

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 253**

51 Int. Cl.:

C12N 5/078 (2010.01)

C12N 5/0789 (2010.01)

A61K 41/00 (2006.01)

A61K 33/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2015 PCT/IB2015/053379**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2015 WO15170291**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2015 E 15732942 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 3140396**

54 Título: **Método para expandir células madre adultas a partir de sangre entera**

30 Prioridad:

09.05.2014 IT UD20140075

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

20.11.2018

73 Titular/es:

THANKSTEM S.R.L. (100.0%)

Via Manzini, 21

33100 Udine (UD), IT

72 Inventor/es:

POLETTINI, MARCO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 690 253 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

Método para expandir células madre adultas a partir de sangre entera

5 **ÁMBITO DE LA PRESENTE INVENCION**

Las formas de ejecución aquí descritas se refieren a un método para expandir células madre adultas a partir de sangre entera, en particular, aunque no solamente, de sangre periférica de mamíferos adultos, y a su respectiva aplicación en el campo médico, sobre todo en medicina humana o veterinaria, para el tratamiento terapéutico de lesiones, tanto externas como internas, de los tendones, ligamentos y cartílagos, de fracturas óseas, y también para el tratamiento terapéutico y/o preventivo de las patologías inflamatorias crónicas y/o agudas, de las patologías neurológicas y neuro-degenerativas, cardíacas, tumorales, autoinmunes, oftálmicas y de las patologías de origen genético.

15 Aquí y más adelante en la descripción, la palabra “expansión”, tal como se conoce en la literatura, se refiere al proceso de aumentar el número de células, ya sea por división celular o, como en el caso concreto aquí descrito y reivindicado, por “desdiferenciación” o “desprogramación”, es decir, el proceso por el cual algunas células presentes en la sangre se vuelven a transformar en células madre después de un tratamiento *in vitro* adecuado, como se verá más adelante.

20 **ANTECEDENTES DE LA PRESENTE INVENCION**

En los últimos años el uso terapéutico de células madre ha logrado un consenso generalizado, pero los resultados conseguidos están muy por debajo de las expectativas, con excepción de las células madre obtenidas de la sangre.

25 De hecho se ha visto que muchos métodos conocidos de obtención de células madre son largos, laboriosos y caros, con resultados relativos y a veces con efectos colaterales.

30 Hay células madre embrionarias y células madre adultas: las primeras proceden de blastocistos de 8 días, mientras que las adultas se pueden obtener principalmente de la médula ósea, del tejido adiposo o muscular, de la sangre periférica y del cordón umbilical, etc.

35 La definición de células madre está en constante evolución. Para todas estas células, tanto embrionarias (ES) como adultas, tanto hematopoyéticas (HSC) como mesenquimáticas (MSC) (Kuwana M. y otros, 2003), se han identificado varios marcadores genéticos, algunos de los cuales son comunes a muchos tipos de células. (Condomines M. y otros, 2006; Kang WJ y otros, 2006; Zhao Y. y otros, 2003; Rabinovitch M. y otros, 1976).

40 Para identificar células madre pluripotentes (PSC) embrionarias y adultas se tiene en cuenta la expresión de algunos factores de transcripción intracelular (Sox2, Oct3/4 y Nanog).

45 Al principio la investigación se dirigió a las células madre de origen embrionario, porque son pluripotentes y también cualificables y cuantificables, y por tanto son adecuadas para ensayos experimentales; sin embargo por cuestiones éticas y, sobre todo, por las contraindicaciones relacionadas con la producción de tumores hubo que dejarla de lado. Por tanto hoy en día se prefieren las células madre adultas. Las células madre adultas de otro individuo (alógenas) causan con frecuencia serios problemas de rechazo, porque no son reconocidas como “propias”. Esto afecta sobre todo a las células madre del cordón umbilical, que se utilizan casi exclusivamente como células madre alógenas.

50 Las células madre pluripotentes resultantes de un proceso de inducción, por el cual se transfieren los factores de pluripotencia de células madre embrionarias a células madre adultas mediante virus, no sirven para el tratamiento debido a contraindicaciones similares a las que tenían las células madre embrionarias y a unos costes enormemente elevados.

55 En el hombre, por ahora, se acepta el uso de células madre obtenidas de sangre periférica mediante un proceso denominado “aféresis” o “leucoféresis”. Las células madre se extraen de la sangre, se recogen y luego se inoculan a pacientes afectados por algunas patologías leucémicas, inmediatamente tras la quimioterapia o la radioterapia. Las células madre son hematopoyéticas y por lo tanto interaccionan exclusivamente con patologías de la sangre.

60 En la aféresis, que dura de 6 a 8 horas, la sangre se extrae de una vena del brazo, del cuello o del pecho y se hace pasar a través de una máquina que separa las células madre. La sangre así purificada regresa al paciente, mientras que las células recogidas se conservan por refrigeración en nitrógeno líquido (Condomines M. y otros, 2006; Kang W.J. y otros, 2006). Esta técnica no solo es dolorosa, sino que además es muy estresante para el paciente. Sirve para inocular *in vivo* factores de crecimiento que estimulen la liberación de células madre de la médula ósea hacia la sangre y no permite una discriminación y/o purificación real de las células madre circulantes.

65 Hoy en día estas células, según la legislación, solo están permitidas para el tratamiento terapéutico de patologías de la sangre.

Las células madre que hoy se están introduciendo en el mercado para tratar diferentes patologías son células madre adultas, sobre todo mesenquimáticas, obtenidas de la médula ósea y de la grasa. Sin embargo estas células tienen ciertos límites:

- 5 - requieren métodos invasivos para recogerlas, perforar un hueso para las células madre de la médula ósea o cirugía para extraer células madre de la grasa;
- son capaces de interreaccionar solo con algunos tejidos debido a su procedencia mesenquimática;
- cuando se cultivan para obtener una cantidad adecuada, de acuerdo con la terapia, comienzan a diferenciarse en otros tipos de células, mostrando siempre receptores de membrana diferentes, y por consiguiente no se pueden
- 10 cualificar ni cuantificar, lo cual es indispensable para los ensayos en humanos.

Otro método conocido es descrito por Zhao Y. y otros en el artículo "A human peripheral blood monocytederived subset acts as pluripotent stem cells [*Un subgrupo procedente de monocitos de sangre periférica humana actúa como células madre pluripotentes*]" y en la patente WOA-2004/043990. Este método sirve para preparar células madre derivadas de monocitos, e incluye las etapas de aislar monocitos de la sangre periférica, ponerlos en contacto con un componente mitogénico y a continuación cultivar los monocitos de la sangre periférica en unas condiciones adecuadas para propagar las células.

15 Este método, que inicialmente requiere una etapa de aislamiento del monocito y luego una etapa de expansión en un medio de cultivo, es muy largo, dura aproximadamente 15 - 20 días para obtener una cantidad significativa de células madre y no permite obtener células madre pluripotentes.

Asimismo, en el marco de la preparación de células madre a partir de monocitos, se conocen las patentes WO-A-2005/046570, WOA-2007/131200 y WO-A-03/083092. Sin embargo, como hay que llevar a cabo una purificación preliminar de la sangre para aislar solo una fracción celular, es decir los monocitos, y una expansión subsiguiente para obtener las células madre deseadas, los métodos descritos en estos documentos también requieren un tiempo muy largo, del orden de 15 - 40 días, para obtener una cantidad aceptable de células madre.

La patente WO-A-2008/034370, a nombre del presente solicitante, también es conocida, y se refiere a un método de expansión de células madre adultas a partir de sangre, empleando un factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF). Este conocido método facilita el crecimiento de células madre adultas de la sangre después de extraerla mediante un tratamiento in vitro con MCSF a una concentración comprendida entre 8 nM y 15 nM, y una purificación posterior, preferiblemente por fraccionamiento mediante un gradiente de Ficoll. Este método también puede facilitar el crecimiento de células madre de sangre periférica purificada mediante el tratamiento in vitro con MCSF a una

35 concentración comprendida entre 35 nM y 55 nM.

La eficacia del método se confirma por la presencia y el reconocimiento de los marcadores de células madre CD90, CD90/34, CD34 y CD 117, y por el hecho de que las células madre no pierden sus factores de autorreconocimiento tras la división o la expansión. Una vez administradas al paciente, las células madre no provocan efectos colaterales tales como rechazo, infección o desarrollo de teratomas y son capaces de diferenciarse "in vivo" y comportarse como células madre pluripotentes.

Los autores han visto que las células así cultivadas, por división o expansión, cuando se inyectan localmente o por vía intravenosa, adquieren "in vivo" (y no "in vitro" como en los métodos conocidos del estado de técnico mediante factores de crecimiento adecuados y/o estímulos químicos (Gulati R. y otros, 2003; Katz RL y otros, 2002; Okazaki T. y otros, 2005)) todas las características morfológicas y químicas de los macrófagos, linfocitos, células epiteliales, endoteliales, neuronales y hepatocitos, según las necesidades y las patologías de los organismos vivos tratados. El método es menos invasivo que otros métodos empleados anteriormente para recoger células madre, es indoloro (a diferencia de la aféresis) y económico.

Por último, la posibilidad de obtener fácilmente estas células y luego ser capaces de conservarlas por largo tiempo, por ejemplo congeladas en nitrógeno líquido, hace que las células obtenidas mediante este conocido método sean adecuadas para los trasplantes autólogos y para el tratamiento de muchas patologías (lesiones de diversos tipos, enfermedades metabólicas, patologías neurológicas, patologías inflamatorias agudas y crónicas).

