

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 957**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2014** **PCT/EP2014/063581**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014** **WO2014207135**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2014** **E 14735518 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017** **EP 3013379**

54 Título: **Liporrelleno con células madre derivadas de tejido adiposo expandidas ex vivo para el relleno mamario cosmético o para el relleno y/o rejuvenecimiento facial**

30 Prioridad:

26.06.2013 US 201361839578 P

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

30.06.2017

73 Titular/es:

STEMFORM APS (100.0%)

Høstvej 21

2920 Charlottenlund, DK

72 Inventor/es:

KØLLE, STIG-FREDERIK TROJAHN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 620 957 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

Liporrelleno con células madre derivadas de tejido adiposo expandidas ex vivo para el relleno mamario cosmético o para el relleno y/o rejuvenecimiento facial.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición para su uso en el relleno de tejido blanco, comprendiendo dicha composición injertos de grasa enriquecida con células madre derivadas de tejido adiposo expandidas ex vivo. Estos se pueden usar para el relleno/aumento mamario cosmético o para el relleno y/o rejuvenecimiento facial.

Descripción de la invención

Un desafío frecuente en la cirugía plástica es la corrección de defectos de volumen y el aumento del volumen existente. A la hora de corregir defectos de volumen o de aumentar el tejido existente, con frecuencia es necesario usar material de relleno, llamado "relleno" o "implante". El injerto de grasa autóloga (liporrelleno) permite la reparación y el aumento de tejidos blandos (por ejemplo, aumento mamario cosmético) y se usa cada vez más en cirugías tanto estéticas como reconstructivas. Se ha considerado al tejido graso autólogo como un relleno ideal para el aumento de tejido blando dado que es biocompatible, versátil, de aspecto natural, no inmunógeno, económico y fácilmente obtenible con una morbilidad del sitio donante baja^{1,2}. Sin embargo, el injerto de grasa trasplantado tiene una supervivencia impredecible y a menudo baja, motivo por el cual los investigadores han buscado nuevas maneras de aumentar su viabilidad. Un estudio realizado en animales que investigó el injerto de grasa xenogénico enriquecido con células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASC) ha indicado que la técnica es válida y reproducible, y que tiene como resultado un volumen residual mayor del trasplante en comparación con el no enriquecido³. Un estudio reciente realizado en humanos ha demostrado y confirmado la ventaja y el efecto notable de la incorporación de ASC al injerto de grasa para un mayor volumen residual y una mejor calidad del tejido trasplantado⁴.

En la industria cosmética, las soluciones disponibles para el relleno/rejuvenecimiento facial cosmético son predominantemente artificiales (por ejemplo, toxina botulínica tipo A, hialurónico, colágeno, hidroxilapatita de calcio, ácido poliáctico, microesferas de metacrilato de polimetilo). Por lo tanto, los resultados con frecuencia terminan pareciendo poco naturales debido a la escasa versatilidad y biocompatibilidad. Los rellenos artificiales se descomponen con el paso del tiempo con posibles efectos secundarios físicos adversos que varían de diversos síntomas de enfermedad hasta defectos estéticos. El tejido graso autólogo se considera una solución de relleno ideal, como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, los resultados para los pacientes tratados con grasa autóloga para el relleno/rejuvenecimiento facial (es decir, sin enriquecimiento de células madre) puede terminar siendo desproporcionados, debido a la supervivencia impredecible del injerto.

Algunos cirujanos sugieren que se puede lograr un enfoque mejor y más predecible en cuanto a los injertos al añadir la denominada "fracción vascular estromal" (SVF) al trasplante^{5,6}. La SVF es el sedimento celular que se forma cuando se recolecta tejido adiposo mediante liposucción y las células de grasa son digeridas enzimáticamente mediante el uso de colagenasa. Se sabe que la SVF contiene una pequeña cantidad de células madre derivadas de tejido adiposo (ASC).

