

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 921**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 11/00 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2013 PCT/US2013/060181**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2014 WO14047067**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2013 E 13839621 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2898064**

54 Título: **Composiciones para tratar y prevenir lesión y enfermedad tisular**

30 Prioridad:

19.09.2012 US 201261703203 P

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

29.04.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PETERSON, DALE, R.;
MATTERN, RALPH-HEIKO;
WILSON-WIRTH, COREY y
OHASHI, KEVIN, L.**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 710 921 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

Composiciones para tratar y prevenir lesión y enfermedad tisular

5 Antecedentes**Campo**

10 La presente invención se refiere a nuevas composiciones que comprenden células multipotentes y/o tejido microvascular como se define en las reivindicaciones, que se ha esterilizado y tratado para inactivar cualquier virus, y las composiciones para uso en el tratamiento o la prevención de lesiones y enfermedades tisulares, tales como, por ejemplo, artritis.

15 Descripción de la técnica relacionada

15 Las lesiones en los tejidos blandos, tales como músculos, tendones, ligamentos y cápsulas articulares, se producen con bastante frecuencia. Generalmente las lesiones de ese tipo dan como resultado una disfunción tisular caracterizada por dolor, inflamación y estrés tisular interno, y en última instancia pueden dar como resultado una discapacidad funcional. Por ejemplo, mientras que los esguinces de los tendones se curarán de forma espontánea, los desgarros completos de un tendón a menudo conducirán a discapacidad si no se tratan de forma quirúrgica. Incluso a pesar de la reparación quirúrgica, aproximadamente un 15 % del tendón de Aquiles y un 40 % de dos reparaciones de tendón del manguito rotador del tendón fallan posteriormente. Además, en raras ocasiones el tendón reparado vuelve a los niveles de fuerza y funcionalidad que tenían antes de la lesión.

25 La reparación tisular generalmente incluye varias fases, que incluyen una respuesta inflamatoria inicial seguida por la proliferación celular y la remodelación tisular. Los procesos fundamentales de reparación tisular incluyen tanto fibroplasia como angiogénesis. Los fibroblastos activados por mediadores inflamatorios migran en la herida, proliferan y depositan una matriz extracelular rica en colágeno, mientras que los capilares en el tejido dañado crecen hacia la zona de reparación para restablecer el flujo sanguíneo. Durante el proceso de remodelación, el tejido cicatricial se reabsorbe y se reemplaza con colágeno orientado, más denso, para producir tejido con algunas de las características del tejido original.

35 El documento US 2012/164113 A1 desvela métodos para tratar tejido adiposo usando cavitación ultrasónica para disociar las células grasas y los vasos sanguíneos contenidos dentro del tejido adiposo y, por lo tanto, para obtener fracciones vasculares mesenquimales o estromales para uso en sujetos humanos. El documento WO 2012/024573 desvela una población de células madre perivasculares purificadas (PSC) o células madre pluripotentes inducidas (iPS) y un sobrenadante de células madre libres a partir de la célula madre, una composición que comprende cualquiera de estos, y un método de uso y fabricación de los mismos. El documento laea: "Bioburden Radiation Sterilization of Tissue Allografts: Requirements for Validation and Routing Control A Code of Practice", 1 de enero de 40 2007, desvela la esterilización por radiación de aloinjertos de tejido.

Sumario

45 Se ha desarrollado una diversidad de diferentes métodos terapéuticos para ayudar en la reparación tisular. Estos incluyen estructuras físicas, tales como mejores suturas, anclajes óseos, y parches o implantes para proporcionar armazones para el crecimiento de tejidos. Además, se ha usado una diversidad de factores de crecimiento para mejorar el crecimiento del tejido y la migración al sitio de la herida, así como para estimular la angiogénesis. Por ejemplo, hay informes de mejoría de la cicatrización del tendón usando factores de crecimiento tales como BMP-2, BMP-12, PDGF-BB y bFGF en modelos preclínicos.

