

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 547**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28 (2006.01)

A61K 35/35 (2015.01)

C12N 5/077 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2012 PCT/US2012/029568**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012 WO2012154301**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2012 E 12782247 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2686419**

54 Título: **Tejido microvascular alogénico para tratamientos de tejidos blandos**

30 Prioridad:

18.03.2011 US 201161454367 P

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

24.05.2017

73 Titular/es:

**MICROVASCULAR TISSUES, INC. (100.0%)
100 Cummings Center, Suite 215F
Beverly, MA 01915, US**

72 Inventor/es:

**PETERSON, DALE R. y
EMMITT, RICHARD B.**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 613 547 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

Tejido microvascular alogénico para tratamientos de tejidos blandos.

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] Esta solicitud se dirige a composiciones relacionadas con la reparación tisular mediante el uso de tejidos o células microvasculares alogénicos.

10 ANTECEDENTES

[0002] Las lesiones de los tendones son muy corrientes. Los esguinces cicatrizan espontáneamente, pero los desgarros totales resultan a menudo en discapacidad si no se tratan quirúrgicamente. A pesar de las reparaciones mediante cirugía, aproximadamente el 15 % de las reparaciones de tendones de Aquiles y el 40 % de las reparaciones del manguito de los dos tendones rotadores fracasan posteriormente. Además, los tendones reparados raramente recuperan los niveles de fuerza y funcionalidad anteriores a la lesión. Los intentos de mejorar la tasa de éxito han supuesto mejores anclajes de las suturas y el hueso, nuevos procedimientos quirúrgicos y parches para reforzar la reparación y proporcionar un armazón para el crecimiento infiltrante del tejido para engrosar el tendón. También hay informes sobre la mejora de la cicatrización de tendones con el uso de factores de crecimiento como BMP-2, BMP-12, PDGF-BB y bFGF en modelos preclínicos.

[0003] Aunque algunos investigadores han indicado el tendón como un posible tejido para hacer crecer con el uso de células madre mesenquimales (CMM), se ha realizado muy poco trabajo en esta línea. Todavía hay menos trabajo descrito con células madre o progenitoras derivadas de tejido adiposo u otros tejidos microvasculares. Se ha demostrado que las células frescas de tejido adiposo u otros tejidos microvasculares podrían usarse para la regeneración de tejidos ortopédicos. Otros investigadores han demostrado desde entonces que estas células ayudan al tratamiento de lesiones de tendones en modelos de lesiones tendinosas en caballos, así como otras dolencias. Estas células siempre eran autólogas o singénicas.

[0004] Sin embargo, el uso de células madre de procedencia autóloga es poco práctico. Requiere dos procedimientos quirúrgicos con el dolor, costes y morbilidad asociados. Además, existen riesgos en el envío del tejido al laboratorio para su procesamiento y un retraso en el tratamiento de la lesión o la enfermedad.

[0005] Recientemente, se han lanzado productos para injertos óseos que usan células de médula ósea no cultivadas de donantes alogénicos adsorbidas sobre esquiras óseas o matriz ósea desmineralizada (MOD). Sin embargo, este tipo de producto es inadecuado para la reparación de tejidos blandos y requiere una manipulación especial para la conservación de las células de médula ósea.

RESUMEN

40

[0006] La invención es según se define en las reivindicaciones 1-15 y se refiere a una composición que comprende un tejido microvascular procesado o criopreservado, en que dicho tejido microvascular es un tejido microvascular no cultivado mínimamente procesado que incluye una mezcla de células madre o progenitoras, en que la viabilidad de las células madre o progenitoras en el tejido microvascular es inferior al 50 %, para uso en la reparación o regeneración de tendones, ligamentos o piel, en que dicha composición tiene actividad cicatrizante de tejidos y no comprende hueso ni matriz derivada de hueso.

[0007] Las realizaciones de la invención descrita pueden incluir realizaciones con una o más de las características siguientes:

50

[0008] Uso de células madre o progenitoras alogénicas para la reparación o regeneración de tendones, ligamentos o piel.

[0009] Uso de tejido microvascular procesado para la reparación o regeneración de tendones, ligamentos o piel.

[0010] Uso de tejido microvascular procesado alogénico para la regeneración de tendones, ligamentos o piel.

[0011] Uso de células madre o progenitoras alogénicas desecadas y no cultivadas para la reparación o

regeneración de tendones, ligamentos o piel.

[0012] Un producto de tejido microvascular procesado que no contiene hueso ni matriz ósea adecuado para su implantación en un receptor alogénico o xenogénico.

5

[0013] Producción de tejido microvascular procesado de donantes en un proceso validado para prevenir la contaminación vírica entre lotes.

[0014] Producción de tejido microvascular procesado de donantes en un proceso que usa una única enzima, elimina las células sanguíneas o no usa ninguna enzima.

10

[0015] Un producto adecuado para su implantación en un paciente que contiene tejido microvascular procesado que es estable a temperatura ambiente durante más de un mes.

15

[0016] Una formulación desecada o liofilizada de tejido microvascular procesado.

[0017] Una formulación que comprende tejido microvascular procesado desecado a presiones hiperbáricas.

[0018] El uso de células madre o progenitoras inviables para la reparación o regeneración de tendones, ligamentos o piel.

20

[0019] El uso de células madre o progenitoras alogénicas o xenogénicas inviables para la reparación o regeneración de tendones, ligamentos o piel.

25

[0020] El uso de productos de células madre o progenitoras con menos del 50 % de viabilidad para la reparación o regeneración de tendones, ligamentos o piel.

[0021] El uso de tejido microvascular alogénico crioconservado para la reparación o regeneración de tendones o ligamentos.

30

[0022] Un producto adecuado para su implantación en un paciente humano que comprende tejido microvascular procesado con menos del 50 % de viabilidad.

[0023] Un producto adecuado para su implantación en un paciente humano que comprende células madre con membranas estabilizadas.

35

[0024] Combinación de un tejido microvascular procesado alogénico con un implante ortopédico; un armazón implantable flexible y poroso; un implante quirúrgico; agua pura; un implante recubierto poroso; una disolución de polímero; disolventes como DMSO, *N*-metilpirrolidona (NMP) y alcoholes; hidrogel; ácido hialurónico u otros glucosaminoglucanos o proteoglucanos; colágeno; fibrina; trombina, un coágulo sanguíneo; plaquetas; plasma rico en plaquetas; para su implantación en un paciente.

40

[0025] Combinación de un tejido microvascular procesado alogénico con uno de los excipientes siguientes: trehalosa, sacarosa, manitol u otros azúcares; glicoles; DMSO, aldehídos; albúmina.