El documento DE 10 2011 121982 B3 describe el uso de células madre derivadas de tejido adiposo expandidas para reconstruir los defectos de la piel.

Es importante diferenciar entre los siguientes términos:

- 1) Liporelleno convencional: únicamente grasa
- 2) Lipotransferencia asistida por células: Grasa + SVF
- 3) Liporelleno enriquecido con células madre: Grasa + ASC expandidas ex vivo
- 4) Relleno de células madre: ASC expandidas ex vivo

En la solicitud de patente actual, se hace referencia únicamente a los términos 3) y 4) anteriores.

Definición de las células madre a la que se hace referencia en la solicitud de patente actual:

Células que se adhieren a una superficie de cultivo al sembrar y cultivar la fracción vascular estromal.

Se pueden usar células autólogas o alogénicas para aplicaciones tanto mamarias como faciales.

La presente invención es especialmente adecuada para el relleno y rejuvenecimiento facial cosmético y para el
5 relleno/aumento mamario cosmético.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una composición que comprende células madre derivadas de tejido adiposo
10 (ASC) expandidas ex vivo mezcladas con tejido graso recolectado en una relación de 20×10^6 - 20×10^7 ASC/m de grasa, y el uso de injertos de grasa enriquecidos con células madre derivadas de tejido adiposo expandidas ex vivo como un agente para el relleno/aumento mamario cosmético o para el relleno/rejuvenecimiento facial.

Procedimiento quirúrgico para recolectar ASC

15 Los pacientes reciben una pequeña liposucción ambulatoria.

Se recolectarán lipoaspirados mediante técnicas de liposucción estériles estándares. Una solución humectante se infiltra en la gasa subcutánea a través de incisiones. El lipoaspirado se consigue con un dispositivo de liposucción
20 estándar (por ejemplo, Vibrasat®) y se sella en un recipiente estéril. El lipoaspirado se transporta al laboratorio clínico de células madre.

Aislamiento y cultivo de ASC

25 El aislamiento y la expansión ex vivo de ASC se realizará de acuerdo con un protocolo aprobado, en un laboratorio aprobado para las buenas prácticas de fabricación (GMP) y la expansión clínica de células madre, en un laboratorio de terapia celular.

El lipoaspirado se lava con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se centrifuga. Para aislar la fracción
30 vascular estromal (SVF), el sobrenadante se incuba y se digiere enzimáticamente con collagenasa (calidad GMP). La actividad enzimática se neutraliza a través del uso de un medio de crecimiento. La suspensión se filtra usando un filtro de 60-100 μ m y se centrifuga. El sedimento celular se suspende de nuevo en un medio de cultivo y se cuentan las células en el sedimento que contienen la SVF. Una forma alternativa de aislar la SVF es mediante el uso de un sistema cerrado, por ejemplo, el sistema GID SVF-1™. La SVF se siembra en el medio de cultivo que consiste en el
35 medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) o el medio esencial mínimo alfa (α -MEM), penicilina-estreptomycin al 1-5 %, 1-5 IU/ml de heparina libre de conservantes y lisado de plaquetas humanas agrupadas (pHPL) al 2-20 %, o cualquier otro medio de crecimiento alternativo, por ejemplo, suero fetal bovino. Se incuban los cultivos primarios (P0). Se descartan las células no adherentes, los matraces de cultivo celular se aclaran cuidadosamente con PBS, y el medio se reemplaza. El medio se cambia cada 3-7 días. Durante el cultivo y el día de
40 la recolección de ASC, se examinarán todos los matraces/pilas de cultivos para determinar la contaminación por patógenos.