50 Más recientemente, se han realizado esfuerzos para usar células madre para estimular la cicatrización de heridas y la regeneración tisular. Se cree que las células madre median en la cicatrización mediante cualquiera de una diversidad de diferentes mecanismos, que incluyen: modulación del proceso inflamatorio; migración al tejido dañado y reclutamiento de otras células, tales como células precursoras endoteliales, necesarias para el crecimiento tisular; estimulación de la proliferación de células reparadoras; soporte para el remodelado de tejidos sobre la formación de cicatrices; inhibición de la apoptosis; y diferenciación en tejido óseo, cartilaginoso, tendinoso, o ligamentoso. Ha habido una serie de informes que describen el uso de células madre para el tratamiento o la generación de muchos tejidos diferentes. Gran parte de este trabajo se ha centrado en el uso de células madre obtenidas a partir de tejido adiposo y otras células multipotentes, porque se obtienen fácilmente en grandes cantidades. Sin embargo, debido a 60 la preocupación de que las células o tejidos alogénicos trasplantados pueden invocar una respuesta inmunológica y por último rechazo, o pueden transferir virus dañinos u otros patógenos, este trabajo se ha centrado en el uso de células autólogas. Desafortunadamente, sin embargo, el uso de células madre autólogas es inconveniente. Requiere dos procedimientos quirúrgicos distintos con dolor asociado, coste y morbilidad, y también existen riesgos asociados con el envío del tejido a un laboratorio para su procesamiento y retrasos en el tratamiento del paciente lesionado.

65

Claramente, en la técnica existe la necesidad de nuevas composiciones terapéuticas de células madre alogénicas y otras células multipotentes útiles para el tratamiento de reparación de lesión tisular sin causar una respuesta inmunitaria no deseada. La presente invención satisfacer esta necesidad y proporciona otras ventajas.

5 Por lo tanto, se proporcionan, en varias realizaciones, nuevas composiciones y un recipiente impermeable a la humedad que comprende las composiciones que son útiles, tal como en la reparación y/o regeneración del tejido.

10 En varias realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden tejido microvascular procesado, en las que el tejido microvascular procesado comprende células multipotentes aisladas o una membrana celular obtenida a partir de o derivada de dichas células multipotentes o tejido microvascular, en el que dicha composición tiene actividad angiogénica o antiinflamatoria, en el que dicha composición se esteriliza mediante irradiación y los virus dentro de dicha composición están inactivados, y en las que la esterilización por irradiación se realiza por exposición de la composición a radiación gamma o radiación de haz electrónico a una dosificación en el intervalo de 0,5 Mrad a 5,0 Mrad. En realizaciones particulares, las células o composición no se han cultivado. En realizaciones particulares, una cantidad inferior o igual a un 50 % o una cantidad inferior o igual a un 10 % de las células presentes en la composición son viables. En realizaciones particulares, esencialmente ninguna de las células presentes en dicha composición es viable. En ciertas realizaciones, al menos un 1 % de dichas células excluye el azul de tripano. En realizaciones particulares, la composición se seca, se liofiliza o se crioconserva. En realizaciones relacionadas, la composición, que incluye la composición esterilizada, seca, liofilizada, o crioconservada, mantiene una actividad angiogénica o antiinflamatoria mensurable cuando se almacena aproximadamente a temperatura ambiente durante al menos un mes. En ciertas realizaciones, la composición comprende un excipiente.

25 En varias realizaciones, las composiciones que se desvelan en el presente documento comprenden adicionalmente un armazón o matriz implantable, que puede ser, por ejemplo, un implante obtenido a partir de hueso, un armazón de biofibra, un polímero poroso reabsorbible, un hidrogel, un producto tisular que comprende una masilla, o una sutura. En particular, las células, tejido o membrana celular están presentes en un hueso, tendón, o superficie colocada frente a la dermis de dicho armazón o matriz implantables.

30 En ciertas realizaciones, una composición de la presente invención se formula para administración intravenosa. Sin embargo, en realizaciones adicionales se pueden usar otras vías de administración, incluyendo la administración directa (ya sea en una superficie del tejido o mediante inyección directa), administración intraarterial, administración sistémica y similares.

