitios diferentes distribuidos regularmente en la matriz de soporte para la liberación retardada *in situ* después de la implantación y estructuración de las células madre a través de la inducción tardía de determinación específica de sitio si las células se encuentran con esos factores exactamente en esas posiciones determinadas.
- 50 • Inyecciones de células madre, con o sin troceado de tejido da como resultado posiciones apropiadas (por ejemplo en la luz de implantes tubulares (por ejemplo válvulas, vasos, conductos) e inyección intraluminal ligeramente por debajo de la superficie superficial para la formación de islas de células.
- Transferencia al sitio operatorio e implantación.
- 55 • Aplicación como revestimiento de la mezcla de células madre a la pared con plasma autólogo o pegamento de fibrina de forma intraoperatoria para permitir el posicionamiento apacible, y para evitar la retirada durante la manipulación del implante. Implantación después de 45 minutos.
- 60 • Tratamiento posoperatorio del paciente con factor potenciador y/o de reclutamiento hasta el final de la fase de cicatrización de herida simulada (a menudo 2 semanas, más si es necesario, por ejemplo, en lesión medular).

Ejemplo 2: INGENIERÍA CARDIOVASCULAR

65 En un diseño experimental se extrajeron seis válvulas alogénicas y 4 xenogénicas en un modelo en oveja de sustitución de válvula aórtica. 2 de las válvulas se sometieron a un proceso de descelularización usando un

detergente (ácido quenodesoxicólico) tal como se conoce en la técnica. Estas válvulas se almacenaron a continuación a 4°C y se llevaron al quirófano en estado estéril. A las válvulas se les inyectó eritropoyetina (5.000 unidades) y G-CSF (Leucina, Sargramostim) y hormona del crecimiento por vía luminal con una jeringa de diámetro muy pequeño (0,5 mm) para reducir el daño. Simultáneamente, se extrajo médula ósea con un volumen total de 30 ml. La médula ósea se centrifugó a 1500 x g durante 7 minutos. El centrifugado se realizó con sangre heparinizada. 1 cc del sedimento restante se inyectó debajo de la matriz superficial del lado luminal, dando como resultado una distribución parcheada de las células madre. Esto servía para el objetivo de proteger a las células del desprendimiento después de la introducción en el torrente sanguíneo. Después de la implantación, las válvulas se revistieron con 5 ml de concentrado de médula ósea que se preparó.

Ejemplo 3: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DE INJERTO SINTÉTICO

En este caso, se usa un injerto sintético. Dichos injertos pueden ser de PTFE, injertos de poliéster, de poliéster combinado con injertos de silicona, tubos de colágeno, injertos de colágeno - elastina, injertos biológicos con o sin descelularización. Una inducción del proceso de polimerización del revestimiento de células madre se consigue añadiendo un agente de polimerización tal como trombina (0,1 unidades / ml) o Ca⁺⁺, que antagonizan a los agentes que impiden la coagulación usados durante la recogida de médula ósea o sangre. La cinética de coagulación causa un efecto desencadenante para el posterior proceso de cicatrización, la estructura del coágulo y la fibrinólisis del coágulo crean un micronicho que, si se combina con factores potenciadores, factores de determinación y factores de reclutamiento de acuerdo con la invención, es ideal para proporcionar un proceso de curación sin cicatrices. Las células no crecen en agujeros o espacios vacíos. El gel obtenido del proceso de coagulación es, preferentemente, un polímero conformado artificialmente para conseguir una geometría específica. La captura de células es ventajosa para establecer rutas de comunicación entre células madre, plaquetas, fibras, glóbulos rojos, glóbulos blancos y todas las células madre atrapadas incluyendo CD90, CD133, CD106 y CD45.

El injerto se crea a continuación dentro del cuerpo receptor en el plazo de 1-2 semanas. Los mecanismos de liberación lenta causan una interacción controlada del revestimiento del injerto con las células que comienza el proceso de remodelación desde dentro. El proceso continúa hasta que la estimulación de citoquinas procedentes de la zona de la herida y las células inflamatorias atrapadas se termina, en paralelo (simultáneamente) a los resultados de cicatrización. Se descubrió que IL-6, IL-1 y TNF son importantes citoquinas de traumatismo que activan las células madre (factores permisivos). El proceso de polimerización y la captura de las células inmunocompetentes son de apoyo para que se complete la cascada de interacción (de acuerdo con la figura 3 de la invención). Incluso sobre superficies sintéticas heterogéneas, el neoinjerto está formado con un lado luminal y un lado periférico completamente biológico. Las células diferenciadas incluyen fibroblastos, células de músculo liso, células endoteliales (CD31+). La tecnología proporciona un potencial de aplicabilidad significativamente mejor, dado que la trombogenicidad se reduce enormemente. No se ha producido una hiperplasia. Una importante aplicación, por lo tanto, es el tratamiento de endoprótesis (cardio)vasculares endoluminales, que en su mayoría fallan debido a hiperplasia especialmente en zonas del extremo. Se produce una neoformación de un endotelio vascular que impide la formación del trombo. La matriz de soporte puede descelularizarse con un enfoque a base de tripsina o usando un detergente (por ejemplo ácido quenodesoxicólico).

Puede usarse el siguiente protocolo:

- Proceso intraoperatorio para individualización del implante sintético usando un injerto revestido de poliéster, colágeno, quitosana, poliéster + silicona, o por ejemplo aunque sin limitarse a un injerto de PTFE.
- 24 horas antes del comienzo de la operación: eritropoyetina sc (dosis única normal de acuerdo con la recomendación del fabricante, 10.000 unidades) y GM-CSF (dosis única normal de acuerdo con la recomendación del fabricante, 1 vial) para activar la producción de células madre en la médula ósea y para dirigir células madre autólogas con EPO.
- Comienzo de la anestesia del paciente con el defecto de injerto a reparar.
- Recogida de 50 ml de sangre para obtener plasma autólogo (anticoagular con baja cantidad de heparina).
- Extraer 30 ml de aspirado de médula ósea del paciente a partir de la cresta ilíaca.
- Colocación de estos 30 ml en hielo con envasado secundario estéril en tubos heparinizados.
- Preparación de situs traqueal y recuperación de 5 biopsias epiteliales bronquiales con un diámetro de 1-2 mm y almacenamiento en hielo en recipiente estéril en solución salina normal estéril.
- Transferencia del aspirado de médula ósea y las biopsias epiteliales a la cabina de flujo de aire laminar para procesamiento adicional.
- Centrifugado del aspirado de médula ósea durante 7 minutos a 4°C para conseguir concentración de células.

- Separación del plasma del concentrado de células madre mediante transferencia a un tubo estéril en hielo.
- Preparación de la solución de eritropoyetina usando 1 ml del sobrenadante de plasma obtenido del proceso de centrifugado (50.000 unidades, Neorecormone, Roche).
- 5 • Adición de TGF beta 3 estéril a la solución de EPO-plasma localmente específica.
- Incubación de las células madre mesenquimales que han sido recogidas recientemente de médula ósea con la mezcla de EPO/TGFbeta3 (500 µl)- almacenamiento en hielo estéril.
- 10 • Inyección de la solución de EPO/TGF en 10 sitios diferentes de la matriz de soporte traqueal para la liberación retardada *in situ* después de la implantación.
- Incubación de 1 ml de la mezcla de células madre, células epiteliales en la luz de la matriz de soporte traqueal, e inyección intraluminal para la formación de islas de células.
- 15 • Transferencia al sitio operatorio e implantación.
- Aplicación como revestimiento de la mezcla de células madre a la pared con plasma autólogo o pegamento de fibrina de forma intraoperatoria para permitir el posicionamiento apacible y para evitar la retirada durante la manipulación del implante. Implantación después de 45 minutos.
- 20

Ejemplo 4: INGENIERÍA DE VÁLVULAS

25 Una limitación de la ingeniería de tejidos actual fundamental en el uso de tejidos descelularizados es especialmente, la falta de estabilidad y resistencia a la presión, que complica el uso de dichas válvulas en un entorno a alta presión. Además, se consideró que el crecimiento postulado en un entorno pediátrico era una respuesta dilatativa en lugar del auténtico crecimiento. Estos problemas se resuelven con el siguiente protocolo. Como alternativa, los vasos o válvulas descelularizadas también son cebados rápidamente para realizar remodelación rápida *in vivo*. El proceso de acuerdo con la invención puede, de este modo, mejorar también matrices descelularizadas.