La patente WO-A-2009/115522 también se conoce a nombre del presente solicitante y se refiere a un kit para recoger sangre, preferiblemente sangre periférica para la producción de células madre pluripotentes, que incluye un recipiente capaz de contener la sangre extraída, el cual contiene un anticoagulante y la sustancia MCSF. El kit se puede utilizar en el marco del método descrito en la patente WOA-2008/034370.

60 Sin embargo el solicitante ha encontrado que las diversas etapas de trabajo y manipulación a las que son sometidas las células madre para llevar a cabo el método descrito en la patente WO-A-2008/034370, como la eliminación de los glóbulos rojos, la purificación de las células madre respecto a los demás componentes de la sangre para obtener una cantidad de células madre pluripotentes superior a la de células madre hematopoyéticas y mesenquimáticas, el cultivo y la diferenciación en otros tipos de células, puede estresar las células madre adultas así obtenidas, dejándolas vivas pero menos eficaces, con menor capacidad de potencial energético e informativo.

En el campo veterinario existen diversas técnicas y aparatos para producir células madre, en particular para concentrar células madre procedentes de la grasa y de la médula ósea y para obtener factores de crecimiento.

5 Sin embargo, un primer obstáculo para las células madre es la dificultad de su recolección: tal como hemos dicho, para obtenerlas de la médula ósea hay que perforar un hueso o penetrar en la columna vertebral, y para obtenerlas de la grasa se requiere una operación quirúrgica adecuada, con puntos de sutura.

Además la logística es compleja: hay que expedir la muestra y recibir las células madre, manteniéndolas todas vivas y estables.

10 Otros obstáculos pueden ser la cantidad de operaciones manuales requeridas, el tiempo de preparación y los costes de todas las células madre adultas utilizadas hasta ahora.

15 Estas dificultades, junto con los malos resultados clínicos, han provocado que las células madre desaparezcan casi por completo de la práctica clínica veterinaria, y solo unos pocos veterinarios siguen usándolas, sobre todo con fines experimentales.

20 La preparación celular descrita en la patente WO-A2008/034370 y referida en varias publicaciones científicas es capaz de cualificar y cuantificar las células madre, confirmando sus características pluripotentes. También resulta mucho más cómoda que las técnicas utilizadas hasta la fecha, ya que el muestreo es sencillo (unos pocos mililitros de sangre) y no es necesario cultivar las células.

25 No obstante este sistema también se puede mejorar de cara al uso de células madre en la práctica clínica humana, a fin de superar los obstáculos relacionados con el envío de la muestra al laboratorio, la subsiguiente desprogramación con MCSF y el retorno a las estructuras donde tiene lugar el tratamiento terapéutico. Otro límite puede ser la completa purificación de las células madre obtenidas de la sangre usando el método descrito en la patente WO-A-2008/034370, que permite una mayor seguridad para una posible inoculación alogénica (cuya seguridad aún está por demostrar). De hecho las purificaciones y los procesos utilizados para eliminar los glóbulos rojos y el paso de las células por un clasificador (cualificación) crean un estrés considerable a las células madre obtenidas, haciendo que pierdan parte de su capacidad curativa. Por lo tanto hay que reducir al mínimo la manipulación de la sangre para obtener células madre efectivas y obtener así mejores resultados.

35 Otro límite de todas las terapias con células madre obtenidas mediante el empleo de métodos conocidos, incluyendo la patente WO-A2008/034370, es la necesidad de laboratorios especializados.

También se conoce la patente WO-A-2008/036374, que describe métodos y composiciones para trasplantes de células madre en pacientes que no han sido previamente inmunosuprimidos.

40 También se conocen los siguientes artículos científicos:

- Spaas J. H., Gambacurta A., Poletini M., Broeckx S. y otros, "Purification and expansion of stem cells from equine peripheral blood, with clinical applications [*Purificación y expansión de células madre de sangre periférica equina, con aplicaciones clínicas*]", vol. 80, nº 2, páginas 129-135 extraído de Internet:
URL:<http://hdl.handle.net/1854/LU1215157>;
- 45 - GE Garber y otros, "The use of ozone-treated blood in the therapy of HIV infection and immune disease: a pilot study of safety and efficacy [*Empleo terapéutico de sangre tratada con ozono en la infección por VIH y en la enfermedad inmunológica: estudio piloto de seguridad y eficacia*]" AIDS, 1 de enero de 1991, páginas 981-984, extraído de Internet:
URL:<http://graphics.tx.ovid.com/ovftpdfs/FPDDNCFBHADJCP00/fs047/ovft/live/gv039/00002030/00002030-199108000-00009.pdf>;
- 50 - Larini y otros, "Effects of ozone on isolated peripheral blood mononuclear cells [*Efectos del ozono en células mononucleares aisladas de sangre periférica*]", Toxicology in vitro, Elsevier Science, GB, vol. 19, nº 1, 1 de febrero de 2005, páginas 55-61.

55 Por tanto existe la necesidad de perfeccionar un método para expandir células madre adultas de sangre entera que pueda superar al menos una de las desventajas del estado técnico.

60 El solicitante ha ideado, comprobado y desarrollado la presente invención para superar los inconvenientes del estado técnico y lograr estos y otros fines y ventajas.

A no ser que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí y en lo sucesivo tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona con experiencia habitual en el campo de la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos pueden usarse en la práctica y en los ensayos de la presente invención, dichos métodos y materiales se describen en lo sucesivo a modo de ejemplo. En caso de conflicto prevalecerá la presente solicitud de patente, incluyendo sus

definiciones. Los materiales, métodos y ejemplos tienen un propósito puramente ilustrativo y no deben entenderse en sentido restrictivo.

RESUMEN DE LA PRESENTE INVENCION

5 La presente invención está expuesta y caracterizada en las reivindicaciones independientes, mientras que las reivindicaciones dependientes describen otras características de la invención o variantes de la idea principal de la misma.

10 Conforme a los propósitos anteriores, un método para expandir células madre adultas de la sangre que supere los límites del estado técnico y elimine sus defectos facilita:

- el crecimiento y la desprogramación de las células madre sanguíneas adultas de una muestra de sangre extraída mediante el tratamiento in vitro de la muestra con factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF);
- 15 - la ozonización de la muestra de sangre.

Por tanto la presente invención permite obtener células madre adultas pluripotentes a partir de la muestra de sangre.

20 De acuerdo con posibles formas de ejecución, el método establece que la ozonización de la muestra de sangre tenga lugar antes del tratamiento con MCSF. En particular, el tratamiento con MCSF se puede realizar en la muestra de sangre ya ozonizada.

25 Según otras posibles formas de ejecución, el método establece que la ozonización de la muestra de sangre se realice durante el tratamiento con MCSF. En particular, el tratamiento con MCSF se puede realizar en la muestra de sangre durante la ozonización.

30 Según otras posibles formas de ejecución, el método establece que la ozonización de la muestra de sangre se realice tras el tratamiento con MCSF. En particular, el tratamiento con MCSF se puede realizar en la muestra de sangre antes de ozonizarla.

De acuerdo con posibles formas de ejecución, que pueden ser combinables con todas las formas de ejecución aquí descritas, el método establece que la ozonización aporte a la muestra de sangre una mezcla de O₂-O₃.

35 De acuerdo con posibles formas de ejecución, que pueden ser combinables con todas las formas de ejecución aquí descritas, el método establece una relación estequiometría 1:1 entre la sangre y la mezcla de O₂-O₃.

40 De acuerdo con posibles formas de ejecución, que pueden ser combinables con todas las formas de ejecución aquí descritas, el método establece una cantidad de mezcla de O₂-O₃ en la muestra de sangre superior o igual a 1 mic.g/l aproximadamente.

De acuerdo con posibles formas de ejecución, que pueden ser combinables con todas las formas de ejecución aquí descritas, el método establece que la cantidad de mezcla de O₂-O₃ en la muestra de sangre se puede seleccionar en un intervalo de 1 mic.g/l hasta 42 mic.g/l aproximadamente.

45 De acuerdo con posibles formas de ejecución, que pueden ser combinables con todas las formas de ejecución aquí descritas, el método establece la adición de un anticoagulante a la muestra de sangre.

50 De acuerdo con posibles formas de ejecución, que pueden ser combinables con todas las formas de ejecución aquí descritas, el método proporciona el uso de un kit para recoger sangre, que incluye al menos un recipiente capaz de contener al menos la sangre extraída, el cual contiene al menos la sustancia MCSF.

55 De acuerdo con posibles formas de ejecución, que pueden ser combinables con todas las formas de ejecución aquí descritas, el método establece que la cantidad de muestra de sangre recogida y tratada está comprendida dentro del intervalo de 0,2 ml hasta 100 ml, en particular entre 0,5 ml y 50 ml, más particularmente entre 1 ml y 25 ml, aún más particularmente entre 2 ml y 10 ml, más particularmente entre 2 ml y 8 ml, más particularmente entre 3 ml y 8 ml, más particularmente entre 3 ml y 5 ml.

60 De acuerdo con posibles formas de ejecución, que pueden ser combinables con todas las formas de ejecución aquí descritas, el método establece que la concentración de MCSF está comprendida dentro de un intervalo de 1 nM hasta 55 nM aproximadamente.

65 De acuerdo con posibles formas de ejecución, que pueden ser combinables con todas las formas de ejecución aquí descritas, el método establece un tiempo de cultivo y desprogramación mediante un tratamiento in vitro con MCSF, comprendido entre 4 horas y 96 horas.