35 En varias realizaciones, las células o tejido se obtuvieron a partir de un donante mamífero, opcionalmente un ser humano. En una realización, el donante era un mamífero sano en el momento en el que se obtuvieron las células o tejido. En ciertas realizaciones, las células comprenden células madre o células precursoras.

40 También se desvelan métodos para preparar una composición que comprende células multipotentes aisladas, en el que dicha composición tiene actividad angiogénica o antiinflamatoria, comprendiendo dicho método: disociar una muestra de tejido obtenida a partir de un mamífero donante para liberar una pluralidad de células multipotentes en la misma; separar una pluralidad de las células multipotentes liberadas de uno u otros componentes más del tejido para producir una composición que comprende células multipotentes aisladas; opcionalmente secando, liofilizando, o crioconservando la composición antes o después de la esterilización; esterilizar la composición y/o inactivar el virus presente en la composición, antes o después del secado, liofilización o crioconservación opcional de la composición, en los que la composición esterilizada mantiene una actividad angiogénica o antiinflamatoria mensurable. Las células o la composición pueden no estar cultivadas. Opcionalmente el método comprende la filtración de las células o la composición liberadas, por ejemplo, que puede ser antes de la esterilización o secado, liofilización o crioconservación. La disociación puede comprender poner en contacto la muestra de tejido con una o más proteasas. La una o más proteasas puede no comprender colagenasa. La una o más proteasas pueden comprender o consistir en: colagenasa de tipo 1 y dispasa o termolisina; o MMP2, MMP 14 y dispasa o termolisina. Se pueden usar combinaciones de estas proteasas (u otros equivalentes funcionales). La disociación o separación puede comprender agitación ultrasónica, filtración, o uso de un gradiente de densidad. El tejido puede ser tejido obtenido a partir de tejido adiposo, y la agitación ultrasónica, filtración o uso de un gradiente de densidad separar dichas células multipotentes liberadas de los adipocitos.

55 También se desvelan métodos para preparar una composición que comprende tejido microvascular procesado, en el que dicha composición tiene actividad angiogénica o antiinflamatoria, comprendiendo dicho método: disociar una muestra de tejido microvascular obtenida a partir de un mamífero donante para producir una composición que comprende tejido microvascular disociado; eliminar uno o más componentes de tejido de la composición que comprende tejido microvascular disociado; opcionalmente secando, liofilizando, o crioconservando la composición antes o después de la esterilización; y esterilizar la composición y/o inactivar el virus presente en la composición antes del secado, liofilización, o crioconservación opcional, en los que la composición esterilizada mantiene una actividad angiogénica o antiinflamatoria mensurable. Las células o la composición pueden no estar cultivadas. El método puede comprender adicionalmente la filtración de la composición. La disociación puede comprender poner en contacto la muestra de tejido con una o más proteasas. La una o más proteasas puede no comprender colagenasa. La una o más proteasas pueden comprender o consisten en: colagenasa de tipo 1 y dispasa o

termolisina; o MMP2, MMP 14 y dispasa o termolisina. La disociación o eliminación puede comprender agitación ultrasónica, filtración, o uso de un gradiente de densidad. El tejido microvascular puede ser tejido obtenido a partir de tejido adiposo, y dicha agitación ultrasónica, filtración o uso de un gradiente de densidad elimina los adipocitos de la composición.