30

Protocolo para válvulas: proceso intraoperatorio para individualización de implante valvular alogénico

- 35 • 24 horas antes del comienzo de la operación: eritropoyetina sc (dosis única normal de acuerdo con la recomendación del fabricante, 10.000 unidades) y GM-CSF (dosis única normal de acuerdo con la recomendación del fabricante, 1 vial) para activar la producción de células madre en la médula ósea y para dirigir células madre autólogas con EPO.
- 40 • Comienzo de la anestesia del paciente con el defecto de válvula cardíaca a reparar.
- Recogida de 200 ml de sangre para obtener plasma autólogo (anticoagular con baja cantidad de heparina) y capa leucocitaria.
- 45 • Extracción de 10 ml de aspirado de médula ósea del paciente a partir de la cresta ilíaca.
- Colocación de estos 10 ml en hielo con envasado secundario estéril en tubos heparinizados.
- Preparación de situs de válvula y recuperación de 5 biopsias valvulares con un diámetro de 1-2 mm y almacenamiento en hielo en recipiente estéril en solución salina normal estéril.
- 50 • Transferencia del aspirado de médula ósea y biopsias epiteliales al banco de flujo de aire laminar para procesamiento adicional.
- Centrifugado del aspirado de médula ósea durante 5 minutos a 4°C para conseguir concentración de células.
- 55 • Separación del plasma del concentrado de células madre mediante transferencia a un tubo estéril en hielo estéril.
- Preparación de solución de eritropoyetina usando 1 ml del sobrenadante de plasma obtenido del proceso de centrifugado (50.000 unidades, Neorecormone, Roche).
- 60 • Adición de HGF y/o VEGF a la solución de EPO-plasma.
- Incubación de las células madre mesenquimales que han sido recogidas recientemente de la médula ósea con EPO almacenado en hielo estéril.
- 65

- Inyección de la solución EPO/HGF en 10 sitios diferentes de la matriz de soporte traqueal para la liberación retardada *in situ* después de la implantación.
- 5 • Incubación de 1 ml de células madre, mezcla de células endoteliales/madre en la luz de la matriz de soporte traqueal, e inyección intraluminal para la formación de islas de células, uso de células no expandidas pero recién preparadas.
- Las células procedentes de la capa leucocitaria a nivel luminal se siembran.
- 10 • Transferencia al sitio operatorio e implantación.
- Aplicación como revestimiento de la mezcla de células madre a la pared con plasma autólogo o cola de fibrina de forma intraoperatoria para permitir el posicionamiento apacible y para evitar la retirada durante la manipulación del implante. Implantación después de 45 minutos.

15 Ejemplo 5: INGENIERÍA DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS

“Protocolo para la tráquea”: proceso intraoperatorio para individualización de implante traqueal alogénico”

- 20 • 24 horas antes del comienzo de la operación: eritropoyetina sc (dosis única normal de acuerdo con la recomendación del fabricante, 10.000 unidades) y GM-CSF (dosis única normal de acuerdo con la recomendación del fabricante, 1 vial) para activar la producción de células madre en la médula ósea y para dirigir células madre autólogas con EPO.
- 25 • Comienzo de la anestesia del paciente con el defecto traqueal a reparar.
- Recogida de 50 ml de sangre para obtener plasma autólogo (anticoagular con una baja cantidad de heparina).
- Extraer 10 cc de aspirado de médula ósea del paciente a partir de la cresta ilíaca.
- 30 • Colocación de estos 10 cc en hielo con envasado secundario estéril en tubos heparinizados.
- Preparación de situs traqueal y recuperación de 5 biopsias epiteliales bronquiales con un diámetro de 1-2 mm y almacenamiento en hielo en recipiente estéril en solución salina normal estéril.
- 35 • Transferencia del aspirado de médula ósea y biopsias epiteliales al laboratorio de flujo de aire laminar para procesamiento adicional (Cryolab).
- Centrifugado del aspirado de médula ósea durante 5 minutos a 4°C para conseguir concentración de células.
- 40 • Separación del plasma del concentrado de células madre mediante transferencia a un tubo estéril en hielo estéril.
- Preparación de solución de eritropoyetina usando 1 ml del sobrenadante del plasma obtenido del proceso de centrifugado (50.000 unidades, Neorecormone, Roche).
- 45 • Adición de TGF beta 3 estéril a la solución de EPO-plasma.
- Incubación de las células madre mesenquimales que han sido recogidas recientemente de médula ósea con la mezcla EPO/TGFbeta3 (500 µl)- almacenamiento en hielo estéril.
- 50 • Inyección de la solución EPO/TGFβ en 10 sitios diferentes de la matriz de soporte traqueal para la liberación retardada *in situ* después de la implantación.
- Incubación de 1 cc de la mezcla de células madre, células epiteliales en la luz de la matriz de soporte traqueal, e inyección intraluminal para la formación de islas de células.
- 55 • Transferencia al sitio operatorio e implantación.
- Aplicación como revestimiento de la mezcla de células madre a la pared con plasma autólogo o pegamento de fibrina de forma intraoperatoria para permitir el posicionamiento apacible y para evitar la retirada durante la manipulación del implante. Implantación después de 45 minutos.

60 Ejemplo 6: INGENIERÍA HEPÁTICA

- 24 horas antes del comienzo de la operación: eritropoyetina sc (dosis única normal de acuerdo con la

recomendación del fabricante, 10.000 unidades) y GM-CSF (dosis única normal de acuerdo con la recomendación del fabricante, 1 vial) para activar la producción de células madre en la médula ósea y para dirigir células madre autólogas con EPO.