Además, otras formas de ejecución aquí descritas se refieren a un método para expandir células madre adultas de la sangre, que consiste exclusivamente en:

- 5 - cultivar y desprogramar las células madre adultas de una muestra de sangre extraída, utilizando el tratamiento in vitro de la muestra de sangre con MCSF.

Las formas de ejecución aquí descritas también se refieren a una muestra de sangre que contiene células madre adultas obtenibles mediante un método según la presente descripción.

- 10 Según formas posibles de ejecución, la muestra de sangre se prepara para usarla en el tratamiento terapéutico y/o en la prevención de patologías.

15 Según formas de ejecución posibles, la muestra de sangre se prepara para emplearla en el tratamiento terapéutico, incluyendo la terapia de lesiones tanto externas como internas, lesiones de los tendones, de los ligamentos y de los cartílagos, fracturas óseas, en la terapia y/o prevención de patologías inflamatorias crónicas y/o agudas, patologías neurológicas y neurodegenerativas, patologías cardíacas, patologías tumorales, patologías autoinmunes, patologías oftálmicas y patologías genéticas.

- 20 De acuerdo con las posibles formas de ejecución se prepara una muestra de sangre para usarla en un tratamiento que proporcione administración intravenosa, intraarterial o local (por ejemplo, subcutánea, intramuscular o intratisular) de la muestra de sangre tratada con MCSF y ozonizada.

25 Según otras formas posibles de ejecución se prepara una muestra de sangre para emplearla en un tratamiento que proporcione la administración intravenosa, intraarterial o local (por ejemplo, subcutánea, intramuscular o intratisular) de la muestra de sangre tratada con MCSF y la ozonización sistémica del paciente.

30 Las formas de ejecución aquí descritas también se refieren a un kit provisto de al menos un recipiente que contiene una muestra de sangre con células madre adultas que pueden obtenerse empleando un método según la presente descripción.

35 Estos y otros aspectos, características y ventajas de la presente revelación se comprenderán mejor con referencia a la siguiente descripción y a las figuras y reivindicaciones adjuntas. Las figuras, que están integradas y forman parte de la presente descripción, muestran algunas formas de ejecución de la presente invención y, junto con la descripción, pretenden describir los principios de la revelación de la presente revelación.

Los diversos aspectos y características descritos en la presente descripción pueden aplicarse individualmente cuando sea posible. Estos aspectos individuales, por ejemplo los aspectos y características descritos en las reivindicaciones dependientes adjuntas, pueden ser objeto de solicitudes divisionales.

- 40 Se entiende que cualquier aspecto o característica que durante el proceso de tramitación de la patente se descubra como ya conocido no se reivindicará y será objeto de una exención de responsabilidad.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE ALGUNAS FORMAS DE EJECUCIÓN

45 Ahora nos referiremos en detalle a las diversas formas de ejecución de la presente invención. Cada ejemplo se ofrece a modo de ilustración de la presente invención y no debe entenderse como una limitación de la misma. Por ejemplo, las características mostradas o descritas como parte de una forma de ejecución pueden adoptarse o asociarse con otras formas de ejecución para producir otra forma de ejecución. Se entiende que la presente invención incluye todas estas modificaciones y variantes.

50 Antes de describir estas formas de ejecución debemos aclarar también que la aplicación de la presente descripción no está limitada a los detalles de la construcción y disposición de los componentes descritos en la siguiente exposición con el uso de las figuras adjuntas. La presente descripción puede aportar otras formas de ejecución que se pueden lograr o realizar de maneras distintas. También debemos aclarar que la fraseología y la terminología utilizadas aquí solo tienen finalidad descriptiva y no pueden considerarse limitativas.

55 Debe entenderse que términos tales como “aproximadamente”, “en general”, “sustancialmente” y similares tienen la función de modificar un término o valor que no es absoluto y no está referido en el estado técnico. Dichos términos se definirán según las circunstancias específicas y los términos que deban modificar de acuerdo con la aceptación común de dichos términos en el campo concreto. Deberán tener en cuenta al menos el grado de error experimental esperado, el error técnico y el error instrumental de una determinada técnica adoptada para la medición de un valor. A no ser que se indique otra cosa, en la presente descripción se entenderá que las formas singulares como “un”, “una” y “uno” incluyen las formas plurales, si el contexto no sugiere lo contrario.

65 Se entenderá que todos los intervalos aquí mencionados incluyen los extremos, incluidos aquellos que se refieren a un intervalo “entre” dos valores, a no ser que se indique de otro modo.

La presente descripción también incluye los intervalos derivados de la unión o superposición de dos o más intervalos descritos, a no ser que se indique lo contrario.

5 La presente descripción también incluye los intervalos que pueden derivarse de la combinación de dos o más valores tomados en diferentes puntos, a no ser que se indique lo contrario.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos empleados aquí y en lo sucesivo tienen el mismo significado entendido comúnmente por una persona con experiencia usual en el campo de la técnica al que pertenece la presente invención.

10 Aunque en la práctica y en los ensayos de la presente invención se pueden emplear métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos, los métodos y materiales que se describen a continuación lo son a modo de ejemplo. En caso de conflicto prevalecerá la presente solicitud, incluyendo sus definiciones. Los materiales, métodos y ejemplos tienen un propósito puramente ilustrativo y no deben entenderse en sentido restrictivo.

15 Las formas de ejecución aquí descritas se refieren a un método para expandir células madre adultas de la sangre, que facilita:

- 20 - el crecimiento y la desprogramación de las células madre sanguíneas adultas de una muestra de sangre extraída del paciente, utilizando el tratamiento in vitro de la muestra de sangre con MCSF;
- la ozonización de la muestra de sangre.

En concreto la sangre puede ser entera, más particularmente sangre entera periférica.

25 Por tanto la presente invención permite obtener células madre adultas pluripotentes de la muestra de sangre extraída.

30 De hecho, como se describe en las patentes WO-A-2008/034370 y WO-A-2009/115522, las células madre obtenidas tienen los marcadores madre CD90, CD90/34, CD34 y CD117, y también expresan algunos factores de transcripción intracelular que están fuertemente vinculados a las características pluripotentes (Sox2, Oct3/4 y Nanog) y no pierden sus factores de "autorreconocimiento" tras la división o expansión. Una vez administradas al paciente, las células madre no producen efectos colaterales como rechazo, infección, desarrollo de teratomas, y pueden diferenciarse "in vivo" y comportarse por tanto como células madre pluripotentes.

35 La expresión "crecimiento y desprogramación de las células madre sanguíneas adultas de una muestra de sangre que se ha extraído del paciente, usando el tratamiento in vitro de la muestra de sangre con MCSF" significa que la muestra de sangre que se ha tomado del paciente y que contiene una cierta cantidad de células madre adultas, se trata in vitro con MCSF para lograr el crecimiento de las células madre adultas originalmente presentes en la muestra de sangre, desprogramando las células de la línea blanca de la sangre.

40 Además subrayamos que aquí la expresión "ozonización" se refiere al tratamiento de la muestra de sangre con ozono, es decir, la adición, suministro, administración o mezcla con ozono, o de una mezcla de oxígeno y ozono, a o en la muestra de sangre.

45 El ozono (símbolo O₃) es una forma alotrópica de oxígeno, con una molécula triatómica y un peso molecular de 48. En condiciones normales el ozono aparece como un gas azul, de olor acre, y tiene un fuerte poder oxidante. El ozono puede actuar como desinfectante, desodorante, bactericida, esterilizador u oxidante en numerosas síntesis orgánicas.

50 De acuerdo con las posibles formas de ejecución, la ozonización de la muestra de sangre puede llevarse a cabo antes del tratamiento con MCSF.

De acuerdo con las posibles formas de ejecución, la ozonización de la muestra de sangre puede llevarse a cabo al mismo tiempo que el tratamiento con MCSF.

55 De acuerdo con las posibles formas de ejecución, la ozonización de la muestra de sangre puede llevarse a cabo tras el tratamiento con MCSF.

60 Según posibles formas de ejecución, se prevé la adición de un anticoagulante a la muestra de sangre. La heparina, el EDTA o el citrato sódico son ejemplos de posibles anticoagulantes.

65 En algunas formas de ejecución el método según la presente descripción puede prever el uso de un kit para recoger la sangre destinada a la producción de células madre pluripotentes conforme al método descrito anteriormente, el cual incluye al menos un recipiente, como por ejemplo un tubo de ensayo, capaz de contener la muestra de sangre extraída, que contiene la sustancia MCSF y ocasionalmente, dado el caso, el mencionado anticoagulante.

Con un kit de este tipo se puede recoger sangre entera, preferiblemente sangre periférica, para iniciar rápidamente el crecimiento y la producción de las células madre, empleando el método descrito anteriormente según la presente descripción y hacer por tanto la producción mucho más rápida.

5 Gracias a las formas de ejecución aquí descritas, la cantidad de muestra de sangre recogida y tratada de acuerdo con el método descrito aquí - es decir, el crecimiento y la desprogramación con MCSF y la ozonización de la muestra de sangre - puede ser solo de unos pocos mililitros, por ejemplo entre 0,2 ml y 100 ml, en particular entre 0,5 ml y 50 ml, más particularmente entre 1 ml y 25 ml, aún más particularmente entre 2 ml y 10 ml, más particularmente entre 2 ml y 8 ml, más particularmente entre 3 ml y 8 ml, aún más particularmente entre 3 ml y 5 ml.