Producción de pHPL

45 El pHPL puede fabricarse según lo descrito por Schallmoser et al.⁷, con modificaciones menores. En resumen, después del consentimiento informado, se recolectan unidades de sangre entera de donantes de sangre sanos. Todas las donaciones de sangre se analizan en busca de marcadores de enfermedades infecciosas, de conformidad con la legislación existente. Las capas leucocitarias se separan de los glóbulos rojos y el plasma. Cuatro unidades de capas leucocitarias se agrupan con 1 unidad de plasma en 1 unidad de plasma rico en plaquetas (PRP) y se
50 almacenan de -20 °C a -80 °C. Se descongela un mínimo de diez unidades de PRP en un baño de agua y luego se agrupan en un único lote de PRP. El lote de PRP agrupado se divide en fracciones alícuotas más pequeñas y se congela de -20 °C a -80 °C. A continuación, todas las bolsas en alícuotas del lote de PRP agrupado único se descongelan en un baño de agua y se centrifugan (por ejemplo, a 4000 g durante 15 min) para sedimentar los fragmentos de plaquetas. Por último, el sobrenadante que contiene pHPL se transfiere a bolsas nuevas y se
55 almacena a una temperatura de -40 °C a -80 °C para su uso posterior en la preparación del medio de cultivo celular.

Se recolectan ASC en P0-P4. Todos los matraces/pilas de cultivo celular se lavan con PBS y las células se separan de la superficie plástica mediante procesamiento químico (por ejemplo, Tryple Select) o físico. La suspensión que contiene las ASC se centrifuga (por ejemplo, a 300 g durante 5 min), se elimina el sobrenadante y se recoge el

sedimento celular después de la resuspensión en PBS. El sedimento celular de ASC se lava con PBS, centrifugando las ASC y descartando el sobrenadante después de cada procedimiento de lavado. Las células se cuentan tres veces y se calculará el recuento promedio. Las ASC se controlarán cuidadosamente antes de liberarlas para uso clínico, incluyendo 1) Ausencia de contaminación por patógenos 2) Viabilidad de las ASC de más del 90 % 3) Morfología, que se evalúa como característica para las ASC. Las ASC se transportarán en recipientes estériles aprobados.

Liposucción, preparación de injertos y procedimiento de liporrelleno

10 El procedimiento quirúrgico se realiza con anestesia local o general. Se cosechan lipoaspirados mediante técnicas de liposucción estériles estándares. A través de incisiones, se infiltra una solución humectante (por ejemplo, solución de Kleins) en el sitio donante mediante el uso de un infiltrador de punta roma. La cánula de recogida tiene un diámetro de 2-5 mm con una punta roma, conectada a un dispositivo de recogida (por ejemplo, Vibrasat®). Si es necesario, el lipoaspirado se lava usando una solución salina. El lipoaspirado recogido se deja sedimentar, se hace
15 girar o se centrifuga (por ejemplo, a 100 g durante 5 min). Después del procedimiento de separación, la capa oleosa (nivel superior) se decanta y la capa acuosa (nivel inferior) también se drena de las jeringas. La capa intermedia, compuesta por un injerto predominantemente de grasa, se usa para el trasplante.

Aplicaciones de la invención:

20 Relleno mamario cosmético: El tejido de grasa recogido se mezcla con las ASC expandidas ex vivo cosechadas a una relación de 20×10^6 - 20×10^7 ASC/ml de grasa, y se inyecta en forma de alícuotas en los senos para un aumento cosmético.

25 Ejemplo de técnica de inyección:

El injerto de grasa enriquecida se inyecta en los senos usando una aguja larga de forma horizontal (paralela al cuerpo) para evitar dañar las estructuras fuera del tejido mamario. La aguja se inserta desde varios puntos alrededor del margen de la areola y en varios puntos en el pliegue inflamatorio en direcciones y
30 planos variables para lograr una distribución uniforme y de aspecto natural del injerto.