- 5 • Comienzo de la anestesia del paciente con el defecto hepático a reparar. Esto incluye típicamente pacientes con cirrosis crónica, insuficiencia hepática aguda o crónica, hepatectomías extensas incluyendo donaciones de órgano vivo y trasplante de órgano hepático.
- 10 • Recogida de 200 ml de sangre para obtener plasma rico en plaquetas (anticoagular con una baja cantidad de Heparina) y/o PBMC, o un concentrado de todo esto (combinado para mejores efectos y facilidad de preparación).
- Extraer 100 ml del aspirado de médula ósea del paciente a partir de la cresta ilíaca.
- 15 • Colocación de estos 100 ml en hielo con envasado secundario estéril en tubos heparinizados.
- Simultánea a una operación endoscópica y preparación de situs hepático y recuperación de 5 biopsias de fragmentos de hígado con un diámetro de 1-2 mm (obtenidas en una hepatectomía de un borde del hígado) y almacenamiento a 4°C en hielo en recipiente estéril en solución salina normal estéril.
- 20 • Transferencia del aspirado de médula ósea y las biopsias hepáticas a un banco de flujo de aire laminar para procesamiento adicional.
- Centrifugado del aspirado de médula ósea durante 5 minutos a 4°C para conseguir concentración de células.
- 25 • Separación del plasma del concentrado de células madre mediante transferencia a un tubo estéril en hielo estéril.
- Preparación de la solución de eritropoyetina usando 1 ml del sobrenadante de plasma obtenido del proceso de centrifugado (10.000 unidades, Neorecormone, Roche).
- 30 • Adición de HGF a la solución de EPO-plasma.
- Incubación de células madre mesenquimales que han sido recogidas recientemente de médula ósea con EPO almacenamiento en hielo estéril.
- 35 • Inyección de la solución de EPO/G-CSF/HGF en 10 sitios diferentes de una matriz de soporte de esponja de colágeno para liberación retardada *in situ* después de la implantación.
- Incubación de 5 ml de una mezcla final de concentrado de células madre, fragmentos de tejido hepático/células madre sobre la superficie de la matriz de soporte. La polimerización se consigue añadiendo trombina.
- 40 • Transferencia al sitio operatorio e implantación, fijación al hígado mediante encolado encima de una superficie reseccionada o encima de un hígado cirrótico. Se realizan 10-20 pequeñas microperforaciones sobre las superficies para conseguir continuidad de acceso a la sangre con la esponja.
- 45 • Aplicación como revestimiento de la mezcla de células madre a la pared con plasma autólogo o pegamento de fibrina de forma intraoperatoria para permitir el posicionamiento apacible y para evitar la retirada durante la manipulación del implante. Implantación después de 30 minutos

50 Ejemplo 7: INGENIERÍA CUTÁNEA

Protocolo para úlcera de decúbito, úlcera diabética, piernas isquémicas, heridas infectadas en cualquier zona.

- 55 • al comienzo de la operación: eritropoyetina sc (dosis única normal de acuerdo con la recomendación del fabricante, 10.000 unidades) y GM-CSF (200 µg/m² para un paciente de 70 kg/dosis baja) para activar la producción de células madre en la médula ósea y para dirigir células madre autólogas con EPO. Dado que la afección a menudo no es comparable en gravedad GM-CSF o G-CSF pueden omitirse.
- Comienzo de la anestesia del paciente.
- 60 • Recogida de 200 ml de sangre para obtener plasma rico en plaquetas (anticoagular con una baja cantidad de heparina) y/o PBMC, o un concentrado de todo esto (combinado para mejores efectos y facilidad de preparación).
- 65 • Recogida de 30-60 ml de aspirado de médula ósea del paciente a partir de la cresta ilíaca.

- Colocación de los resultados de la recogida en hielo con envasado secundario estéril en tubos heparinizados.
- Desbridamiento quirúrgico de heridas infectadas. Extirpación de tejido necrótico como normal.
- 5 • Especialmente en quemaduras o si está presente tejido con granulación en heridas crónicas, una preparación de 10 biopsias cutáneas con un diámetro de 1-2 mm (obtenidas de zonas sanas) sirve para el objetivo de apoyar la epitelialización. Las muestras se almacenan a 4°C en hielo en recipiente estéril en solución salina normal estéril o plasma autólogo.
- 10 • Transferencia del aspirado de médula ósea y biopsias cutáneas al banco de flujo de aire laminar para procesamiento adicional.
- Centrifugado del aspirado de médula ósea a 4°C para conseguir concentración de células.
- 15 • Separación del plasma del concentrado de células madre mediante transferencia a un tubo estéril en hielo estéril.
- Preparación de la solución de eritropoyetina usando 1 ml del sobrenadante del plasma obtenido del proceso de centrifugado (10 000 unidades, Neorecormone, Roche).
- 20 • Adición de la solución de EPO-plasma.
- Incubación de células madre mesenquimales que han sido recogidas recientemente de médula ósea con EPO almacenamiento en hielo estéril.
- 25 • Inyección de la solución de EPO/G-CSF en 10 sitios diferentes de una matriz de soporte de esponja de colágeno para liberación retardada *in situ* después de la implantación. Como alternativa, mezcla con el concentrado de células madre e inducción de polimerización.
- Incubación de 5 ml de una mezcla final de concentrado de células madre, fragmentos de tejido cutáneo/célula madres sobre la superficie de la matriz de soporte. La polimerización se consigue añadiendo trombina. Si no hay matriz de soporte disponible, el concentrado de médula ósea se lleva a polimerización de una superficie de plástico (por ejemplo placa de Petri, biorreactor). Esto forma una membrana similar a un gel, que puede transferirse después de la gelificación para cubrir la herida.
- 30
- 35 • Transferencia al sitio operatorio e implantación, posicionamiento a la herida (Trasplante después de 30 minutos).
- Como alternativa o además, la mezcla de células/factores se inyecta en los bordes de la herida (5 ml total en 10 sitios diferentes).
- 40 • Cubrir con una esponja de colágeno y cubierta completa de la zona con una película de film transparente.

Ejemplo 8: INGENIERÍA CARDIACA

- 45 *Protocolo isquemia cardiaca, ataque cardiaco, cardiomiopatía. El objetivo es situar un gel de células madre de acuerdo con la invención debajo del saco pericárdico mediante una vía transcutánea*
- al comienzo de la operación, o incluso cuando el paciente está disponible después del diagnóstico de ataque cardiaco agudo. EPO 10000 unidades y/G-CSF se da como un medicamento agudo a 250 Unidades/kg de peso corporal, G-CSF a 250 µg/paciente de 70 kg. En casos no tan graves EPO en solitario es suficiente.
 - 50 • Recogida de 200 ml de sangre para obtener plasma rico en plaquetas (anticoagular con baja cantidad de heparina) y/o PBMC, o un concentrado de todo esto (combinado para mejores efectos y facilidad de preparación).
 - 55 • Recogida de 30-60 ml de aspirado de médula ósea del paciente a partir de la cresta ilíaca, en anestesia local.
 - Colocación de los resultados de la recogida en hielo con envasado secundario estéril en tubos heparinizados.
 - Comienzo de la anestesia local del paciente en el tórax.
 - 60 • Posicionamiento de un catéter a través del tórax bajo control por rayos x hasta alcanzar el pericardio y posicionamiento de la abertura debajo del pericardio encima de la zona infartada.
 - Transferencia del aspirado de médula ósea al banco de flujo de aire laminar para procesamiento adicional.

- Centrifugado del aspirado de médula ósea a 4°C para conseguir concentración de células.
- Preparación de la solución de eritropoyetina, G-CSF usando 1 ml de concentrado de células madre obtenido del proceso de centrifugado (10.000 unidades, Neorecormone, Roche), almacenamiento en hielo estéril.
- La adición del factor de respuesta sérica altamente conservado (SRF) y miogenina puede realizarse para apoyar la diferenciación del músculo cardíaco.
- Inducción de polimerización e inyección mediante el catéter encima de la zona infartada.
- cierre del pericardio.
- tiempo necesario: 10-20 minutos.