45

[0026] Tejido microvascular procesado alogénico o xenogénico para la reparación o regeneración de tejidos microvasculares distintos del hueso en pacientes.

[0027] Se describe un procedimiento para la reparación o regeneración de un tejido (por ejemplo, tendón, ligamento o piel) que comprende la aplicación de una pluralidad de células madre o progenitoras alogénicas no cultivadas al tejido, con lo que se efectúa la reparación o regeneración del tejido, en comparación con un tejido de control al que no se aplican las células madre o progenitoras alogénicas no cultivadas. La pluralidad de células madre o progenitoras alogénicas no cultivadas puede estar incluida en un tejido microvascular procesado o crioconservado. La pluralidad de células madre o progenitoras alogénicas no cultivadas puede incluir células xenogénicas.

50

55

[0028] En algunas realizaciones, la pluralidad de células madre o progenitoras alogénicas no cultivadas para uso en un procedimiento descrito puede tener menos del 50 % de viabilidad o no incluir sustancialmente células viables.

- 5 **[0029]** Se describe un procedimiento para la reparación o regeneración de un tejido (por ejemplo, tendón, ligamento o piel) que comprende la aplicación de una composición que comprende membranas celulares sustancialmente intactas de células madre o progenitoras inviables al tejido, con lo que se efectúa la reparación o regeneración del tejido, en comparación con un tejido de control al que no se aplica la composición. Las células madre o progenitoras inviables pueden estar incluidas en un tejido microvascular procesado o crioconservado.
- 10 **[0030]** La composición para uso en un procedimiento descrito comprende menos del 50 % de células viables o puede no incluir sustancialmente células viables.
- 15 **[0031]** En algunas realizaciones, una composición para uso en un procedimiento descrito puede ser estable a temperatura ambiente y mantener la actividad cicatrizante de tejidos durante al menos un mes.
- 20 **[0032]** En algunas realizaciones, una composición para uso en un procedimiento descrito puede incluir células madre o progenitoras inviables que han sido desecadas o liofilizadas.
- 25 **[0033]** En algunas realizaciones, una composición para uso en un procedimiento descrito puede incluir células madre o progenitoras inviables que han sido tratadas para prevenir la contaminación microbiana.
- 30 **[0034]** En algunas realizaciones, una composición para uso en un procedimiento descrito puede incluir además un excipiente o un armazón implantable.
- 35 **[0035]** En algunas realizaciones, la actividad cicatrizante de tejidos en un procedimiento descrito comprende la mejora de la cicatrización de un tejido blando expuesto a la composición, en comparación con un tejido análogo tratado de forma similar pero sin exposición a la composición.
- 40 **[0036]** En una realización, se proporciona una composición que comprende una pluralidad de células madre o progenitoras no cultivadas formulada para su implantación en un receptor alógeno o xenogénico, en que la composición tiene actividad cicatrizante de tejidos y no incluye hueso ni matriz derivada de hueso.
- 45 **[0037]** En otra realización, se proporciona una composición que comprende membranas celulares sustancialmente intactas de células madre o progenitoras inviables formulada para su implantación en un receptor alógeno o xenogénico, en que la composición tiene actividad cicatrizante de tejidos. En algunas realizaciones, un componente interno de las células madre o progenitoras inviables puede estar incluido en la composición.
- 50 **[0038]** En algunas realizaciones, una composición proporcionada en este documento puede constar de células madre o progenitoras que están incluidas en un tejido microvascular procesado o crioconservado.
- 55 **[0039]** La composición proporcionada en este documento incluye menos del 50 % de células viables. En algunas realizaciones, una composición proporcionada en este documento puede no incluir sustancialmente células viables.
- [0040]** En algunas realizaciones, una composición proporcionada en este documento puede ser estable a temperatura ambiente y mantener la capacidad cicatrizante de tejidos durante al menos un mes.
- [0041]** En algunas realizaciones, la actividad cicatrizante de tejidos de una composición proporcionada en este documento comprende la mejora de la cicatrización de un tejido blando expuesto a la composición, en comparación con un tejido análogo tratado de forma similar pero sin exposición a la composición.
- [0042]** En algunas realizaciones, una composición proporcionada en este documento puede incluir células madre o progenitoras que han sido desecadas o liofilizadas.
- [0043]** En algunas realizaciones, una composición proporcionada en este documento puede incluir además un excipiente o un armazón implantable.
- [0044]** En algunas realizaciones, una composición proporcionada en este documento puede incluir células madre o progenitoras que han sido tratadas para prevenir la contaminación microbiana.
- [0045]** Aunque se desvelan múltiples realizaciones, otras realizaciones más de la presente invención serán

evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción detallada que muestra y describe realizaciones ilustrativas de la invención. Por consiguiente, los dibujos y la descripción detallada han de considerarse como de naturaleza ilustrativa y no restrictiva.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0046]

10 La figura 1 muestra tinciones de hematoxilina y eosina (H+E) del tendón de Aquiles y el tejido asociado en secciones de muestras del control quirúrgico, el control con armazón y el armazón más células de tejido microvascular (mVasc).
 La figura 2 muestra tinciones tricrómicas del tendón de Aquiles y el tejido asociado en secciones de muestras del control quirúrgico, el control con armazón y el armazón más células de tejido microvascular (mVasc).
 15 La figura 3 muestra tinciones de H+E del tendón de Aquiles y el tejido asociado en secciones de muestras del armazón más células de tejido microvascular, que muestran el crecimiento de estructuras similares a la piel en el armazón.
 La figura 4 muestra una tinción tricrómica del tendón de Aquiles y el tejido asociado en una sección de una muestra del armazón más células de tejido microvascular, que muestra el crecimiento de una estructura similar al hueso en el armazón donde estaba unido al calcáneo.
 20 La figura 5 muestra una tinción inmunohistoquímica de la expresión de tenascina en el tendón de Aquiles y el tejido asociado en secciones de muestras del control quirúrgico, el control con armazón y el armazón más células de tejido microvascular (mVasc).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

25 **[0047]** En este documento se describe una composición para uso según se define en las reivindicaciones 1-15.

30 **[0048]** Se describe un proceso que genera tejido microvascular procesado o crioconservado alogénico (es decir, alogénico o xenogénico), que está disponible listo para usar cuando se necesita. También se describe el uso del tejido microvascular alogénico procesado o crioconservado para la cicatrización de tejidos blandos (por ejemplo, tendón, ligamento, piel). El tejido microvascular procesado o crioconservado proporcionado en este documento es un tejido microvascular no cultivado, procesado mínimamente que incluye una mezcla de células madre y/o progenitoras producidas a partir de la disociación (por ejemplo, por digestión enzimática) de un tejido microvascular
 35 (por ejemplo, tejido adiposo, tendinoso o muscular). El tejido microvascular procesado o crioconservado puede incluir moléculas adicionales (por ejemplo, moléculas de la matriz extracelular enteras o fragmentadas, factores de crecimiento o moléculas de la superficie celular).