Para el relleno facial y la corrección de arrugas: El tejido de grasa cosechados se mezcla con las ASC expandidas ex vivo cosechadas a una relación de 20×10^6 - 20×10^7 ASC/ml de grasa. La cantidad de células madre aumentará en función de la cantidad de relleno que se necesite; cuanto menos relleno se necesite, mayor será la concentración
35 de ASC. Si el efecto deseado es estrictamente una cuestión de mejora de la calidad del tejido, se usarán ASC en solitario, disueltas en PBS, con el fin de distribuir las células de manera uniforme. Ejemplo de técnica de inyección:

40 Cuando se usan como un relleno, los injertos de grasa se inyectan como alícuotas con una aguja larga de forma horizontal (paralela a la superficie) para evitar dañar las estructuras fuera del área diana. La aguja se inserta desde varios puntos y en direcciones y planos variables para lograr una distribución uniforme y de aspecto natural del injerto.

45 Cuando se usan estrictamente para la mejora de la calidad del tejido, las ASC disueltas se inyectan en la dermis y debajo de la dermis con una aguja puntiaguda fina y se distribuyen de manera uniforme en el área diana. Los sitios de incisión e inyección se suturan y se aplican prendas de compresión postoperatorias en los sitios donantes y en algunos casos también en los sitios receptores.

Beneficios clínicos y novedad de la invención

50 Los injertos de grasa enriquecida con ASC (expandidas ex vivo) o las ASC en solitario no se han usado nunca a nivel clínico para la inyección en los senos o en la cara y no se han descrito nunca en la bibliografía ni el inventor ha compartido la idea de estas aplicaciones clínicas con terceros antes de la presentación de la patente US 61/839.578. La idea de enriquecer injertos de grasa con ASC expandidas ex vivo con el fin de mejorar la supervivencia y la calidad de los injertos de grasa se ha mostrado en un modelo murino³ y en un estudio de prueba de conceptos
55 reciente en seres humanos⁴, aunque, como se ha mencionado anteriormente, las aplicaciones clínicas de esta invención nunca se han demostrado (es decir, el relleno mamario cosmético y el relleno facial). Se debe enfatizar que esta invención (es decir, al aplicación de ASC expandidas ex vivo para los propósitos del relleno/rejuvenecimiento facial y el relleno/aumento mamario cosmético) es significativamente diferente del uso de la SVF recién aislada, incluyendo una pequeña fracción de ASC no expandidas, para el llamado "liporrelleno asistido

por células" convencional. Este método se ha descrito en la bibliografía y se ha aplicado en seres humanos con resultados clínicos impredecibles, no significativamente mejores que los del liporrelleno convencional⁸. La lógica para usar ASC expandidas ex vivo para el relleno facial se sustenta en los estudios mencionados anteriormente, donde queda demostrado que las células madre sobreviven después de la inyección al contrario de lo que sucede con las células de grasa. Además, las ASC son muy resistentes a la hipoxia y a exposiciones físicas⁹⁻¹¹. Mediante el uso de células madre en solitario como material de relleno, se puede lograr un volumen/aumento residual fiable.

Existen muchos beneficios clínicos a partir de la fabricación de un relleno mamario y facial sostenible biocompatible, incluyendo su aspecto natural, la no inmunogenicidad, evitar los efectos secundarios del material artificial y el procedimiento puede ser autólogo. La mayoría de los pacientes tiene reservas de grasa naturales en el abdomen, los muslos, los brazos y las nalgas que se pueden usar. De esta manera, los pacientes obtienen una remodelación corporal deseada y personalizada. El tejido adiposo autólogo puede trasplantarse fácilmente mediante una simple liposucción e inyección posterior, con muy poca incomodidad para los pacientes y con muy poco riesgo de efectos secundarios.

EJEMPLOS

Resultados de la investigación - Prueba de estudio de conceptos (análogo al diseño de estudio descrito, por ejemplo, en Kolle SF, Fischer-Nielsen A, Mathiasen AB, et al. Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial. Lancet 2013; 382: 1113-20):

Objetivo del estudio:

Se comparan injertos de grasa enriquecidos con una dosis alta de células madre derivadas de tejido adiposo (ASC) expandidas ex vivo autólogas con injertos de grasa no enriquecidos (injertos de grasa convencionales).