Ejemplo 9: INGENIERÍA CORNEAL

La reparación de la córnea especialmente cuando no está disponible un ojo contralateral sano con células madre límbicas intactas no es posible. En un enfoque convencional, también se necesitaría expandir las células madre. Otras aplicaciones oculares incluyen degeneración macular, ceguera, neuritis óptica, xeroftalmia. Una inyección más profunda puede seleccionarse para degeneración macular. De acuerdo con la invención, puede realizarse un proceso triple rápido:

- A) estimulación directa durante la lesión aguda después de lavado con el factor potenciador EPO aplicado como un liofilizado mezclado con lágrimas artificiales.
- B) preparación de una biopsia corneal del ojo contralateral, trituración hasta alcanzar muestras muy pequeñas, o digestión suave para obtener células aisladas y lavado. Incubación de las muestras de células con EPO y posicionamiento encima del ojo. Como alternativa, las células pueden inyectarse debajo de o en la córnea dañada. La córnea puede extirparse quirúrgicamente en algunas zonas. En casos muy graves, se administra GCSF sc junto con EPO hasta que se ha completado la cicatrización de la herida (1-2 semanas).
- C) si no estaba disponible ninguna biopsia corneal en absoluto, se añadieron células madre obtenidas de PBMC o concentrado de médula ósea a lágrimas artificiales o plasma y se situaron junto con EPO y/ GCSF sobre o dentro de la córnea dañada.

Ejemplo 10: RECONSTRUCCIÓN DE MAMA O IMPLANTE DE MAMA

La reparación de la mama se consigue mediante series de inyecciones con un gel de células madre de acuerdo con la invención para desarrollar el tejido que falta después de las resecciones. También se usa para preparar la superficie de un implante de mama para evitar formación de cicatrices y fibrosis. Como factores de determinación, se usan hormonas sexuales para desencadenar la maduración de las células madre en el linaje de tejido mamario. De acuerdo con la invención, puede realizarse un proceso rápido doble o triple:

- A) Estimulación directa del implante, el factor potenciador EPO aplicado como un liofilizado mezclado con concentrado de células madre.
- B) Preparación de una biopsia de mama de la mama contralateral, trituración hasta alcanzar muestras muy pequeñas, o digestión suave para obtener células aisladas y lavado. Incubación de las muestras de células con EPO e inyección con concentrado de células madre. Como alternativa, las células pueden inyectarse en procedimientos repetitivos para conseguir el desarrollo. Se administra GCSF sc junto con EPO hasta que la cicatrización de la herida se ha completado (1-2 semanas). Las hormonas usadas incluyen estrógeno, FSH (hormona estimuladora del folículo), hormona del crecimiento, progesterona y prolactina.

Ejemplo 11: REGENERACIÓN DE MÉDULA ESPINAL O REGENERACIÓN DE NERVIOS PERIFÉRICOS

La regeneración de neuronas se consigue situando un gel de células madre encima de la zona isquémica después de descompresión o mediante sustitución usando una guía de colágeno como un tubo. Con este gel de células madre de acuerdo con la invención, la regeneración de tejido que falta es posible. También se usa para preparar el implante para evitar formación de cicatrices y fibrosis. Como factores de determinación, se usa factor de crecimiento nervioso, en combinación con vitamina C (o en solitario para proliferación) y vitamina D (para diferenciación neuronal) para desencadenar la maduración de las células madre en el linaje neuronal.

De acuerdo con la invención, puede realizarse un proceso rápido doble:

- A) Estimulación directa del tejido nervioso herido usando el factor potenciador EPO aplicado como liofilizado

mezclado con concentrado de células madre.

B) Inyecciones de GCSF, EPO, Vitamina C y Vitamina D sc durante un periodo de hasta 4-6 semanas si no es posible el acceso quirúrgico.

C) Interposición como un gel de células madre con los factores anteriores para inducción de la polimerización. Para intensificar la estabilidad del gel, un polvo de colágeno se mezcla en el concentrado de células madre de médula ósea de polimerización con los factores.

Ejemplo 12: REGENERACIÓN DE TENDONES, LIGAMENTOS, DISCOS INTERVERTEBRALES, MENISCOS, CARTÍLAGO

La regeneración de dicho tejido conectivo se consigue situando un gel de células madre encima de la zona lesionada o mediante inyección en la zona lesionada. Para obtener material para la determinación, tejido original troceado se obtiene de las zonas alteradas o dañadas (a menudo a partir de traumatismo). En una situación degenerativa, citoquinas de heridas se generan mediante perforación artificial con una aguja para apoyar la mezcla de gel de células madre/factor de acuerdo con la invención. En el caso de un disco intervertebral, se aplica TGF beta además para apoyar la reformación del núcleo pulposo. Si están disponibles fragmentos, estos se mezclan entre sí en el gel de células madre.

Con este gel de células madre de acuerdo con la invención, la regeneración evitando formación de cicatrices y fibrosis es posible. Como factor de determinación, puede añadirse factor de crecimiento de fibroblastos para aceleración para conseguir resultados rápidos.

De acuerdo con la invención, puede realizarse un proceso rápido triple:

- estimulación directa del tejido herido usando el factor potenciador EPO aplicado como un liofilizado mezclado con concentrado de células madre.
- Inyecciones de GCSF, EPO, durante un periodo de hasta 1-2 semanas si no es posible acceso quirúrgico (especialmente como una medida preventiva).

Inyección de un gel de células madre con los factores anteriores para inducción de polimerización. Para intensificar la estabilidad del gel, un polvo de colágeno se mezcla en el concentrado de células madre de médula ósea de polimerización con los factores.

En el caso de regeneración de cartílago, una matriz de soporte/gel preparado de quitosano se usa y se inocula con el gel de célula madre/factor que incluye TGF beta (20 ng) en el momento de la implantación. La fijación del gel se consigue mediante encolado a la superficie lesionada. Idealmente puede usarse un gel de quitosano o gel de fibrinógeno.

Durante la fase de cicatrización, puede usarse apoyo s.c de los factores (EPO, GCSF). Puede reapplicarse TGF también.

Ejemplo 12: INGENIERÍA DE ESFÍNTER

Se reparan esfínteres de forma intraoperatoria de manera comparable a la ingeniería cardiaca. El gel de células madre/factor se inyecta en el tejido de esfínter restante. Además, puede formarse un anillo de neot tejido que rodea al viejo esfínter. La remodelación se produce en 2 semanas.

Ejemplo 13: INGENIERÍA DE VÁLVULA VENOSA

Para regeneración de válvulas venosas, una esponja de colágeno con células madre que incluye EPO y/o GCSF se enrolla alrededor de la vena de forma intraoperatoria. Ésta tiene una longitud de 2-3 cm y puede suturarse para aproximarse a la válvula insuficiente. Puede usarse además FGF, aunque no siempre es necesario.

Ejemplo 14: INGENIERÍA DE HUESO VERTEBRAL

El gel de células madre se inyecta en las vértebras aplastadas después de reposicionarlas de vuelta a su tamaño original. El gel polimeriza en su interior. Éste puede estar mezclado con polvos de colágeno y cualquier forma de material de sustitución ósea. Un factor de determinación de apoyo es vitamina D. El uso de BMP o derivados no es necesario pero una coaplicación con el otro factor y células madre de la apófisis es posible.