40 **[0049]** El término “tejido microvascular procesado”, según se usa en este documento, se refiere a tejido microvascular que se disocia según se describe en este documento y después se deseca, por ejemplo, mediante una técnica de liofilización o de desecación por pulverización. El término “tejido microvascular crioconservado”, según se usa en este documento, se refiere a tejido microvascular que se disocia según se describe en este documento y después se crioconserva mediante técnicas conocidas. El tejido microvascular procesado y el tejido microvascular crioconservado tienen actividad cicatrizante (por ejemplo, de reparación o regeneración) de tejidos
 45 blandos.

[0050] Según se usa en este documento, la “actividad cicatrizante de tejidos” de un tejido microvascular procesado es la capacidad que tiene el tejido microvascular proporcionado de facilitar una mejora de la cicatrización (por ejemplo, reparación o regeneración) de un tejido (por ejemplo, tejido blando) expuesto al tejido microvascular
 50 procesado proporcionado, en comparación con un tejido análogo tratado de forma similar pero sin exposición a un tejido microvascular procesado. La mejora de la cicatrización se mide por cualquier medio apropiado, como el tiempo hasta la cicatrización completa, la cantidad generada de tejido nuevo, la resistencia del tejido cicatrizado resultante o la funcionalidad del tejido cicatrizado resultante. Los tejidos blandos incluyen tendones, ligamentos, aponeurosis, piel, tejidos fibrosos, grasa, membranas sinoviales, músculo, nervios y vasos sanguíneos. Las lesiones de tejidos
 55 blandos que pueden beneficiarse de la actividad cicatrizante de tejidos blandos de los tejidos microvasculares procesados proporcionados incluyen, sin limitación, lesiones como los desgarros de tendones y/o ligamentos.

[0051] Las células madre alogénicas y xenogénicas no se han usado previamente para facilitar la reparación de los tejidos blandos como ligamentos o tendones, debido a la dificultad de producir nuevo tejido blando con células

madre autólogas y por la apreciación de que las células madre alogénicas y xenogénicas serían rechazadas. Además, la investigación sobre la conservación de células madre por liofilización se ha llevado a cabo en células madre hematopoyéticas purificadas con el fin de aumentar la viabilidad. En contraste, el proceso y la composición descritos en este documento no dependen de células madre purificadas o de la viabilidad celular. Más bien, el proceso proporcionado se usa para producir un tejido microvascular procesado o crioconservado que contiene una mezcla de células, incluidas células inviables, células madre mesenquimales y células progenitoras, y otras moléculas secretadas por dichas células (por ejemplo, citocinas, factores de crecimiento, moléculas quimiotácticas y similares). El tejido microvascular procesado o crioconservado contiene una mezcla de células viables e inviables.

10 **[0052]** Al igual que las infusiones de células madre autólogas, las células madre y/o progenitoras alogénicas en el tejido microvascular procesado o crioconservado proporcionado no persisten en el paciente durante largo tiempo, sino que desencadenan una cascada de respuestas en dicho paciente que conducen a una mejora de la cicatrización. El tejido microvascular procesado o crioconservado descrito en este documento no necesita incluir células madre viables o enteras para inducir la mejora de la cicatrización de los tejidos blandos.

15

[0053] El tejido microvascular procesado o crioconservado descrito en este documento puede producirse por disociación de un tejido microvascular. En algunas realizaciones, el tejido microvascular se digiere enzimáticamente con una o más enzimas. Las enzimas adecuadas incluyen aquellas que contribuyen a la disociación celular, como colagenasas y proteasas neutras. Los procesos de digestión enzimática pueden ajustarse para aumentar o disminuir la disociación celular. Por ejemplo, si se desea una disociación celular más completa, puede incluirse más de una enzima o puede aumentarse el tiempo de digestión. Aunque no es necesario mantener la viabilidad celular, en algunas realizaciones se desea generalmente que las membranas celulares se mantengan generalmente intactas, para preservar las membranas que contienen moléculas de unión y señalización, incluso aunque se produzca algo de lisis celular durante la digestión enzimática. Por lo tanto, el uso de enzimas como las lipidasas puede no ser útil en un proceso semejante, de acuerdo con una realización de la presente invención.

[0054] Alternativamente, el tejido microvascular puede disociarse sin el uso de enzimas. Más bien, el tejido microvascular puede disociarse por medios físicos o químicos, incluido el uso de quelantes, agitación ultrasónica o disociación celular mecánica.

30

[0055] La obtención de tejido microvascular donante y su subsiguiente tratamiento puede incluir etapas para prevenir la contaminación microbiana (por ejemplo, bacteriana, fúngica o vírica). Por ejemplo, los donantes pueden analizarse para determinar la presencia de una lista predeterminada de microorganismos (por ejemplo, VIH, VPH, VEB, TB, etc.) antes del procesamiento. Este análisis puede llevarse a cabo con el uso de técnicas conocidas, como la detección de la presencia de un ácido nucleico microbiano mediante la reacción en cadena de la polimerasa o la detección de la presencia de una molécula asociada con un microorganismo concreto mediante ELISA. El tejido microvascular contaminado puede excluirse del uso, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención. Adicionalmente, el tejido microvascular procesado o crioconservado puede producirse usando técnicas asépticas o estériles.

40

[0056] Después de la disociación, el tejido microvascular puede tratarse posteriormente para eliminar las células o moléculas indeseadas, como células sanguíneas, lípidos o adipocitos. El tratamiento adicional dependerá de la fuente de tejido microvascular. Por ejemplo, si la fuente de tejido microvascular es tejido adiposo, el tejido microvascular disociado puede centrifugarse con una fuerza relativamente baja para separar los lípidos, adipocitos y algunos preadipocitos del resto del tejido microvascular. En otras realizaciones, pueden usarse protocolos de aislamiento de células musculares conocidos, como el uso de centrifugación en gradiente de densidad, para tratar posteriormente el tejido muscular después de la digestión enzimática para eliminación de las células musculares y enriquecimiento de las células deseadas.

50 **[0057]** Una vez que se ha preparado el tejido microvascular, se conserva desecado mediante una técnica de liofilización o de desecación por pulverización para producir el tejido microvascular procesado, o se crioconserva. Al conservar el tejido microvascular, puede usarse cualquier excipiente apropiado, incluidos azúcares (por ejemplo, trehalosa, manitol, sacarosa), polialcoholes (por ejemplo, polietilenglicol), aldehídos, proteínas (por ejemplo, albúmina), aminoácidos (por ejemplo, glicina), tensioactivos (por ejemplo, Tween 20), DMSO y/o permanganatos.