Diseño del estudio:

Se preparan injertos de grasa purificada, uno con y otro sin enriquecimiento de ASC (control) para cada participante. Los injertos de grasa se inyectan por vía subcutánea.

Se elige una concentración de 20×10^6 ASC por ml de injerto de grasa enriquecido - aproximadamente 2.000 veces el nivel fisiológico.

Los volúmenes de los injertos de grasa inyectados se miden mediante imágenes de resonancia magnética (IRM) inmediatamente después de la inyección y después de 121 días y se comparan con las IRM iniciales.

Resultado:

En comparación con los injertos de control, los injertos de grasa enriquecida con ASC tienen volúmenes residuales significativamente mayores. No se han observado hechos adversos serios graves.

Bibliografía

1. Leuchter I, Schweizer V, Hohlfeld J, Pasche P. Treatment of velopharyngeal insufficiency by autologous fat injection. Eur Arch Otorhinolaryngol 2010; 267: 977-83.
2. Coleman SR. Structural fat grafts: the ideal filler? Clin Plast Surg 2001; 28: 111-9.
3. Lu F, Li J, Gao J, et al. Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by using VEGF-transfected adipose-derived stem cells. Plast Reconstr Surg 2009; 124: 1437-46.
4. Kolle SF, Fischer-Nielsen A, Mathiasen AB, et al. Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial. Lancet 2013; 382: 1113-20.
5. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. Aesthetic Plast Surg 2008; 32: 48-55.
6. Matsumoto D, Sato K, Gonda K, et al. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. Tissue Eng 2006; 12: 3375-82.
7. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. Transfusion 2007; 47: 1436-46.
8. Peltoniemi HH, Salmi A, Miettinen S, et al. Stem cell enrichment does not warrant a higher graft survival in

- lipofilling of the breast: a prospective comparative study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2013; 66: 1494-503.
9. Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004; 109: 1292-8.
- 10 Rasmussen JG, Frobert O, Pilgaard L, et al. Prolonged hypoxic culture and trypsinization increase the pro-angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy* 2010.
- 5 11 Thangarajah H, Vial IN, Chang E, et al. IFATS collection: adipose stromal cells adopt a proangiogenic phenotype under the influence of hypoxia. *Stem Cells* 2009; 27: 266-74.