10 En otras variantes la cantidad de muestra de sangre recogida y sometida a crecimiento y desprogramación con MCSF pueden ser de unos cientos de mililitros, por ejemplo de 100 hasta 1000 ml, en particular de 200 ml hasta 600 ml, más particularmente de 400 ml hasta 600 ml, por ejemplo de 500 ml. La muestra de sangre se puede inyectar (por vía intravenosa o intraarterial) para que circule en el paciente, el cual puede someterse posteriormente a un tratamiento de ozonización sistémica.

15 Algunas formas de ejecución, combinables con todas las formas de ejecución aquí descritas, pueden proporcionar un método como el descrito anteriormente para el cual se pueda emplear cualquier tipo de recipiente en el que pueda introducirse la sangre completa y el ozono, con cualquier tipo posible de anticoagulante y con cualquier concentración de MCSF, por ejemplo en un intervalo de 1 nM hasta 55 nM aproximadamente. Los ejemplos de subintervalos pueden ser de 2 nM hasta 50 nM o de 5 nM hasta 45 nM. Otros ejemplos de subintervalos pueden ser de 2 nM hasta 20 nM o de 8 nM hasta 15 nM o de 8 hasta 10 nM o de 10 nM hasta 12 nM o de 12 nM hasta 35 nM o de 15 nM hasta 30 nM o de 20 nM hasta 25 nM o de 35 nM hasta 55 nM o de 40 nM hasta 50 nM, o combinaciones de todos estos intervalos o subintervalos, incluyendo también todos los números enteros o fracciones presentes en los intervalos o subintervalos mencionados y no indicados explícitamente aquí.

En algunas formas de ejecución, combinables con todas las formas de ejecución aquí descritas, se puede prever que la ozonización aporte a la muestra de sangre una mezcla de O₂ - O₃.

30 En posibles formas de implementación, el solicitante ha encontrado que la relación de sangre a mezcla de O₂ - O₃ puede ser preferiblemente una relación estequiométrica de 1: 1.

35 En algunas posibles formas de implementación, la cantidad de O₂ - O₃ en la muestra de sangre puede ser superior o igual a 1 mic.g/l aproximadamente y en particular se selecciona dentro en un intervalo de 1 mic.g/ml hasta 42 mic.g/ml aproximadamente, más particularmente de 5 mic.g/ml hasta 30 mic.g/ml aproximadamente, aún más particularmente de 10 mic.g/ml hasta 20 mic.g/ml aproximadamente.

40 Algunas formas de ejecución aquí descritas prevén que, tras haber dejado la sangre en estas condiciones, de manera preferente a temperatura ambiente, al cabo de un cierto tiempo, preferiblemente entre 4 horas y 96 horas, en particular entre 4 horas y 72 horas, más particularmente entre 4 horas y 48 horas, la sangre entera así obtenida con el contenido de células madre resultantes de la desprogramación pueda ser completamente reinoculada sistémicamente (por vía intravenosa o intraarterial) o localmente en un tejido enfermo o cerca del mismo.

45 En posibles formas de implementación, el tiempo de crecimiento y desprogramación mediante el tratamiento in vitro con MCSF puede variar entre 12 y 96 horas, en particular entre 12 y 72 horas, sobre todo entre 12 y 36 horas.

En posibles formas de implementación, el tiempo de crecimiento y desprogramación mediante el tratamiento in vitro con MCSF puede variar entre 24 y 96 horas, en particular entre 24 y 72 horas, sobre todo entre 24 y 36 horas.

50 En posibles formas de implementación, el tiempo de crecimiento y desprogramación mediante el tratamiento in vitro con MCSF puede variar entre 48 y 96 horas, en particular entre 48 y 72 horas, sobre todo entre 48 y 60 horas.

55 El solicitante ha supuesto que la ozonización de la muestra de sangre sometida a crecimiento y desprogramación mediante el tratamiento in vitro con MCSF estimula el proceso de expansión y desprogramación de células madre adultas, de modo que al cabo de unas pocas horas haya un número significativo de células madre adultas útiles.

60 El solicitante ha encontrado que una duración del tratamiento in vitro con MCSF comprendida entre 4 y 96 horas aproximadamente puede conducir a una estabilización del crecimiento de las células madre, con la identificación de los marcadores madre CD90, CD90 / 34, CD34 y CD117. Se cree que ésta es la condición óptima.

65 El solicitante también ha encontrado que con unas concentraciones de MCSF de 1 nM hasta 55 nM aproximadamente, las células mantienen el fenotipo de células madre adultas pluripotentes. Se ha observado que al emplear MCSF en concentraciones superiores a 55 nM (por ejemplo, 70 nM), después de 24 horas las células ya no conservan el fenotipo de células madre adultas pluripotentes.

Las formas de ejecución del método aquí descrito pueden proporcionar no solo el citado recipiente que contiene el MCSF y donde se produce la expansión de las células madre adultas, sino también el uso de un segundo recipiente para contener las células madre obtenidas del modo descrito anteriormente, por ejemplo, en el caso de uso intravenoso o intraarterial, y posiblemente de un tercer recipiente, de tamaños diferentes, para el uso local. Las células madre producidas y conservadas en dichos recipientes pueden usarse inmediatamente, o pueden conservarse, por ejemplo, en nitrógeno líquido, para utilizarlas más tarde, según sea necesario.

La ozonización de acuerdo con la presente descripción se puede llevar a cabo en muestras de sangre que contengan las células madre antes, durante o después de la expansión y la desprogramación con MCSF contenido en cualquiera de los recipientes citados.

Según las posibles formas de ejecución, la sangre recién extraída del paciente se puede introducir inmediatamente en el tubo de ensayo con el anticoagulante y MCSF. El anticoagulante puede detener el inicio de la coagulación, mientras que la presencia simultánea del MCSF puede permitir un inicio rápido del proceso de expansión y garantizar que los tiempos de inicio del tratamiento del paciente sean mínimos. Además la muestra se somete a ozonización de acuerdo con la presente descripción.

Según otras formas posibles de ejecución se puede agregar anticoagulante a la sangre extraída del paciente para detener la coagulación de la sangre sometida a un proceso de conservación que no altere su capacidad de producir células madre. Si es necesario, la sangre se toma del lugar donde se conserva y se somete al proceso de expansión de las células madre, tal como se ha descrito anteriormente, es decir, añadiéndole la sustancia MCSF para obtener rápidamente la cantidad necesaria de células madre. En este caso la muestra también se somete a ozonización de acuerdo con la presente descripción.

El método según la presente descripción permite superar las desventajas del estado técnico y comporta numerosas ventajas.

Por ejemplo, la presente invención permite preparar y manipular sangre entera, simplificando considerablemente la terapia y obviando la necesidad de realizar cualquier tipo de manipulación celular en el laboratorio. De hecho, la presente invención excluye la necesidad o posibilidad de realizar tratamientos, por ejemplo para eliminar los glóbulos rojos o para purificar las células madre respecto a los demás componentes de la sangre, a fin de obtener una mayor cantidad de células madre pluripotentes en comparación con los otros dos componentes de las células madre, las hematopoyéticas y mesenquimáticas, o para cultivarlas o diferenciarlas en otros tipos de células. Normalmente estos tratamientos adicionales pueden estresar las células madre obtenidas, dejándolas vivas pero con un menor potencial energético e informativo. En cambio la presente invención evita la necesidad de seguir elaborando y manipulando la muestra de sangre, y así las células madre adultas presentes en la sangre entera conservan mejor sus características porque no están estresadas y en la sangre se pueden beneficiar de la presencia de otros elementos que ayudan al proceso regenerativo.

El solicitante ha encontrado que patologías incurables como la degeneración del miocardio, ya tratada con buenos resultados mediante células madre obtenidas de la sangre por desprogramación tal como se describe en la patente WO-A2008/034370, han tenido una evolución claramente más positiva con células madre desprogramadas en sangre entera, sin las operaciones y la manipulación adicionales descritas anteriormente, empleando por lo tanto un método que también puede consistir exclusivamente en el crecimiento y la desprogramación con MCSF, sin etapas de trabajo adicionales que incluyan la purificación y la expansión posterior o que puedan incluir el crecimiento y desprogramación con MCSF y la ozonización.

La preparación de células madre según el método aquí descrito evita la necesidad de una compleja preparación de laboratorio, permitiendo que cualquier hospital, clínica o médico prepare células madre utilizando un simple tubo de ensayo con una cantidad preferiblemente mínima de MCSF. En otras palabras, utilizando un solo tubo de ensayo en el cual se introducen unos pocos ml de muestra de sangre con MCSF, es posible tratar y mejorar incluso patologías tal graves como, por ejemplo, las secuelas de un ataque cardíaco o la enfermedad de Parkinson. Por lo tanto estos resultados apoyan el hecho de que, según las posibles formas de ejecución, un método para expandir células madre adultas de la sangre también puede consistir exclusivamente en el crecimiento y la desprogramación de las células madre adultas de una muestra de sangre, utilizando el tratamiento in vitro de la muestra de sangre con MCSF.

Además, en algunas formas de ejecución, la adición o contribución del ozono a la muestra de sangre, derivada de su ozonización, puede tener un efecto catalizador en la desprogramación de las células madre adultas y en la calidad de las células obtenidas y su contenido informativo y energético, influyendo positivamente en la regeneración celular de los tejidos dañados, y además da la seguridad de que el producto es estéril. De hecho, como ya hemos dicho, el ozono puede actuar como desinfectante o bactericida.