55

[0058] Típicamente, la liofilización supone cuatro etapas: pretratamiento, congelación, desecación primaria y desecación secundaria. El pretratamiento puede incluir el ajuste de la concentración o la adición de uno o más excipientes. Después del pretratamiento, el tejido microvascular se congela. La etapa de congelación se realiza típicamente de forma cuidadosamente controlada (por ejemplo, con una velocidad de enfriamiento de

aproximadamente -0,5 °C por minuto a aproximadamente -50 °C por minuto) para conservar la estructura celular, aunque la viabilidad celular no necesite conservarse. En algunas realizaciones, el tejido microvascular se congela a una velocidad de enfriamiento de aproximadamente -10 °C por minuto. La velocidad de enfriamiento puede ajustarse de acuerdo con el tejido microvascular concreto y los excipientes usados. El tejido microvascular puede congelarse usando cualquier medio apropiado, incluido el uso de refrigeración mecánica y/o la exposición de un recipiente que contiene el tejido microvascular a hielo seco o nitrógeno líquido hasta que alcanza una temperatura adecuada para la liofilización.

[0059] Durante la etapa de desecación primaria, la temperatura y la presión se ajustan para suministrar condiciones adecuadas para que se produzca la sublimación del agua del tejido microvascular. La temperatura y presión específicas pueden ajustarse para acomodarse al excipiente usado y/o a la concentración del tejido microvascular.

[0060] Durante la etapa de desecación secundaria, la temperatura y la presión pueden ajustarse adicionalmente para facilitar la eliminación del agua no congelada del tejido microvascular. El contenido final de agua después de la etapa de desecación secundaria está preferentemente entre el 1 % y el 4 % en peso, pero puede ajustarse con el fin de maximizar el tiempo de conservación o la actividad cicatrizante de tejidos blandos.

[0061] En algunas realizaciones, el tejido microvascular se deseca por pulverización. Antes de la desecación por pulverización, el tejido microvascular puede pretratarse de manera similar al tejido microvascular que va a liofilizarse, con los excipientes elegidos como apropiados para la desecación por pulverización, más que para liofilización. Durante la desecación por pulverización, el tejido microvascular se atomiza en pequeñas gotas y se somete a aire caliente en una cámara de desecación.

[0062] En algunas realizaciones, el tejido microvascular no se procesa por desecación sino que se crioconserva. Los procedimientos para la crioconservación de tejidos son conocidos. Por ejemplo, el tejido microvascular se mezcla con uno o más excipientes (por ejemplo, DMSO) y se enfría de forma cuidadosamente controlada. En algunas realizaciones, el enfriamiento se lleva a cabo en dos o más etapas en que la primera etapa se lleva a cabo de forma controlada (por ejemplo, reduciendo la temperatura a razón de 1 °C por minuto) hasta una temperatura intermedia (por ejemplo, -30 °C) y en la segunda etapa se transfieren las células a la temperatura intermedia a una temperatura de almacenamiento inferior (por ejemplo, -196 °C).

[0063] El tejido microvascular crioconservado se almacena a una temperatura adecuada para mantener el estado de crioconservación (por ejemplo, de aproximadamente -30 °C a -196 °C). El tejido microvascular procesado, liofilizado o desecado por pulverización, puede almacenarse en condiciones más diversas que las células crioconservadas, las células vivas o el tejido fresco. Las temperaturas adecuadas para el almacenamiento del tejido microvascular procesado incluyen temperaturas de aproximadamente -100 °C a aproximadamente 45 °C. En algunas realizaciones, el tejido microvascular procesado, liofilizado o desecado por pulverización, puede almacenarse a temperatura ambiente. El tiempo de conservación del tejido microvascular procesado proporcionado es de al menos una semana y, preferentemente, de al menos un mes, mientras se mantiene la actividad cicatrizante de tejidos.

[0064] Adicionalmente, dado que no se requiere viabilidad para la adecuación del tejido microvascular procesado o crioconservado para su uso en la reparación de tejidos blandos, el proceso de conservación y el almacenamiento no necesitan ajustarse para el mantenimiento de la viabilidad. El porcentaje de células viables en el tejido microvascular proporcionado antes de su procesamiento o crioconservación puede ser de hasta el 100 %. Después del procesamiento o la crioconservación, es inferior al 50 %, por ejemplo, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 % o inferior al 10 %. En algunas realizaciones, el tejido microvascular procesado proporcionado no contiene células viables después del procesamiento o la crioconservación.

[0065] Además, se proporcionan procedimientos de uso del tejido microvascular procesado. El tejido microvascular procesado puede aplicarse directamente a un tejido que necesita reparación o puede aplicarse al tejido alrededor de un tejido tal que necesita reparación. En algunas realizaciones, un tejido microvascular procesado desecado se reconstituye en un vehículo adecuado (por ejemplo, agua o disolución salina) y se aplica directamente a un tejido que necesita reparación. En algunas realizaciones, el tejido microvascular procesado reconstituido se aplica a un armazón, como una matriz de colágeno o una tela biocompatible, antes de su aplicación a un tejido. En otras realizaciones, un tejido microvascular procesado se usa para recubrir un material, como un armazón biocompatible flexible (por ejemplo, láminas de tela tejida o no tejida o hebras), microesferas o partículas biocompatibles o un dispositivo médico implantable. El tejido microvascular procesado desecado por pulverización

es especialmente adecuado para el recubrimiento de un material que comprende microesferas o partículas, sin requerir su reconstitución antes del recubrimiento, ya que el recubrimiento puede llevarse a cabo durante el proceso de desecación por pulverización.

5 **[0066]** El tejido microvascular procesado o crioconservado puede combinarse con cualquier dispositivo o material adecuado antes de implantarlo en un paciente. El tejido microvascular procesado o crioconservado puede combinarse con un implante ortopédico; un armazón implantable flexible poroso; un implante quirúrgico; agua pura; disolución salina; un implante recubierto poroso; una disolución de polímero; disolventes como DMSO, *N*-metilpirrolidona (NMP) y alcoholes; hidrogel, ácido hialurónico u otros glucosaminoglucanos o proteoglucanos; 10 colágeno; fibrina; trombina; coágulos sanguíneos; plaquetas, plasma rico en plaquetas; células autólogas.