REIVINDICACIONES

1. Un método *ex vivo* para fabricar un implante individual obtenido por ingeniería de tejidos basado en una estructura de soporte natural o sintética como matriz para el crecimiento de células de tejido para la curación y remodelación sin cicatrices de tejido defectuoso o lesionado en un paciente por medio de células madre y células sanas obtenidas del paciente;
- 5 comprendiendo el método las etapas de:
- (i) proporcionar una preparación de células madre no expandidas autólogas recién preparadas obtenidas de la sangre periférica o células de la médula ósea del paciente a tratar, en el que las células madre son estimuladas incubando la preparación de células madre con eritropoyetina (EPO),
- 10 (ii) proporcionar una preparación de células sanas como células de copia obtenidas mediante biopsia del tejido defectuoso o lesionado del paciente a tratar, e incubar la preparación de células sanas con la matriz de soporte, cargando de este modo las células sanas sobre o en la matriz de soporte,
- 15 (iii) incubar la matriz de soporte pretratada de la etapa (ii) con la preparación de células madre de la etapa (i) en presencia de una composición que comprende (a) un factor nativo que estimula células madre, en el que este factor es EPO, (b) un factor nativo que recluta células madre e incrementa la disponibilidad de células madre, en el que este factor es G-CSF o GM-CSF, y (c) un factor nativo que promueve la diferenciación de células madre, en el que este factor es TGF- β , VEGF, vitamina E o vitamina C, y
- 20 (iv) proporcionar la matriz de soporte tratada de este modo para implantación en el paciente por un cirujano,
- en el que las etapas (i) a (iv) se llevan a cabo en condiciones estériles en la cámara de un biorreactor o una cabina de flujo de aire laminar durante un periodo a 10 a 30 minutos y simultáneamente a la preparación del paciente para la implantación de la matriz de soporte, o están en conjunción temporal con cirugía del paciente.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en el que la preparación de células madre y/o la preparación de células sanas se pretrató incubando la preparación de células con una composición que comprende EPO, G-CSF y TGF- β .
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa de incubación (iii) comprende la incubación con monocitos autólogos procedentes de sangre periférica (PBMC).
- 30 4. Un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los diferentes factores y/o diferentes células se proporcionan a la matriz de soporte mediante una formulación o composición viscosa similar a un gel o similar a un pegamento.
- 35 5. Un método de la reivindicación 4, en el que la formulación o la composición similar a un gel o similar a un pegamento se obtiene mediante polimerización después de la adición de Ca⁺⁺ o trombina.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las células madre son células madre positivas para CD90.
- 40 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la remodelación de tejido defectuoso o lesionado es un 40-50% más rápida respecto a los enfoques respectivos que no usan dichos factores de apoyo nativos.
- 45 8. Un implante individual obtenido por ingeniería de tejidos en base a una estructura de soporte natural o sintética que comprende células madre, células sanas de tejido lesionado o defectuoso de un paciente y factores nativos, en el que dicho implante está especificado y es obtenido mediante el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso para la curación y remodelación sin cicatrices de tejido defectuoso o lesionado en un paciente en paralelo a un tratamiento médico u operatorio en curso en un proceso cercano al paciente o intraoperatorio.
- 50 9. Un implante individual obtenido por ingeniería de tejidos para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que, después de la implantación, la matriz de soporte implantada es tratada con una composición similar a un gel o similar a un pegamento que comprende (i) una preparación de células madre autólogas no expandidas recién preparadas (ii) un factor que estimula las células madre y acelera la remodelación de células de tejido, en el que dicho factor es EPO, (iii) un factor que recluta e incrementa la disponibilidad de células madre, en el que este factor es G-CSF o GM-CSF y (iv) un factor que promueve la diferencia de células madre o sus progenitoras, en el que este factor es TGF- β , VEGF, vitamina C o vitamina E.
- 55
- 60

Figura 1:

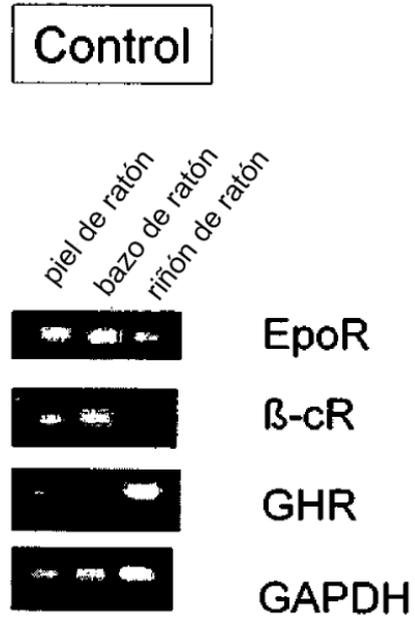


Figura 2:

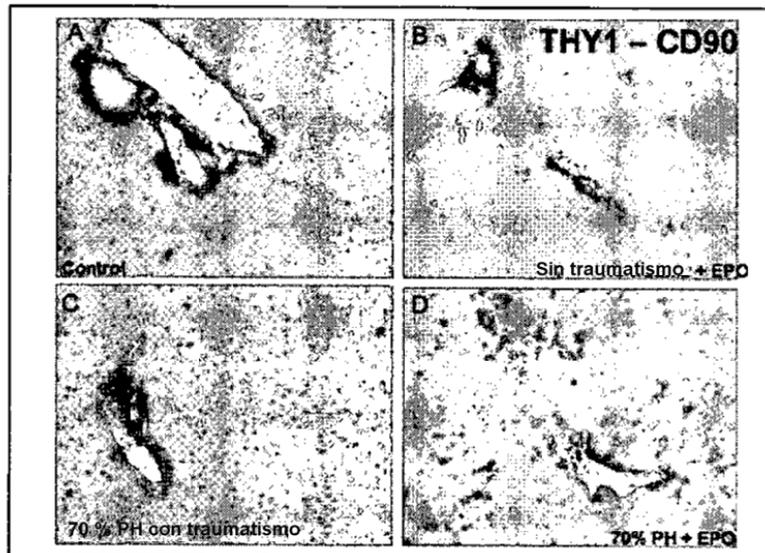


Figura 3:

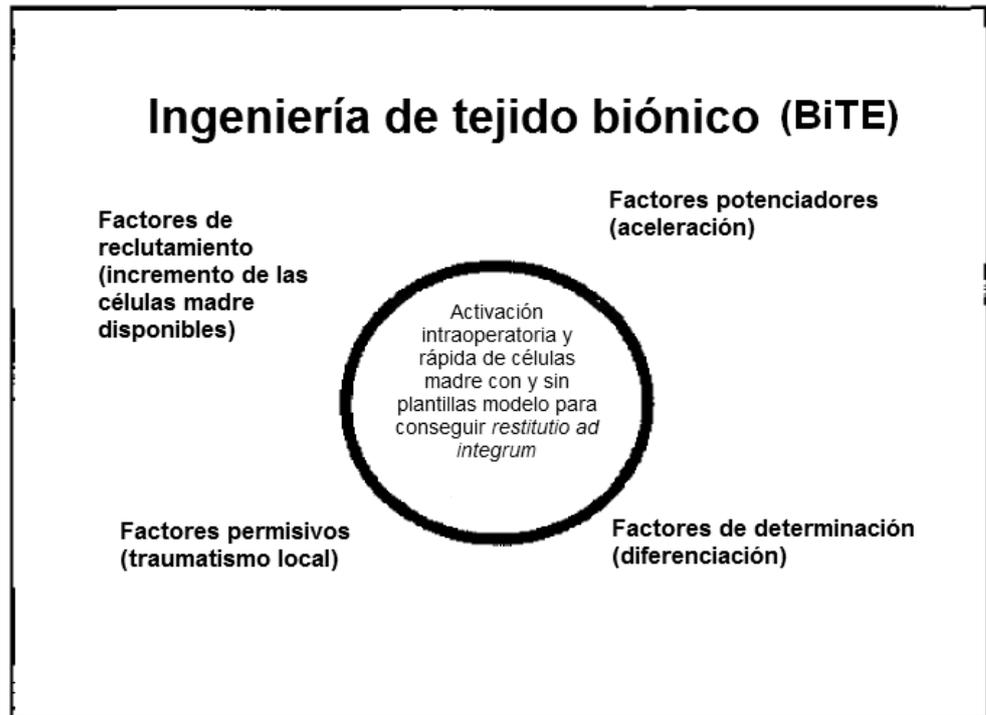


Figura 4:

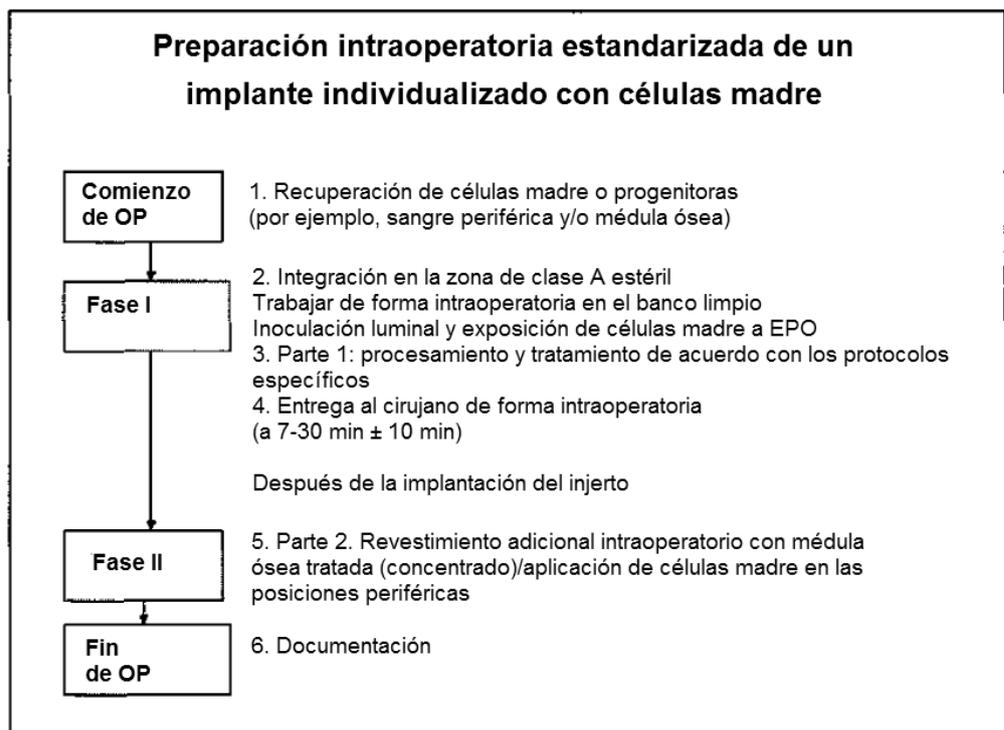
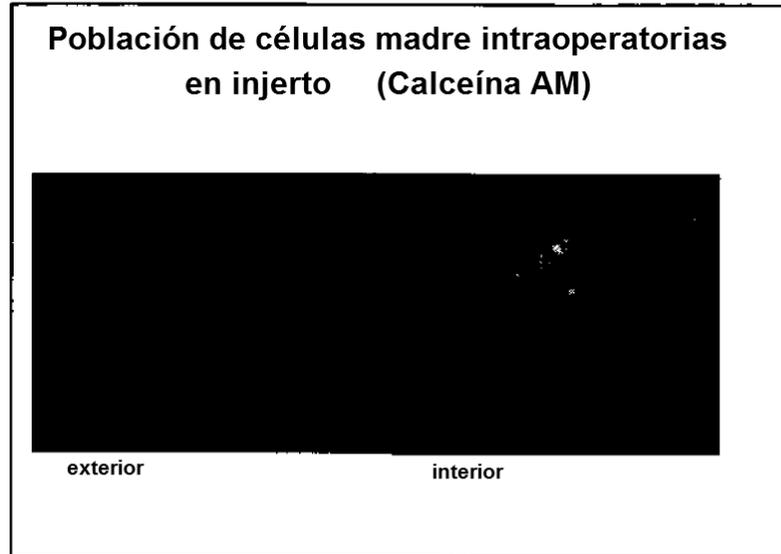


Figura 5 (a) (b):

(a)



(b)

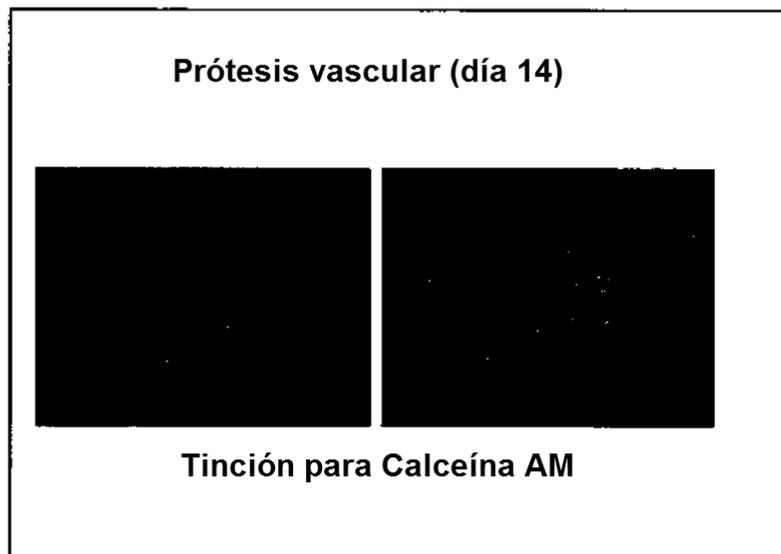


Figura 5 (c) (d):

(c)

**Prótesis vascular a las 4 semanas *in vivo*
(oveja) y vaso normal para comparación**



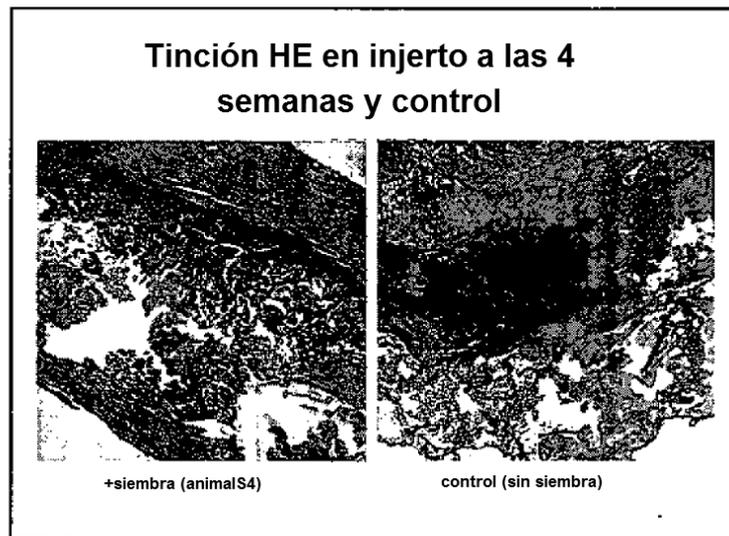
(d)

**Prótesis vascular (sin siembra) después
de 4 semanas *in vivo* (oveja)**



Figura 5 (e) (f):

(e)



(f)