CASOS EXPERIMENTALES

El solicitante tuvo la idea del tratamiento con MCSF y ozonización, es decir la adición de ozono o de una mezcla de oxígeno y ozono a la expansión y "desprogramación" con MCSF, tras algunos ensayos in vivo que demostraban la

acción catalizadora del ozono en la terapia realizada con las células madre desprogramadas resultantes de la etapa de crecimiento según la presente descripción.

OZONIZACIÓN SISTÉMICA

5 Un caballo de 15 años de edad fue retirado de la competición debido a una lesión proximal crónica del tendón flexor superficial delantero derecho, por la cual había estado cojeando durante 18 meses (véase fig. 1). Se había tratado por cauterización 6 meses antes, como era habitual hace años (véase fig. 2), pero ello no había tenido ningún efecto terapéutico positivo y en realidad había provocado una esclerosis cicatricial. El caballo estaba en mal estado general y la cauterización había causado una lesión proximal (véase fig. 3) en un área sensible difícil de curar en caballos más viejos. La quemadura produjo una cicatriz que no tuvo ninguna mejoría con la inyección local de células madre expandidas, obtenidas por desprogramación con MCSF, cada 6 semanas, tres veces, es decir, ni siquiera se vio una mejoría mínima en la ecografía o en la cojera. Tras 5 meses de estas inyecciones de células madre expandidas se hizo trabajar al caballo, pero la lesión empezó a empeorar (véanse las figs. 4 y 5).

15 Por lo tanto, en este caso de esclerosis tendinosa provocada por la cauterización, la inoculación local y sistémica de células madre desprogramadas de la sangre, obtenidas por expansión con MCSF, no proporcionó ningún beneficio después de tres inoculaciones realizadas con la frecuencia indicada.

20 A los días de la tercera inoculación se realizó un tratamiento sistémico con ozono mediante una autotransfusión con medio litro de sangre enriquecida con 120 cc de O₂ - O₃, 10 mic.g/ml.

25 Sorprendentemente, el solicitante encontró en ensayos que al introducir el ozono sistémicamente, es decir, mediante una transfusión con sangre autóloga enriquecida con ozono para oxigenar la sangre del paciente, en solo diez/quince días se pudo apreciar el efecto catalítico del ozono, pues la ecografía reveló que la lesión se había resuelto y el caballo ya no cojeaba (véase fig. 6). El tejido patológico, que había sido informado previamente mediante la inoculación de células madre obtenidas de sangre con expansión por MCSF, activando las células madre del miembro del tendón flexor superficial lesionado, se curó por el efecto catalizador del ozono en el proceso regenerativo.

30 Tres meses después de la terapia con ozono, el análisis ecocardiográfico mostró claramente que la lesión estaba curada (véanse las figs. 7 y 8).

35 Como prueba real de curación se hizo correr al caballo durante 15 días y luego fue enviado a competir, con resultados positivos y duraderos. La mejoría revelada por la ecografía fue real, ya que el caballo prosiguió regularmente su carrera competitiva, con un promedio de 6 competiciones mensuales y saltos de hasta un metro sesenta, hasta la edad de 18 años. De hecho el caballo siguió compitiendo durante tres más años sin recaídas, participando en concursos de saltos a los 16 años (véase fig. 9), a los 17 años (véase fig. 10) y hasta los 18 años de edad (véase fig. 11).

40 El efecto catalizador del ozono en las células madre obtenidas de la sangre adulta por expansión y la desprogramación con MCSF se detectó in vivo a través del ensayo descrito anteriormente.

45 Después de este caso, la terapia de ozono se introdujo como agente catalítico en muchos pacientes tratados con células madre obtenidas de sangre, expandidas y desprogramadas con MCSF.

El efecto in vivo sobre las células madre obtenidas de la sangre también permite suponer el mismo efecto catalítico in vitro, es decir, en la sangre dentro de un tubo de ensayo, antes, después o durante el tratamiento con MCSF.

50 OZONIZACIÓN IN VITRO

Tras los resultados obtenidos el solicitante también tuvo la idea nueva e innovadora de introducir el ozono directamente en el recipiente que contenía la sangre y MCSF, para catalizar el proceso de desprogramación y dar un mayor potencial energético-informativo a las células madre obtenidas por cultivo y desprogramación con MCSF.

55 El solicitante estudió el efecto del ozono en la sangre, tanto in vitro como in vivo (véase arriba).

60 Cuando se hace burbujear en la sangre, la mezcla de O₂ - O₃ reacciona en pocos segundos con los ácidos grasos de la capa de fosfolípidos de la membrana celular.

65 Como resultado de esta reacción del ozono O₃ con el enlace doble de los ácidos grasos insaturados, las cadenas de fosfolípidos se rompen y penetran dentro del eritrocito en forma de peróxidos, influyendo en las reacciones dentro del eritrocito, pero sin ir más allá de la membrana celular. Pero, debido al alto poder citotóxico de los peróxidos, el eritrocito reacciona inmediatamente activando el mecanismo de desintoxicación a través del sistema de glutatión. El glutatión así consumido se restablece a través de la derivación de la glicólisis, es decir, por la vía de la pentosa fosfato.

Por lo tanto la hemoglobina (Hb) está protegida contra la oxidación a metahemoglobina, manteniendo la función de HbO₂ y permitiendo la transmisión de oxígeno O₂.

5 También debe tenerse en cuenta el papel especial desempeñado por el 2,3-disfosfoglicerato (2,3-DPG) respecto a la función del eritrocito. El 2,3-DPG está presente en los eritrocitos y su función es modular la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Con el ozono, en particular, el efecto de liberación de oxígeno es creado por el eritrocito en las regiones periféricas.

10 Otra acción interesante es el efecto inmunoestimulante del ozono producido por la inducción de interferón. Entre las células inmunocompetentes, los linfocitos T4 o células colaboradoras tienen un papel fundamental, porque, cuando son activados por los macrófagos, producen sustancias específicas, interleucinas, factores de crecimiento, etc., que actúan como mensajeros intercelulares y facilitan la comunicación entre las células.

15 Una vez activados por las interleucinas, los macrófagos producen el factor de necrosis tumoral (TNF), que sirve de patrón para medir la actividad de las células inmunocompetentes.

20 Por lo tanto, el ozono actúa directamente en las células de la línea blanca e indirectamente a través de la reacción producida en los eritrocitos, desempeñando de papel de catalizador en la función de las líneas celulares de la sangre y, por lo tanto, también en el proceso de desprogramación activado por el MCSF en las células de la línea blanca.

25 En cuanto a la relación de sangre a mezcla de O₂ - O₃, el solicitante encontró que este valor es preferiblemente una relación estequiométrica de 1: 1.

30 Además el solicitante encontró que la cantidad de la mezcla de O₂ - O₃ en la muestra de sangre puede ser superior o igual a 1 mic.g/l aproximadamente, elegida en particular de un intervalo aproximado de 1 mic.g/ml hasta 42 mic.g/ml, más particularmente de 5 mic.g/ml hasta 30 mic.g/ml aproximadamente, aún más particularmente de 10 mic.g/ml hasta 20 mic.g/ml aproximadamente. Un ejemplo puede proporcionar una cantidad de mezcla de O₂ - O₃ de 12 mic.g/ml aproximadamente. Otro ejemplo puede proporcionar una cantidad de mezcla O₂ - O₃ de 15 mic.g/ml aproximadamente. Otro ejemplo puede proporcionar una cantidad de mezcla O₂ - O₃ de 18 mic.g/ml aproximadamente.

EJEMPLO DE TRATAMIENTO TERAPÉUTICO DE LA PATOLOGÍA DEGENERATIVA DEL MIOCARDIO

35 El solicitante realizó un ensayo para demostrar la eficacia clínica de las células madre obtenidas de la desprogramación en sangre entera ozonizada y administrada en patologías degenerativas del miocardio.

40 Las figs. 12 y 13 son dos tablas que contienen parámetros significativos de la función contráctil, a fin de comparar los resultados terapéuticos de patologías con insuficiencia cardíaca de 11 perros, empleando células madre obtenidas del modo descrito en la patente WO-A-2008/034370, y de 3 perros, empleando células madre obtenidas con el método según la presente descripción, es decir, mediante cultivo y desprogramación por MCSF y ozonización (sangre entera ozonizada). Al comparar los parámetros se puede ver claramente la mejoría por el aumento de la capacidad contráctil al usar el método aquí descrito, en comparación con la patente WO-A2008/034370, y en particular por el hecho de que esta mejoría ya tiene lugar a corto plazo (control a los 45 días).

45 En particular el solicitante trató 3 perros (1 gran danés macho, 1 Terranova macho, 1 Dobermann hembra) de edades similares (6-7) afectados por miocardiopatía dilatada primaria en sus etapas avanzadas (una patología que causa la pérdida progresiva de la función contráctil, actualmente sin posibilidad de regresión con ningún tipo de terapia), con depresión grave de la función contráctil (15-20% de FS). Los perros fueron tratados con células madre expandidas y desprogramadas con MCSF, de sangre entera ozonizada, y administradas sin ninguna purificación por vía intravenosa y subcutánea en la zona cardíaca. Las imágenes ecocardiográficas de las figs. 14 y 16 muestran la situación de dos pacientes diferentes (la hembra Dobermann Chanel y el macho Terranova Leonardo según la tabla de la figura 13) antes del tratamiento, donde se pueden ver los parámetros de la función contráctil: valores extremadamente negativos de DsVSx (diámetro sistólico del ventrículo izquierdo), % de FS y % de FE.