[0067] El tejido microvascular procesado o crioconservado puede envasarse solo, por ejemplo, en un vial, o en combinación con otros productos como aquellos citados como adecuados para su combinación con tejido microvascular procesado o crioconservado. Cuando se envasa con otro material, el tejido microvascular procesado o 15 crioconservado puede envasarse por separado o premezclado o asociado con el otro material. En algunas realizaciones, el tejido microvascular procesado se envasa como recubrimiento sobre un material biocompatible.

[0068] Los siguientes ejemplos tienen como objetivo ilustrar realizaciones específicas y no pretenden limitar el alcance de la invención. 20

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Preparación de tejido microvascular liofilizado.

25 Preparación de células de tejido microvascular

[0069] Se preparó tejido microvascular de rata a partir de almohadillas de grasa epididimaria o almohadillas de grasa inguinal. Brevemente, se puso colagenasa de Worthington (lote #4145) en una disolución de tampón de fosfato salino a 1 mg/ml, lo que resultó en una disolución con una actividad específica de 40 U/ml. Esta disolución de 30 colagenasa se aplicó a la grasa (las almohadillas inguinales y epididimarias se procesaron por separado) en la misma relación de volumen y peso y se incubó a 4 °C durante 45 minutos mientras se mezclaba. La actividad de la colagenasa se detuvo con albúmina de suero bovino al 25 % y las células se sedimentaron por centrifugaron. Según se evaluó por exclusión de azul de tripano, las células recogidas de las almohadillas de grasa epididimaria tenían una viabilidad de aproximadamente el 75 %, mientras que las células recogidas de las almohadillas de grasa 35 inguinal tenían una viabilidad de aproximadamente el 80 %. Las células se resuspendieron y se contaron. La grasa epididimaria produjo aproximadamente 720.000 células por ml y la grasa inguinal produjo aproximadamente 215.000 células por ml.

[0070] El tejido microvascular humano puede prepararse usando material procedente de liposucción, tratado 40 enzimáticamente de manera similar al tejido microvascular de rata.

Liofilización de células de tejido microvascular

[0071] Las células recogidas se prepararon para liofilización en el medio de conservación (6,8 % de trehalosa, 45 2 % de hidroxietilalmidón, 5 % de albúmina y 1 unidad/ml de heparina) y se pusieron en viales de vidrio con cierres de tapón y precintos plegables adecuados para liofilización. Para liofilizar las células, la temperatura del liofilizador se hizo descender de 23 °C a -45 °C a una velocidad de 2,5 °C por minuto. La temperatura se mantuvo a -45 °C durante 3 horas, a lo que siguió una primera etapa de desecación. Durante la primera etapa de desecación, la temperatura se aumentó de -45 °C a -35 °C a una velocidad de 2,5 °C por minuto y la presión se redujo a 10,67 kPa 50 (80 torr) y la temperatura y la presión se mantuvieron durante 36 horas. Después se llevó a cabo una etapa de desecación secundaria aumentando la temperatura de -35 °C a -5 °C a una velocidad de 0,2 °C por minuto y entonces se mantuvo a 5 °C durante 6 horas. Después de la segunda etapa de desecación, los viales se taponaron y precintaron en atmósfera de nitrógeno.

55 Evaluación de la viabilidad de las células del tejido microvascular

[0072] Dos días después de la liofilización, las células se rehidrataron y la viabilidad celular inicial se evaluó por exclusión de azul de tripano. La funcionalidad metabólica celular se evaluó por medición del metabolismo de alamarBlue® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células

rehidratadas se incubaron en el medio M3:10TM (Incell, San Antonio, TX, EE. UU.) enriquecido con suero bovino fetal al 10 % en un frasco T-25 a 37 °C durante siete días para evaluar su capacidad de proliferación.

5 **[0073]** Después de la rehidratación, la estructura general de las células se mantuvo en el 5-25 % de las células, siendo un cálculo más exacto difícil debido a la aparición de numerosas células rotas. La viabilidad inicial de las células fue inferior al 1-2 %, con pocas células que retenían la capacidad de excluir el azul de tripano. La morfología de aquellas células que mantenían la capacidad de exclusión del azul de tripano sugirió que experimentaban apoptosis, mostrando núcleos engrosados y proyecciones nucleares y citoplásmicas. No se observó una capacidad significativa de metabolización de alamarBlue®, lo que indica que la integridad metabólica de las
10 células liofilizadas no se mantuvo. Ninguna de las células fue capaz de establecer un cultivo en el medio M3:10TM, lo que confirma la baja viabilidad/inviabilidad de las células liofilizadas.

Ejemplo 2. Tratamiento de lesiones tendinosas mediante tejido microvascular crioconservado. Preparación de células de tejido microvascular

15

[0074] Las células de tejido microvascular se prepararon a partir de almohadillas de grasa epididimaria de rata según se describe en el ejemplo 1. Las células se crioconservaron mediante su resuspensión en el medio definido M3DEF sin complementos (Incell) y la adición de un volumen igual de EZ-CPZ (Incell), con una concentración final de DMSO del 5 %. A continuación, las células se congelaron lentamente en viales en una caja de enfriamiento lento
20 durante la noche a -80 °C y después se transfirieron a -130 °C. Se determinó que la viabilidad de las células crioconservadas era inferior al 50 % mediante exclusión de azul de tripano. Antes de la preparación, la viabilidad era típicamente del 90 %.

Preparación de material de armazón impregnado con células de tejido microvascular.

25

[0075] El material de armazón recubierto de colágeno BioFiber® (Tornier) se puso en la parte superior de un grueso material de gasa colocado en PBS. El material de armazón se prehumedeció con PBS antes de la adición de las células de tejido microvascular.

30 **[0076]** Las células se descongelaron rápidamente a 37 °C, se centrifugaron a 400 x g durante 5 minutos y se resuspendieron a 1 x 10⁶ células por ml en tampón de fosfato salino (PBS). Las células resuspendidas se aplicaron al material de armazón prehumedecido a razón de 100 µl de las células suspendidas por cm² del material de armazón y se les permitió absorberse en el material de armazón con la gasa debajo de dicho material de armazón actuando como mecha.
35

[0077] El material de armazón se mantuvo húmedo con PBS y se dejó incubar durante 15-20 minutos a 37 °C y con el 5 % de CO₂ en una cámara húmeda. El material de armazón impregnado con las células de tejido microvascular se mantuvo húmedo y en condiciones asépticas hasta su uso en un modelo de tendón de Aquiles.