REIVINDICACIONES

1. Un método para fabricar una composición que comprende células madre derivadas de tejido adiposo (ASC) de cultivo primario (P0) expandidas ex vivo mezcladas con tejido de grasa recogido; comprendiendo el método
 - expandir ex vivo las ASC de una fracción vascular estromal (SVF) aislada en un medio de crecimiento que consiste en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) o medio esencial mínimo alfa (α -MEM), penicilina-estreptomicina al 1-5 %, 1-5 IU/ml de heparina libre de conservantes y lisado de plaquetas humanas agrupadas (pHPL) al 2-20 %,
 - cosechar dichas ASC en el pase primario (P0), y
 - mezclar dichas ASC con tejido de grasa recogido a una relación de 20×10^6 - 20×10^7 ASC/ml de grasa.
2. Una composición que comprende células madre derivadas de tejido adiposo (ASC) de cultivo primario (P0) expandidas ex vivo mezcladas con tejido de grasa recogido a una relación de al menos 20×10^6 - 20×10^7 ASC/ml de grasa, donde dichas células madre derivadas de tejido adiposo (ASC) de cultivo primario (P0) expandidas ex vivo se han cultivado en un medio de crecimiento que consiste en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) o medio esencial mínimo alfa (α -MEM), penicilina-estreptomicina al 1-5 %, 1-5 IU/ml de heparina libre de conservantes y lisado de plaquetas humanas agrupadas (pHPL) al 2-20 %, y se han cosechado en el primer pase (P0).
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso como un agente de relleno mamario, un agente de relleno facial, para relleno mamario cosmético, o para relleno facial cosmético.
4. Método cosmético de relleno mamario, donde las células madre derivadas de tejido adiposo (ASC) de cultivo primario (P0) expandidas ex vivo se mezclan con tejido de grasa recogido a una relación de al menos 20×10^6 - 20×10^7 ASC/ml de grasa, donde dichas células madre derivadas de tejido adiposo (ASC) de cultivo primario (P0) se han cultivado en un medio de crecimiento que consiste en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) o medio esencial mínimo alfa (α -MEM), penicilina-estreptomicina al 1-5 %, 1-5 IU/ml de heparina libre de conservantes y lisado de plaquetas humanas agrupadas (pHPL) al 2-20 %, y se han cosechado en el pase primario (P0), y donde la grasa se inyecta como alícuotas o cadenas con una aguja larga en horizontal (en paralelo al cuerpo) insertando la aguja desde varios puntos alrededor del margen de la areola y en varios puntos en el pliegue inflamatorio en direcciones y planos variables para lograr una distribución uniforme y de aspecto natural del injerto.
5. Método cosmético de relleno facial, donde las células madre derivadas de tejido adiposo (ASC) de cultivo primario (P0) expandidas ex vivo se mezclan con tejido de grasa cosechado a una relación de al menos 20×10^6 - 20×10^7 ASC/ml de grasa, donde dichas células madre derivadas de tejido adiposo (ASC) de cultivo primario (P0) se han cultivado en un medio de crecimiento que consiste en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) o medio esencial mínimo alfa (α -MEM), penicilina-estreptomicina al 1-5 %, 1-5 IU/ml de heparina libre de conservantes y lisado de plaquetas humanas agrupadas (pHPL) al 2-20 %, y se han cosechado en el pase primario (P0), y donde los injertos de grasa se inyectan como alícuotas o como cadenas con una aguja larga en horizontal (en paralelo a la superficie) para evitar dañar las estructuras fuera del área diana, y la aguja se inserta desde varios puntos y en direcciones y planos variables para lograr una distribución uniforme y de aspecto natural del injerto.
6. Método cosmético de relleno facial, donde las células madre derivadas de tejido adiposo (ASC) de cultivo primario (P0) expandidas ex vivo se mezclan con tejido de grasa recogido a una relación de al menos 20×10^6 - 20×10^7 ASC/ml de grasa, donde dichas células madre derivadas de tejido adiposo (ASC) de cultivo primario (P0) se han cultivado en un medio de crecimiento que consiste en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) o medio esencial mínimo alfa (α -MEM), penicilina-estreptomicina al 1-5 %, 1-5 IU/ml de heparina libre de conservantes y lisado de plaquetas humanas agrupadas (pHPL) al 2-20 % y se han cosechado en el pase primario (P0), y donde las ASC se inyectan en la dermis con una aguja puntiaguda fina y se distribuyen uniformemente en el área diana, y la incisión y los sitios de incisión se suturan y se aplican prendas de compresión postoperatorias en los sitios donantes y en algunos casos también en los sitios receptores.
7. Método cosmético para introducir un agente en la piel, donde el agente comprende células madre derivadas de tejido adiposo (ASC) de cultivo primario (P0) expandidas ex vivo mezcladas con tejido de grasa recogido a una relación de al menos 20×10^6 - 20×10^7 ASC/ml de grasa, donde dichas células madre derivadas de tejido adiposo (ASC) de cultivo primario (P0) expandidas ex vivo se han cultivado en un medio de crecimiento que consiste en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) o medio esencial mínimo alfa (α -MEM), penicilina-

estreptomicina al 1-5 %, 1-5 IU/ml de heparina libre de conservantes y lisado de plaquetas humanas agrupadas (pHPL) al 2-20 %, y se han cosechado en el pase primario (P0).