5 En una realización adicional, la presente invención proporciona un recipiente impermeable a la humedad que comprende una composición seca, estéril, en la que dicha composición comprende tejido microvascular procesado, en la que el tejido microvascular procesado comprende células multipotentes aisladas o una membrana celular obtenida a partir de o derivada de dichas células multipotentes o tejido microvascular, dicha composición tiene actividad angiogénica o antiinflamatoria, dicha composición se esteriliza mediante irradiación y los virus dentro de dicha composición están inactivados, en la que la esterilización por irradiación se realiza por exposición de la composición a radiación gamma o radiación de haz electrónico a una dosificación en el intervalo de 0,5 Mrad a 5,0 Mrad y dicha composición mantiene una actividad angiogénica o antiinflamatoria mensurable cuando se almacena aproximadamente a temperatura ambiente durante al menos un mes. En ciertas realizaciones, las células o composición no se han cultivado. En realizaciones particulares, una cantidad inferior o igual a un 50 % o una cantidad inferior o igual a un 10 % de las células presentes en dicha composición son viables. En ciertas realizaciones, esencialmente ninguna de las células presentes en dicha composición es viable. En realizaciones particulares, al menos un 1 % de dichas células excluye el azul de tripano. En realizaciones particulares, la composición comprende un excipiente.

20 En realizaciones particulares del recipiente impermeable a la humedad, la composición comprende adicionalmente un armazón o matriz implantable. En realizaciones particulares, el armazón o matriz implantable es un implante obtenido a partir de hueso, un armazón de biofibra, un polímero poroso reabsorbible, un hidrogel, un producto tisular que comprende una masilla, o una sutura. En ciertas realizaciones, las células, tejido o membrana celular están presentes en un hueso, tendón o superficie colocada frente a la dermis de dicho armazón o matriz implantable.

En una realización del recipiente impermeable a la humedad, la composición se formula para administración intravenosa.

30 En realizaciones particulares del recipiente impermeable a la humedad de la invención, las células o tejido se obtuvieron a partir de un donante mamífero, opcionalmente un ser humano. En realizaciones particulares, el donante era un mamífero sano en el momento en el que se obtuvieron las células o tejido. En ciertas realizaciones, las células comprenden células madre o células precursoras. En ciertas realizaciones, el recipiente es un vial que comprende un cierre sellado hermético. En diversas realizaciones, el recipiente está presente dentro de un envase sellado herméticamente que comprende un interior estéril.

40 En otra realización relacionada, la presente invención se refiere a la composición como se define en las reivindicaciones para uso en el tratamiento o la prevención de una lesión o enfermedad, o para estimular la regeneración tisular, en un mamífero. En realizaciones particulares, la composición se implanta por vía quirúrgica en el mamífero. En ciertas realizaciones, la composición se implanta dentro o aquella frente a un sitio de lesión o enfermedad en dicho mamífero. En realizaciones relacionadas, la composición se proporciona a dicho mamífero por vía intravenosa. En ciertas realizaciones, la lesión está presente en un tejido blando. En realizaciones particulares, la lesión está presente en un tendón, un ligamento, piel, un hueso, un cartilago, un disco, o tejido microvascular. En realizaciones particulares, la lesión o enfermedad es una lesión isquémica, una lesión por reperfusión, una lesión microvascular, o inflamación. En ciertas realizaciones, la enfermedad es artritis, tal como por ejemplo, osteoartritis o artritis reumatoide.

50 En el contexto de la presente invención también se desvelan composiciones que comprenden células multipotentes y uno o más componentes de la pared del recipiente y/o de la matriz extracelular. En el contexto de la presente invención también se desvela una composición esterilizada que comprende células multipotentes. En el contexto de la presente invención también se encuentra una composición que comprende células multipotentes que excluyen el azul de tripano pero que no proliferarán. En el contexto de la presente invención también se encuentra una composición que comprende células multipotentes y uno o más componentes de la pared del recipiente y de la matriz extracelular. En el contexto de la presente invención también se desvela una composición esterilizada que comprende células multipotentes. En el contexto de la presente invención también se encuentra una composición que comprende células multipotentes esterilizadas que excluyen el azul de tripano pero que no proliferarán. En el contexto de la presente invención también se desvelan composiciones, en las que al menos un 50 % o al menos un 90 % de las células presentes en la composición excluyen el azul de tripano pero que no proliferarán. La composición puede comprender células multipotentes. Al menos un 50 % o al menos un 90 % de las células multipotentes presentes en la composición pueden excluir el azul de tripano pero que no proliferarán. Puede ser viable una cantidad inferior o igual a un 50 % o una cantidad inferior o igual a un 10 % de las células totales presentes en la composición. Esencialmente ninguna de las células presentes en dicha composición puede ser viable. Cualquiera de las composiciones o métodos que se desvelan en el contexto de la presente invención, al menos un 1 % o al menos un 5 %, o al menos un 10 %, o al menos un 20 %, al menos un 50 %, o al menos un 90 % de dichas células excluye el azul de tripano.