40 Modelo de lesión del tendón de Aquiles

[0078] Antes del tratamiento, se pesaron 32 animales y se asignaron al azar a cuatro grupos de tratamiento. La pata trasera derecha de los animales se afeitó un día antes del comienzo de la prueba. Antes de la intervención quirúrgica el día 1, los animales se pesaron y se anestesiaron con una inyección intramuscular de 100 mg/ml (40-90
45 mg/kg) de clorhidrato de ketamina y 100 mg/ml (5-10 mg/kg) de xilacina. También se usó inducción con máscara o en cámara con isoflurano. La piel se preparó quirúrgicamente restregando con povidona yodada y alcohol y se entalló de acuerdo con técnicas quirúrgicas asépticas.

[0079] El material de armazón impregnado con células de tejido microvascular se preparó inmediatamente antes de la implantación. El injerto se recortó a 10 mm x 11 mm y se hicieron muescas en dos de las esquinas. Se pusieron dos suturas de polipropileno 5-0 en el injerto para fijarlo. Después, el injerto se enrolló para formar una estructura cilíndrica para envolver alrededor del tendón de Aquiles. El injerto se dejó aparte en la placa Petri con disolución salina y se cubrió hasta su uso.
50

55 **[0080]** Se hizo una incisión lateral y recta en la piel desde la tibia caudal (distal) de la pata trasera derecha hasta el nivel de la tibia media. La piel se diseccionó y se retrajo para permitir una exposición lateral del tendón de Aquiles desde el calcáneo hasta la unión musculotendinosa. El tendón de Aquiles expuesto se erosionó ligeramente con unas pinzas de diente de ratón antes de la colocación del artículo de prueba como injerto. Se hizo un orificio perforado de 0,5 mm en dirección lateral a medial a través del calcáneo para permitir el paso de la sutura para la

fijación del injerto. La zona del implante se irrigó con disolución salina para eliminar cualquier residuo y se secó con material absorbente.

[0081] El injerto se retiró de la disolución salina y seguidamente se envolvió alrededor del talón de Aquiles con los extremos con muescas adyacentes al calcáneo. El extremo del injerto se cerró con suturas interrumpidas de polipropileno 5-0. La sutura de fijación del injerto craneal se colocó en el gastrocnemio craneal con respecto a la unión musculotendinosa mediante un patrón de sutura de Mason-Allen modificado. La sutura de fijación del injerto caudal se pasó entonces a través del orificio perforado en el calcáneo, se tensó con el pie en una posición neutra y se ató. Para todas las suturas de fijación se ataron seis nudos de sutura. La incisión se cerró en capas usando material de sutura apropiado. El sitio de la incisión se observó y evaluó diariamente hasta el día 10 tras la operación.

[0082] Las ratas se agruparon en los grupos de tratamiento resumidos en la tabla 1.

Grupo	N.º	Tratamiento
Control quirúrgico	8	Tendón de Aquiles ligeramente erosionado con pinzas de diente de ratón
Control con armazón	8	Tendón de Aquiles ligeramente erosionado con pinzas de diente de ratón + armazón BioFiber de Tornier recubierto con colágeno
Armazón + células de tejido microvascular (mVasc)	8	Tendón de Aquiles ligeramente erosionado con pinzas de diente de ratón + armazón BioFiber de Tornier recubierto con colágeno + células de tejido microvascular de rata (descongeladas)

15 Procesamiento del tejido

[0083] Las ratas se sacrificaron el día 42 ± 1 . Inmediatamente después del sacrificio se recogieron de cada animal por escisión los sitios de los artículos de prueba o control implantados y el tejido tendinoso circundante. Todas las muestras recogidas se dividieron a la mitad. Una mitad del tejido recogido se almacenó en formol tamponado neutro al 10 % para una evaluación histopatológica e inmunohistoquímica rutinaria. La mitad restante se congeló instantáneamente a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en nitrógeno líquido para el análisis de la expresión génica. También se recogió una sección del tendón y del hígado de cada animal como controles de tinción y se almacenaron en formol tamponado neutro al 10 % para su evaluación inmunohistoquímica.

25 **[0084]** El análisis histopatológico, inmunohistoquímico y de expresión génica fue llevado a cabo por BioModels (Watertown, MA, EE. UU.). Brevemente, se realizaron tinciones con hematoxilina y eosina y tricrómicas de los tejidos almacenados en formol tamponado neutro al 10 %. También se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico con anticuerpos dirigidos contra tenascina en los tejidos almacenados en formol tamponado neutro al 10 % y en los tejidos recogidos como controles de tinción. Los tejidos congelados instantáneamente a $\leq -70\text{ }^{\circ}\text{C}$ se utilizaron para aislamiento de ARN y qPCR de tenascina. La tenascina es un marcador para células progenitoras de tenocitos.

Resultados

35 **[0085]** Los controles quirúrgicos mostraron una histología normal en todos los animales menos uno, que mostró invasión celular y pérdida de la estructura fascicular. Esto se observa normalmente en tendones que han sido tratados quirúrgicamente. Algunos ejemplos de tinciones H+E de tendón y tejido asociado en secciones de muestras del control quirúrgico se muestran en la columna izquierda de la figura 1. Los ejemplos de tinciones tricrómicas de tendón y tejido asociado en secciones de muestras del control quirúrgico se muestran en la columna izquierda de la figura 2.

45 **[0086]** Las ratas que recibieron armazones sin células de tejido microvascular mostraron invasión de tejido en los armazones. Los tendones asociados en los controles con armazón mostraron una estructura normal en seis de ocho animales. Dos de los animales de control con armazón mostraron inflamación, que podría ser el resultado de infecciones y/o dehiscencia de la herida. Algunos ejemplos de tinciones H+E de tendón y tejido asociado en secciones de muestras del control con armazón se muestran en la columna del centro de la figura 1. Los ejemplos de tinciones tricrómicas de tendón y tejido asociado en secciones de muestras del control con armazón se muestran en la columna del centro de la figura 2.

50 **[0087]** Las ratas que recibieron el armazón más células de tejido microvascular también mostraron invasión de

tejido en los almacenes. Los tendones asociados mostraron una estructura normal en seis de siete animales e invasión celular en uno de siete. En cinco de siete de los animales el tendón se aproximó a los almacenes cargados de células y la formación de nuevo tendón fue evidente en cuatro de siete animales. Algunos ejemplos de tinciones H+E de tendón y tejido asociado en secciones de muestras con almacén más células de tejido microvascular se muestran en la columna derecha de la figura 1. Los ejemplos de tinciones tricrómicas de Masson de tendón y tejido asociado en secciones de muestras de células de tejido microvascular se muestran en la columna derecha de la figura 2. Una de las ratas presentó inflamación y uno de los animales mostró crecimiento óseo infiltrante en el almacén (figura 4). En dos de las ratas con almacén más células de tejido microvascular, la piel pareció haber crecido en la vecindad del almacén (figura 3), lo que sugiere una estimulación de la regeneración de la piel.