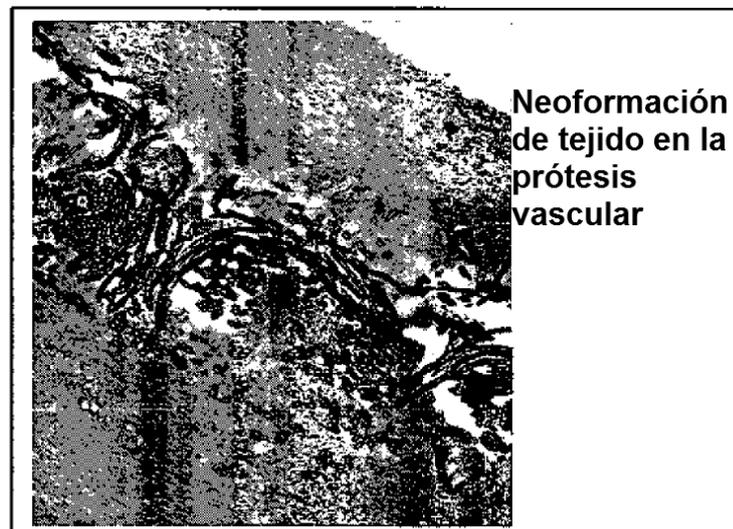
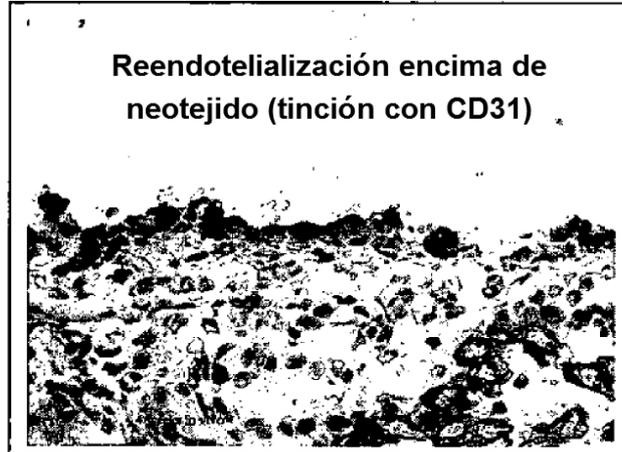


Figura 5 (g) (h):

(g)



(h)

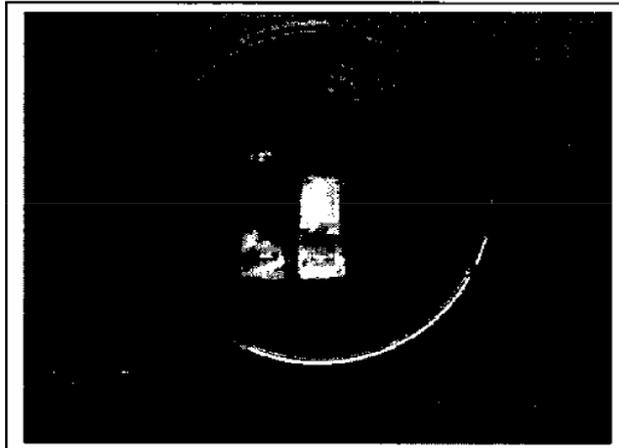
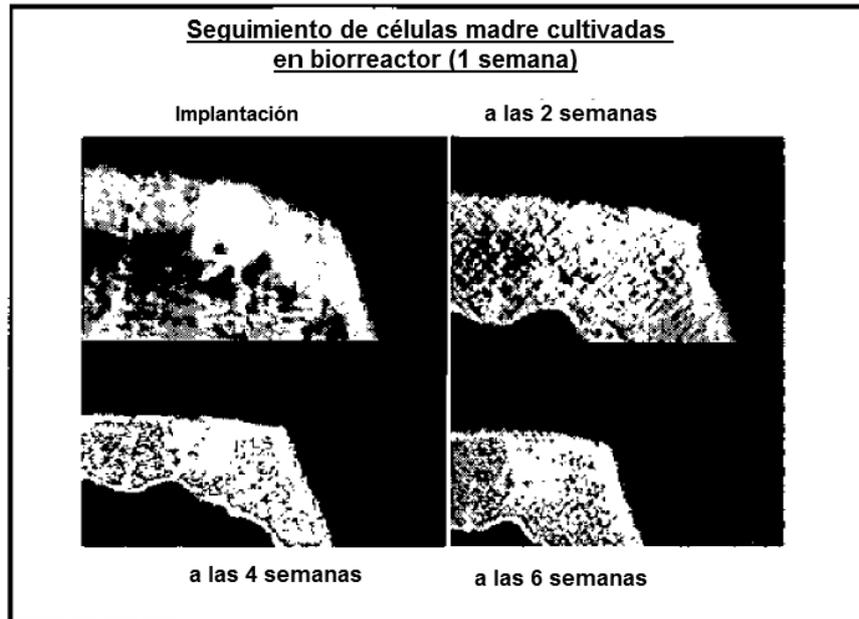


Figura 6:



Figura 7 (a) (b):

(a)



(b)

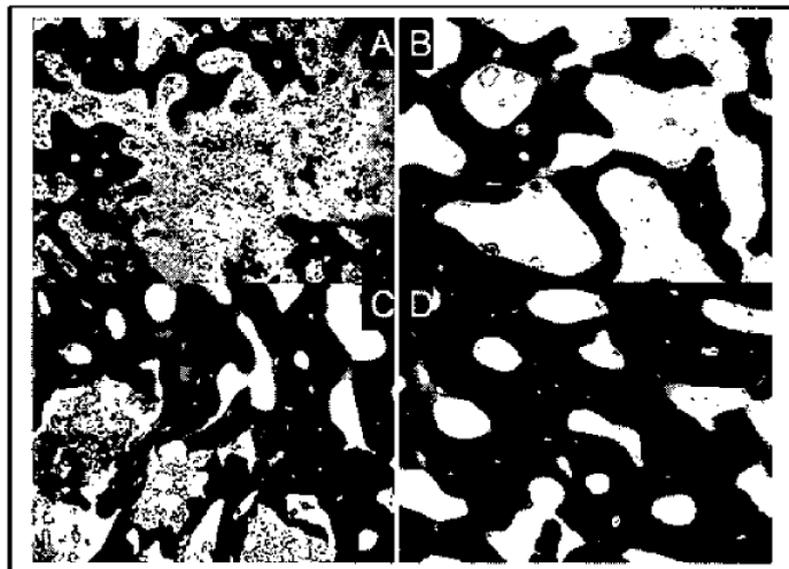
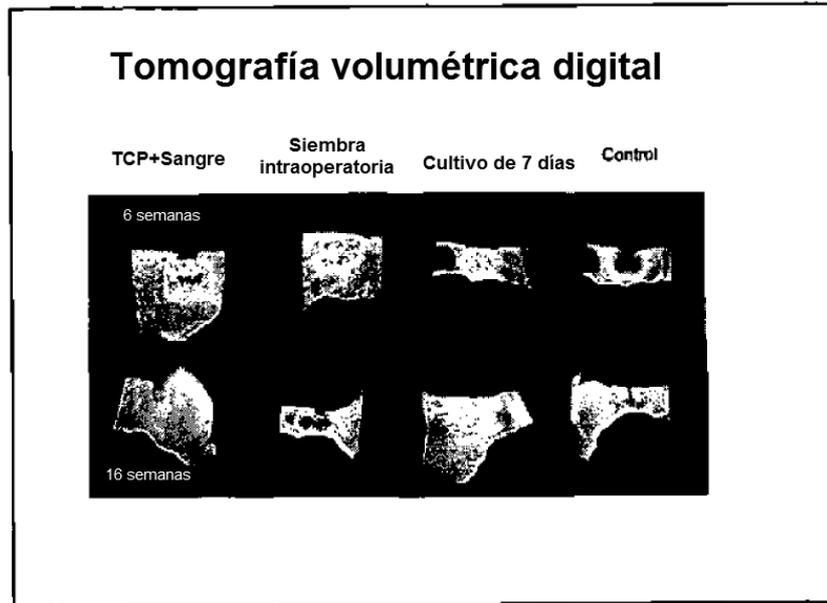