55 En cambio, como se puede ver en las imágenes ecocardiográficas de las figs. 15 y 17 de los mismos dos pacientes después del tratamiento, el solicitante encontró un aumento de la capacidad contráctil medida por la evaluación lineal y volumétrica (método de Teicholz y Simpson) de los parámetros de la función contráctil DsVSx (diámetro sistólico del ventrículo izquierdo), % de FS y % de FE. Este efecto ya fue mucho más pronunciado a corto plazo (control a los 45 días, respecto a los resultados obtenidos en el mismo período de tiempo con pacientes tratados previamente con el tipo de células madre purificadas, obtenidas de la sangre tal como se describe en la patente WOA-2008/034370).

65 La mejoría vista por el solicitante también fue mucho más rápida respecto a los efectos causados por la patología degenerativa del miocardio en el estado general y en la evaluación clínica de la clase ISACHS de la insuficiencia cardíaca, observándose recuperación del apetito, aumento significativo de peso y mejora considerable del rendimiento físico y de la resistencia al estrés al cabo ya de 1 mes.

5 Por lo tanto el solicitante concluyó que el método para expandir células madre adultas de la sangre, que comprende el crecimiento por MCSF y la ozonización de acuerdo con la presente invención, permite recuperar la contractilidad del miocardio que había llegado a ser deficiente a causa de su degeneración: en el momento actual no tendría ninguna posibilidad de recuperación con la terapia del estado técnico. De hecho, en el campo de la veterinaria se han intentado otras soluciones a través de la medicina regenerativa, pero incluso la inoculación de células madre mesenquimáticas de diferente origen (médula ósea, grasa) en el propio miocardio no ha dado resultados terapéuticos significativos.

10 Mediante células madre obtenidas de la sangre, que tienen un componente pluripotente para poder interactuar con el músculo y su inervación, los resultados fueron positivos, con una mejoría gradual a lo largo del tiempo. Sin embargo el efecto más sorprendente se encontró con la administración de células madre adultas de sangre entera ozonizadas y no purificadas, por vía intravenosa y subcutánea en la zona cardíaca, lo cual mejoró el resultado terapéutico en comparación con las células purificadas, obteniéndose un mejor resultado en un parte tiempo mucho más corto.

15 Las imágenes ecocardiográficas de las figs. 14, 15, 16 y 17 demuestran cuan excepcionales fueron las mejorías obtenidas.

20 Naturalmente se pueden hacer modificaciones y/o adiciones en partes del método anteriormente descrito de expansión de células madre adultas de sangre entera, sin apartarse del campo y del alcance de la presente invención.

25 También es evidente que, aunque la presente invención haya sido descrita haciendo referencia a algunos ejemplos concretos, una persona experta en la técnica será capaz de lograr muchas otras formas equivalentes del método para expandir células madre adultas de sangre entera que tengan las características establecidas en las reivindicaciones y que, por tanto, entren todas ellas dentro del ámbito de protección definido de esta manera.

REIVINDICACIONES

1. Método para expandir células madre adultas procedentes de la sangre, que consiste en:
- 5 - cultivar y desprogramar las células madre adultas de una muestra de sangre extraída, empleando el tratamiento in vitro de la muestra de sangre con MCSF;
- ozonizar la muestra de sangre.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, siempre que la ozonización de la muestra de sangre se lleve a cabo antes del tratamiento con MCSF.
3. Método según la reivindicación 1, siempre que la ozonización de la muestra de sangre se lleve a cabo durante de tratamiento con MCSF.
- 15 4. Método según la reivindicación 1, siempre que la ozonización de la muestra de sangre se lleve a cabo después del tratamiento con MCSF.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que prevé el aporte de una mezcla de O₂ - O₃ a la muestra de sangre.
- 20 6. Método según la reivindicación 5, que prevé una relación estequiométrica 1:1 de sangre a mezcla de O₂ - O₃.
7. Método según la reivindicación 5 o 6, que prevé una cantidad de mezcla de O₂ - O₃ en la muestra de sangre superior o igual a 1 mic.g/l aproximadamente.
- 25 8. Método según la reivindicación 7, siempre que la cantidad de mezcla de O₂ - O₃ en la muestra de sangre esté seleccionada de un intervalo entre 1 mg/ml y 42 mg/ml aproximadamente.
- 30 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que prevé la adición de un anticoagulante a la muestra de sangre.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que proporciona el empleo de un kit para recoger sangre, el cual incluye un recipiente capaz de contener la sangre extraída y además lleva al menos la sustancia MCSF.
- 35 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el cual prevé que la cantidad de sangre recogida y sometida al cultivo y desprogramación con MCSF y a la ozonización esté comprendida entre 0,2 ml y 100 ml.
- 40 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el cual prevé que la cantidad de sangre recogida y sometida al cultivo y desprogramación con MCSF y a la ozonización esté comprendida entre 2 ml y 10 ml.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el cual prevé que la cantidad de sangre recogida y sometida al cultivo y desprogramación con MCSF y a la ozonización esté comprendida entre 3 ml y 5 ml.
- 45 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el cual prevé que la concentración de MCSF esté comprendida en un intervalo de 1 nM hasta 55 nM aproximadamente.
- 50 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que prevé un tiempo de cultivo y desprogramación por tratamiento con MCSF comprendido entre 4 horas y 96 horas.