10

[0088] Una análisis mediante PCR cuantitativa de la tenascina permitió determinar que los niveles de expresión de tenascina eran 3,9 y 7,4 veces mayores en el control con almacén y con el almacén más células de tejido microvascular, respectivamente, que en los controles quirúrgicos (valores absolutos de 2,3, 8,9 y 17,0 para los controles quirúrgicos, los controles con almacén y con el almacén más células de tejido microvascular, respectivamente). La tinción inmunohistoquímica también demostró un aumento de la expresión de tenascina en el grupo con almacén más células de tejido microvascular (figura 5, columna derecha).

15

[0089] Es posible llevar a cabo diversas modificaciones y adiciones a las realizaciones ejemplares discutidas sin salirse del alcance de la presente invención. Por ejemplo, aunque las realizaciones descritas anteriormente se refieren a características concretas, el alcance de esta invención también incluye realizaciones con diferentes combinaciones de características y realizaciones que no incluyen todas las características descritas anteriormente.

20

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un tejido microvascular procesado o crioconservado, en que dicho tejido microvascular es un tejido microvascular no cultivado mínimamente procesado que incluye una mezcla de 5 células madre o progenitoras, en que la viabilidad de las células madre o progenitoras en el tejido microvascular es inferior al 50 %, para uso en la reparación o regeneración de tendones, ligamentos o piel, en que dicha composición tiene actividad cicatrizante de tejidos y no comprende hueso ni matriz derivada de hueso.
2. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha mezcla de células 10 madre o progenitoras no contiene sustancialmente células viables.
3. Una composición para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que el tejido microvascular se aísla de tejido adiposo o tejido muscular.
- 15 4. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el tejido microvascular ha sido procesado por digestión enzimática o por disociación física o química.
5. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende además membranas celulares sustancialmente intactas de dicha mezcla de células 20 madre o progenitoras.
6. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición es estable a temperatura ambiente y mantiene dicha actividad cicatrizante de tejidos durante al menos un mes. 25
7. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha actividad cicatrizante de tejidos comprende una mejora de la cicatrización de tendones, ligamentos o piel expuestos a la composición, en comparación con tejido análogo tratado de forma similar pero sin exposición a la composición. 30
8. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha mezcla de células madre o progenitoras ha sido desecada o liofilizada.
9. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que 35 dicha composición comprende además un excipiente.
10. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el excipiente se selecciona del grupo que consta de: trehalosa, sacarosa, manitol, polietilenglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), aldehídos y albúmina. 40
11. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende además agua pura, hidrogel, *N*-metilpirrolidona (NMP), ácido hialurónico, glucosaminoglucanos, proteoglucanos, colágeno, fibrina, trombina, plaquetas o plasma rico en plaquetas. 45
12. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende además un armazón adecuado para implantación.
13. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha mezcla de células madre o progenitoras ha sido tratada para prevenir la contaminación microbiana. 50
14. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que dicho tratamiento para prevenir la contaminación microbiana comprende la generación de dicha composición con el uso de procedimientos asépticos o estériles.
- 55 15. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición es adecuada para su administración a un sujeto que es alogénico con respecto a la fuente de la mezcla de células madre o progenitoras.