Figura 8 (a) (b):

(a)



(b)

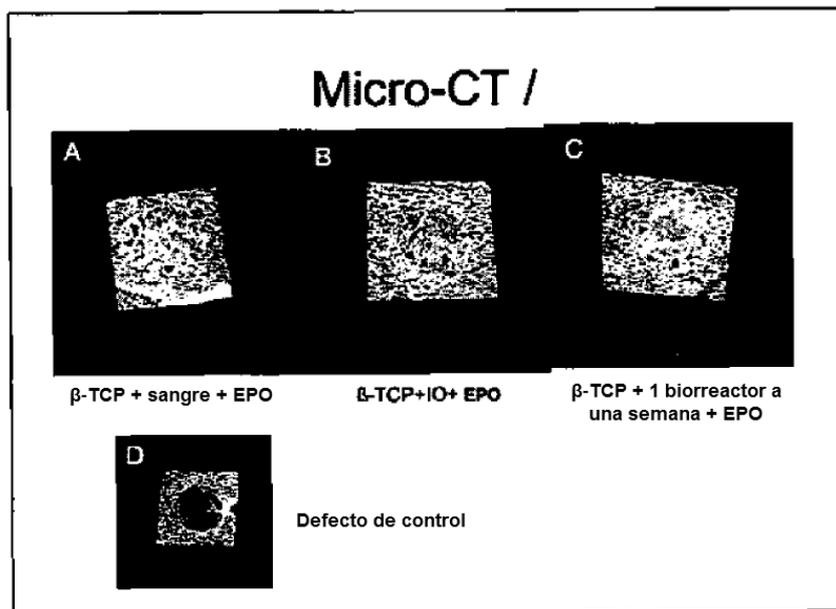
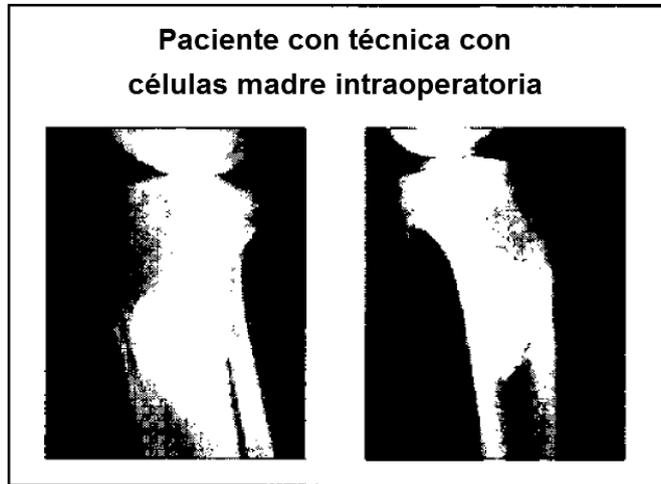
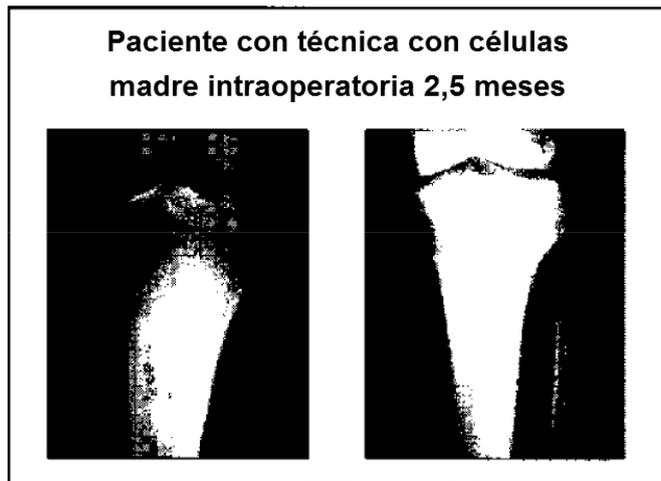


Figura 9 (a) (b) (c):

(a)



(b)



(c)



Figura 10:

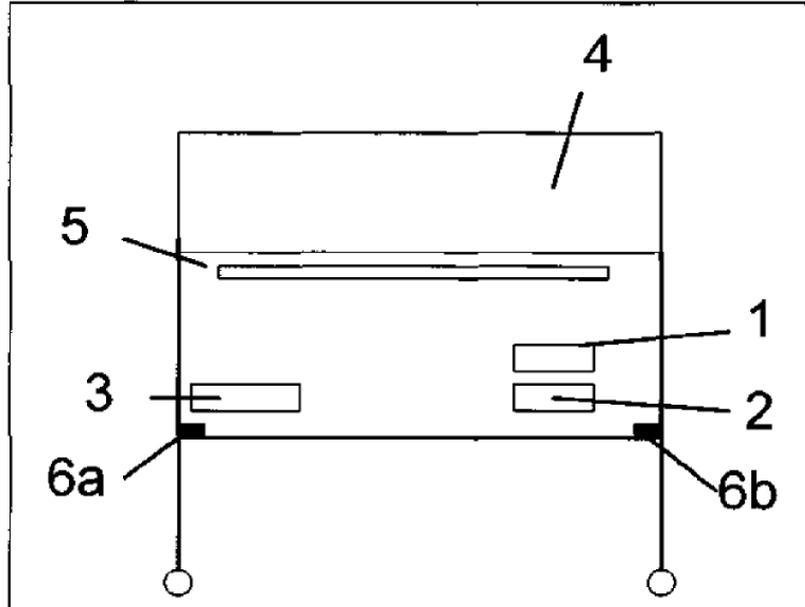
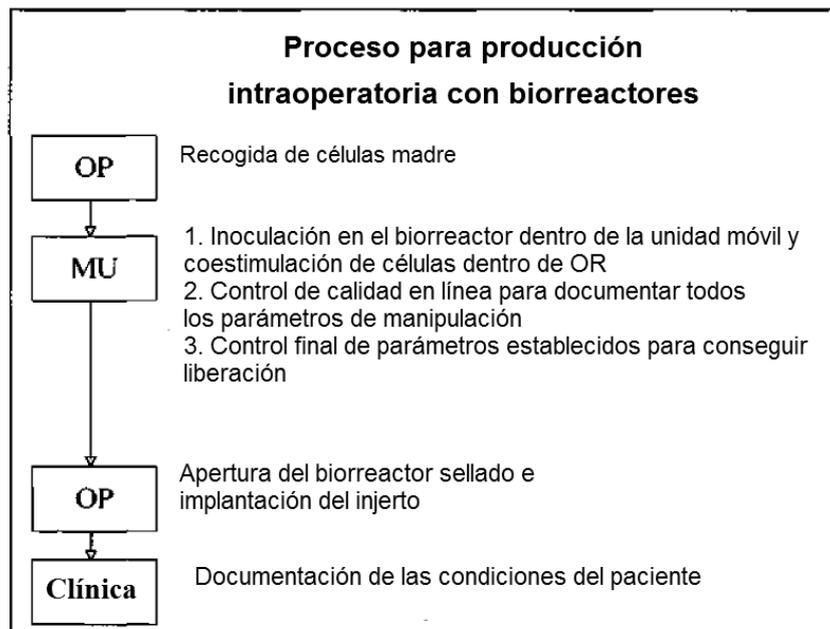


Figura 11:



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- *J Trauma*, 2008, vol. 65 (6), 1374-1378 [0065]

10