fig. 1



fig. 2

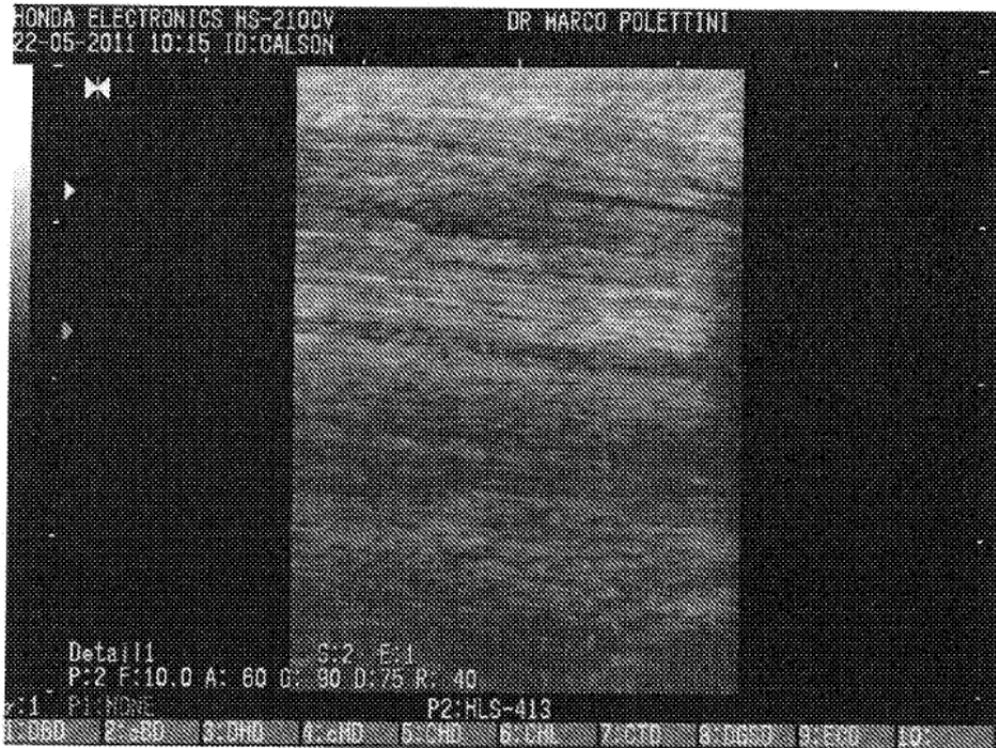


fig. 3



fig. 4

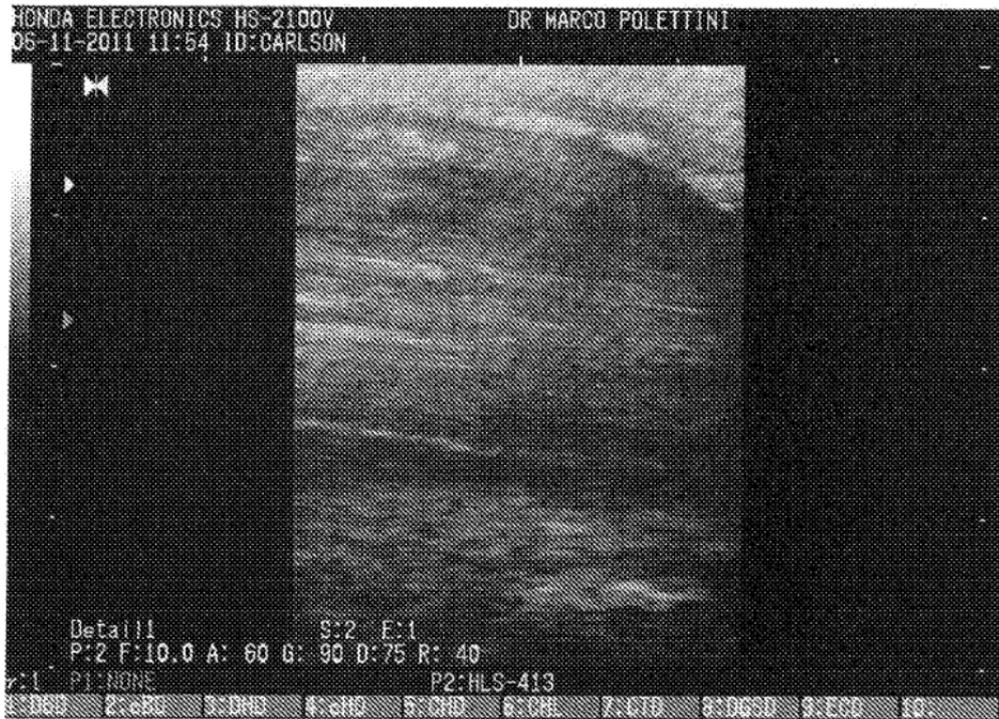


fig. 5



fig. 6



fig. 7

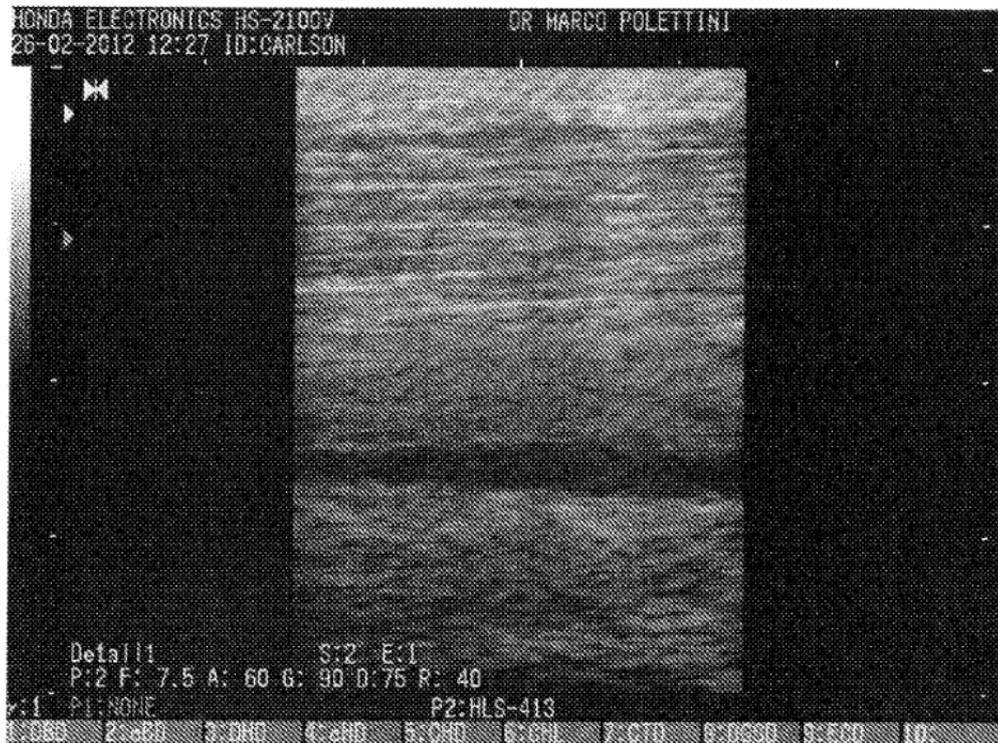


fig. 8

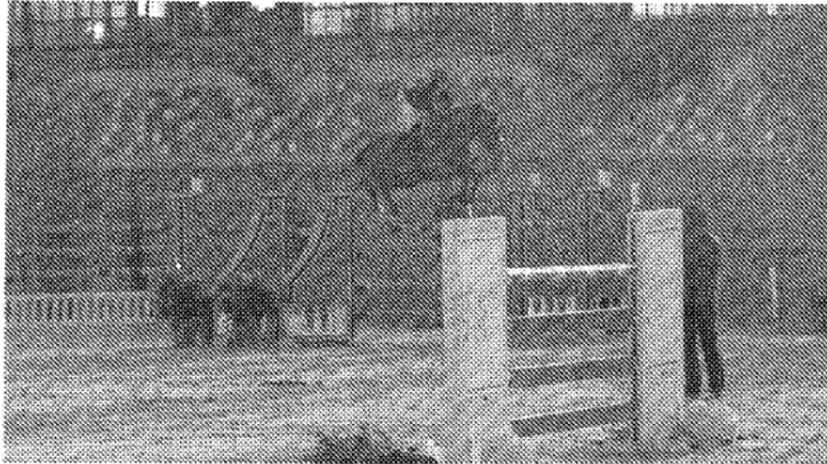


fig. 9

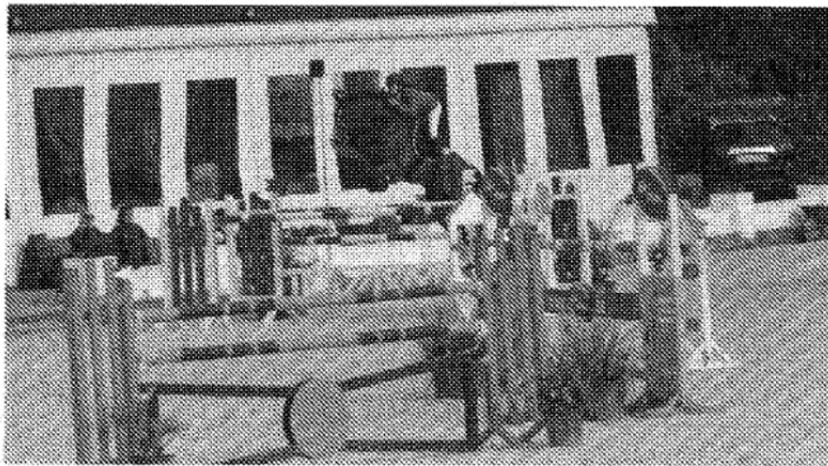


fig. 10

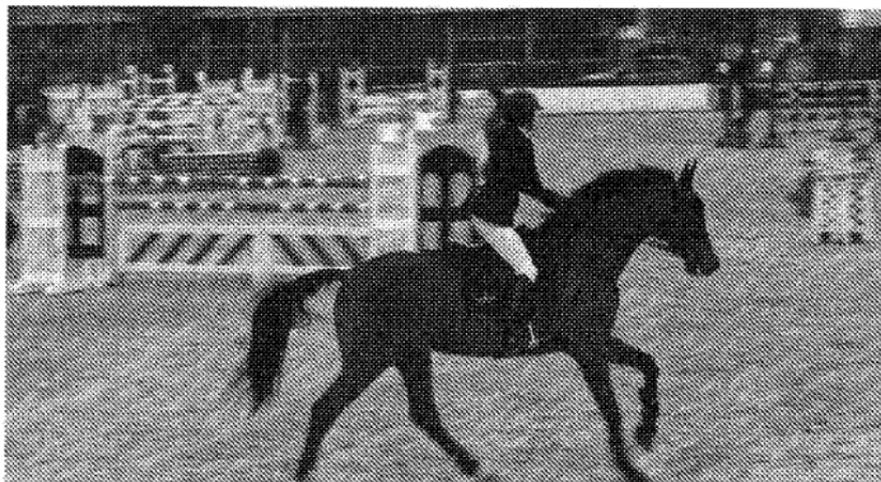


fig. 11

ES 2 690 253 T3

PACIENTE	T0			120 días			Al cabo de 1 año		
	FS FE %	Insuficiencia cardíaca clase	Peso	FS FE %	Insuficiencia cardíaca clase	Peso	FS FE %	Insuficiencia cardíaca clase	Peso
MIRO	16 29	IV	54 kg	18 34	II/III	52 kg	20 40	II	67 kg
SCOOBY	23 44	III	56 kg	24 46	II	62 kg	28 54	II	66 kg
THOR	20 42	III/IV	60 kg	24 47	II/III	63 kg	26 51	II	69 kg
GIOVE	17 33	IV	61 kg	21 41	III	65 kg		Muerto	
IGOR	18 38	III	56 kg	18 39	III	58 kg		Control no realizado	
VICENZA	16 31	IV	44 kg	18 36	III	47 kg		Muerto	
SILERI	23 45	I	53 kg	24 46	I	53 kg		Control no realizado	
DOBERMANN		III			II			Muerto	
DOBERMANN	25 52	II	34 kg	25 52	I	36 kg	26 52	I	36 kg
AMSTAFF		IV			III			Control no realizado	
DALMATIAN	19 39	IV	23 kg	22 45	III	26 kg	28 53	II	28 kg

fig. 12

	T0				45 días			
	FS FE	DsVSX	Insuficiencia cardíaca clase	Peso	FS FE	DsVSX	Insuficiencia cardíaca clase	Peso
DOBERMANN CHANEL	30% 15%	52 mm	III	33 kg	58% 29%	39 mm	I	38 kg
GRAN DANÉS SCOOBY	50% 24%	66 mm	I	59 kg	60% 30%	61 mm	0	64 kg
TERRANOVA LEONARDO	27% 13%	72 mm	IV	60 kg	50% 25%	62 mm	II	68 kg