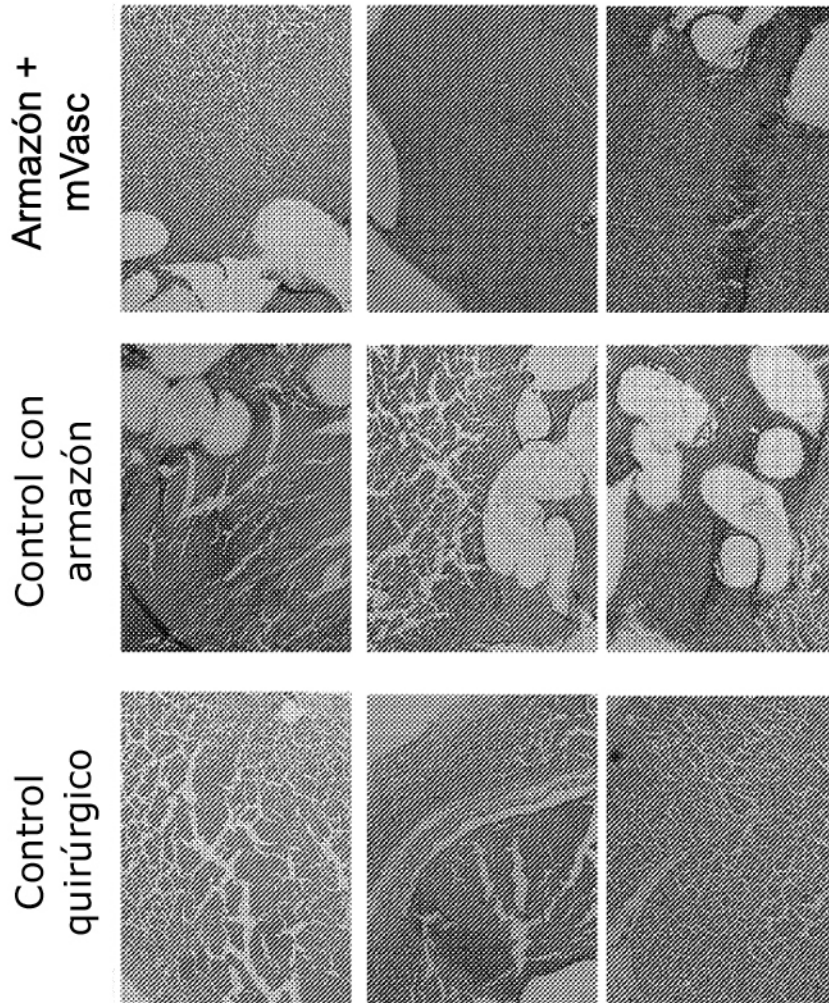


Figura 1

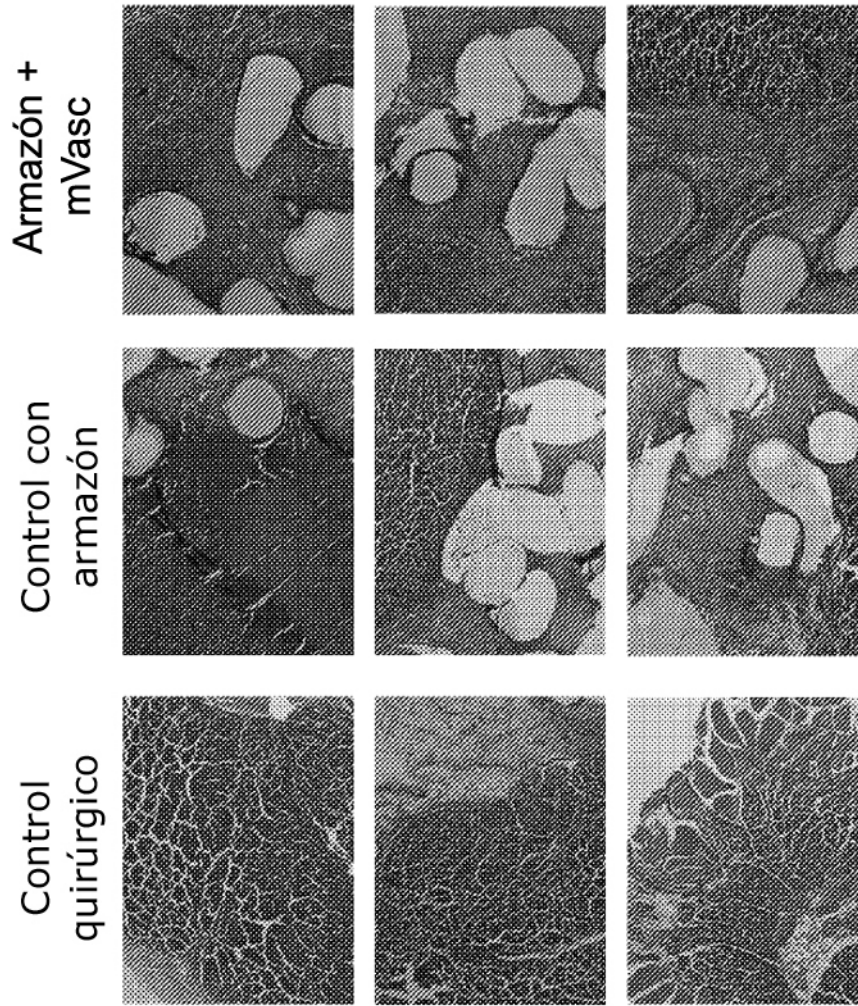


Figura 2

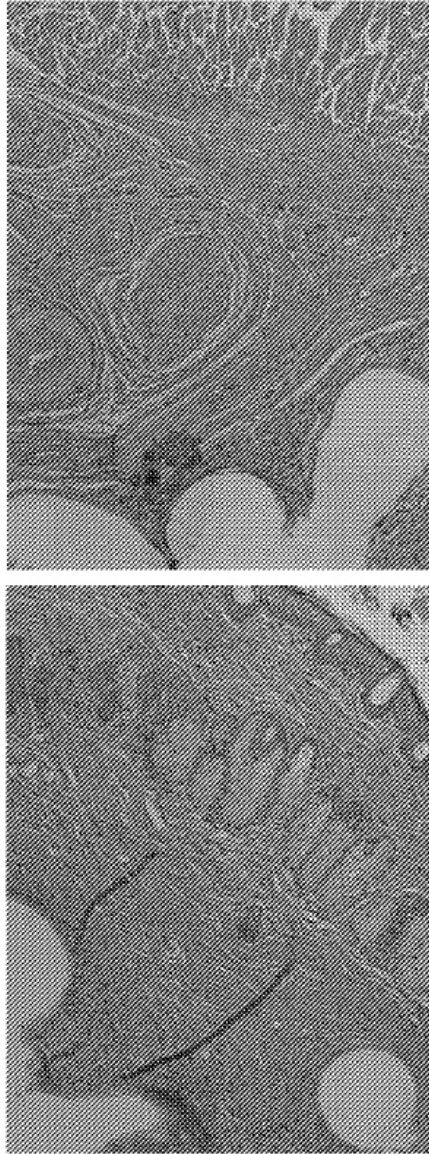


Figura 3



Figura 4

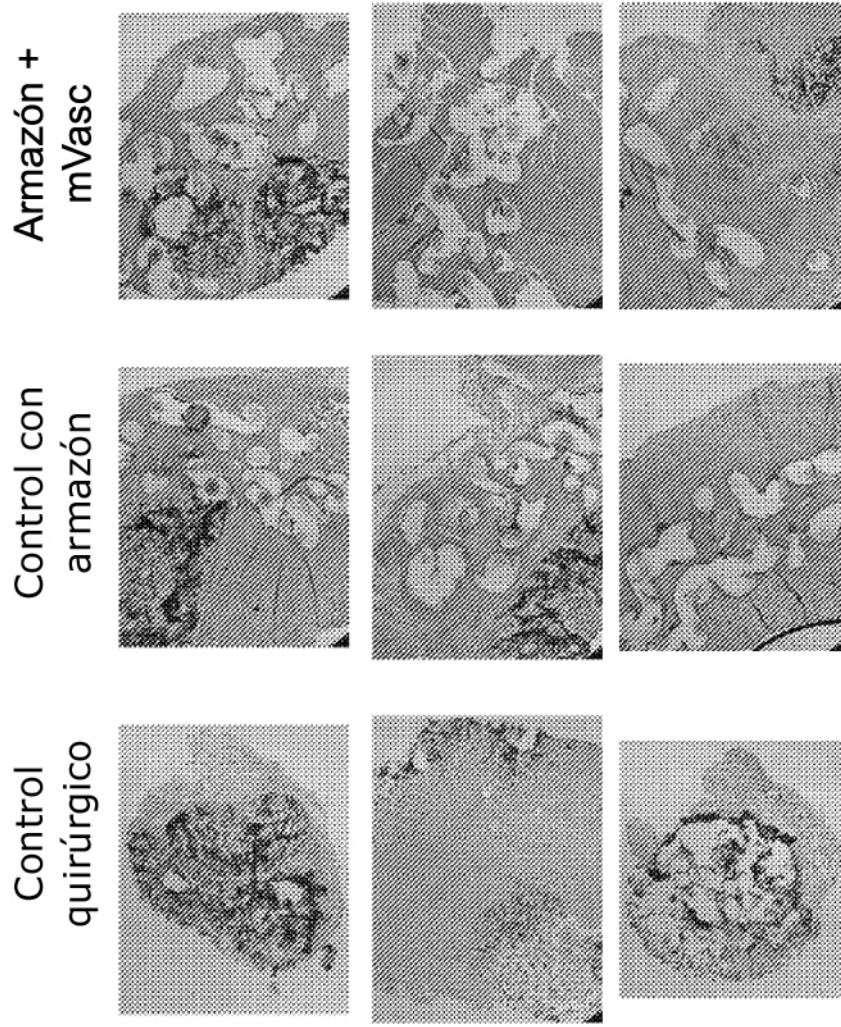


Figura 5