fig. 13

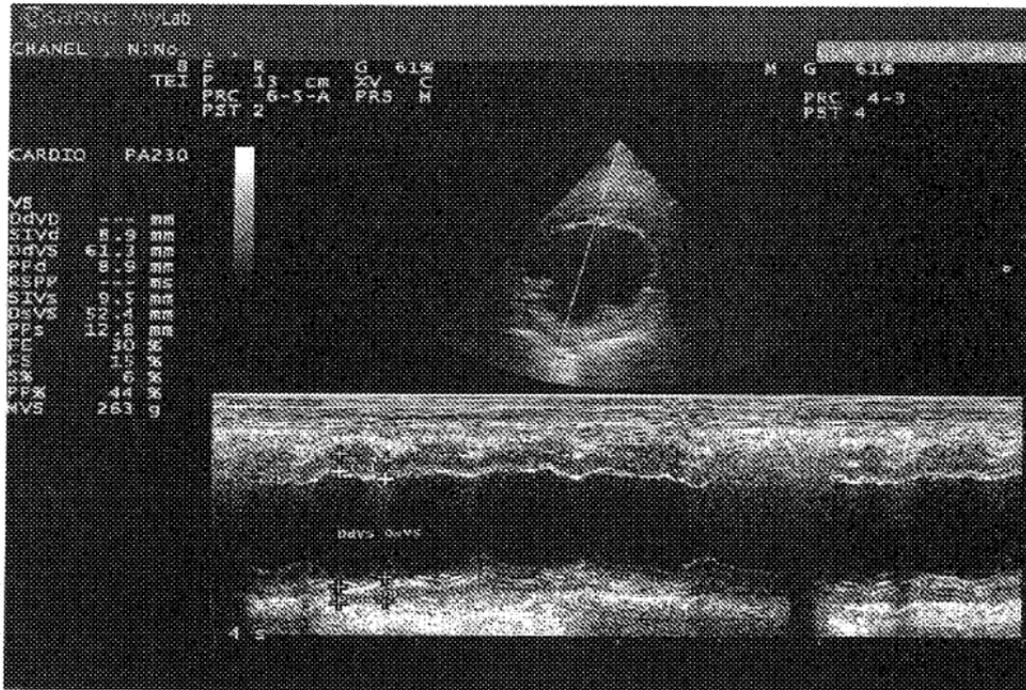


fig. 14

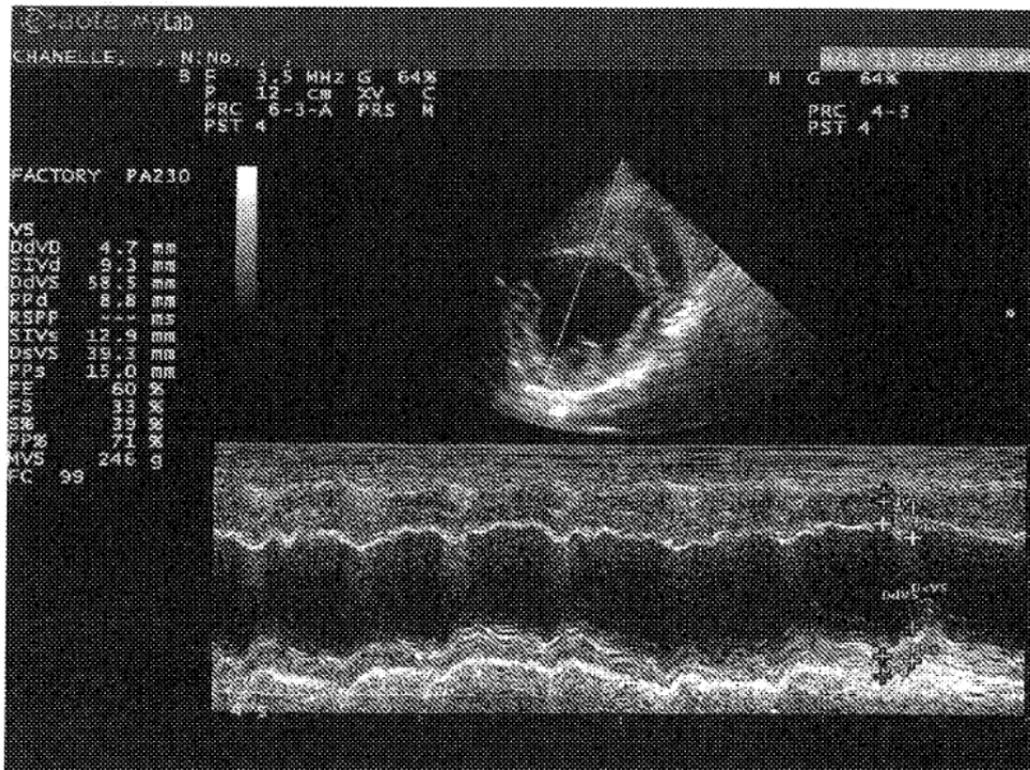


fig. 15

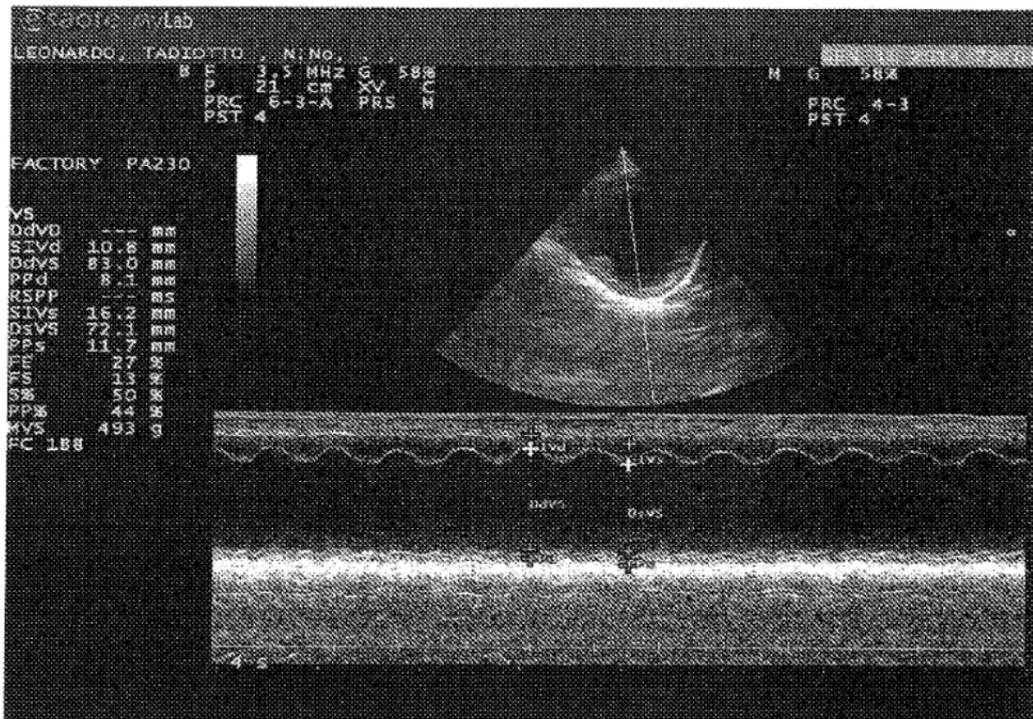


fig. 16

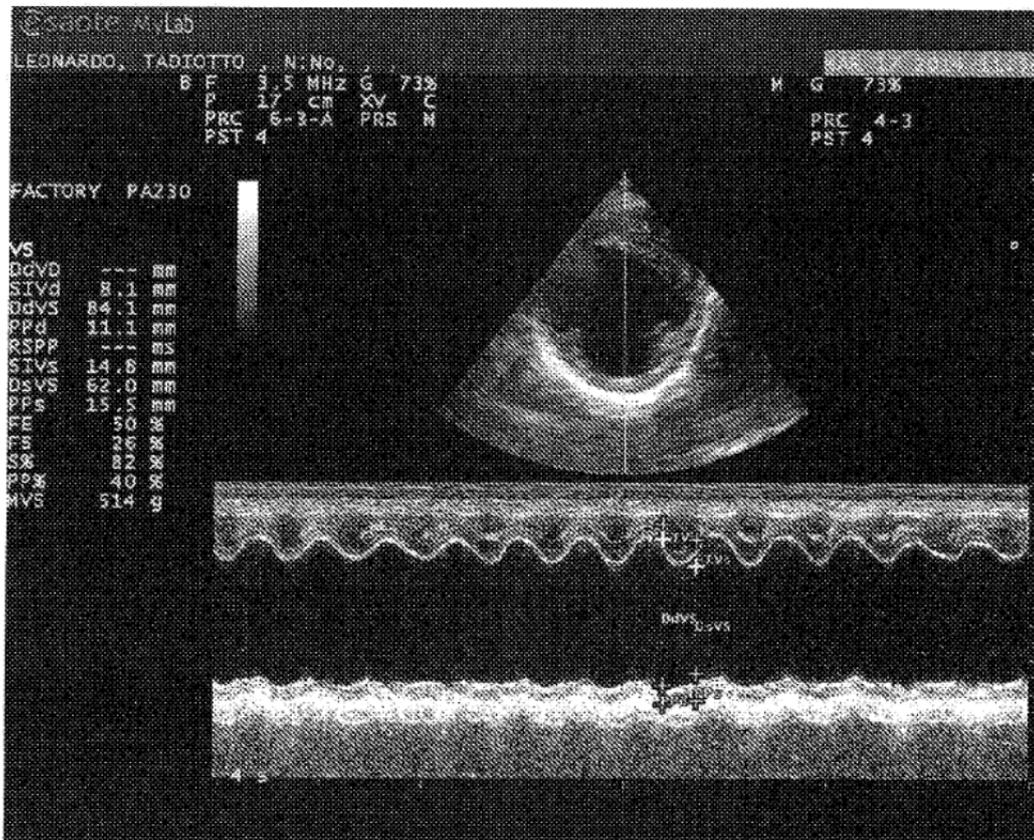


fig. 17