En el contexto de la presente invención también se desvela una composición esterilizada que comprende dos o más componentes de las células multipotentes. La composición puede comprender cinco o más o diez o más componentes de las células multipotentes. En el contexto de la presente invención también se encuentra una composición que comprende membrana celular y proteínas de células multipotentes. La composición puede no comprender ninguna célula viable o no comprende ninguna célula intacta.

Además, las composiciones de la presente invención son para uso en el tratamiento o la prevención de una lesión o enfermedad en un mamífero, incluyendo cualquiera de las lesiones o afecciones que se describen en el presente documento, en las que dichas células multipotentes no son autólogas para dicho sujeto.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 proporciona un diagrama esquemático de los estudios que se describen en el Ejemplo 1.

La Figura 2 es un gráfico que muestra los recuentos celulares calculados con un aumento de 100X de células en 6 campos. Las células BMA y BMB en los tampones 1 y 2 después y antes de de irradiación (Control) se usaron para atraer a las células HUVEC que se etiquetaron con CM-Dil. El recuento celular se calculó mediante un recuento visual de 6 imágenes (campos) con un aumento de 100X. Se hizo el promedio de los recuentos y se representaron como se muestra. Las líneas de puntos representan el promedio los controles de medios negativos. Los índices celulares por encima de esa línea representan un aumento de la liberación debida a las muestras de material de BMA o BMB. Las etiquetas que se muestran de la parte superior a la inferior corresponden a las barras que se muestran de izquierda a derecha para cada punto temporal.

La Figura 3 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de células endoteliales humanas etiquetadas en presencia de BMA en Tampón 1 durante un transcurso de tiempo de 12, 24 y 48 horas de transmigración.

La Figura 4 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de células endoteliales humanas etiquetadas en presencia de BMB en Tampón 1 durante un transcurso de tiempo de 12, 24 y 48 horas de transmigración.

La Figura 5 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de células endoteliales humanas etiquetadas en presencia de BMA en Tampón 2 durante un transcurso de tiempo de 12, 24 y 48 horas de transmigración.

La Figura 6 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de células endoteliales humanas etiquetadas en presencia de BMB en Tampón 2 durante un transcurso de tiempo de 12, 24 y 48 horas de transmigración.

La Figura 7 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de células endoteliales humanas etiquetadas. La muestra en la parte izquierda es EZ-CPZ™ sin diluir, que es representativo de los tampones 1 y 2 en los que se conservaron las células. EZ-CPZ™ es un medio de criopreservación (Incell Corp., San Antonio, TX). Incell Corp. describe EZ-CPZ™ como un medio de criopreservación sin suero y sin proteína, listo para usar, que se mezclan ligeramente a 1:1 (v:v) con una suspensión celular. EZ-CPZ™ soporta una viabilidad celebrada y reanimación de una diversidad de tipos de células que incluyen: cultivos de células primarias, linfocitos, hibridoma, CHO, colon, IBHK y líneas de células de cáncer. EZ-CPZ™ contiene una formulación patentada de componentes de calidad clínica, agentes de vitrificación y criopreservación, y una concentración final de DMSO al 5%. EZ-CPZ™ proporciona crioprotección a células humanas y de otros mamíferos. En la parte derecha aparece una mezcla a 50:50 de EZ-CPZ y medio definido por M3D™ (Incell Corp., San Antonio, TX), que es representativo de los tampones en los que se conservará el material de la composición de tejido microvascular procesado. Incell Corp. describe M3D™ como un medio definido que contiene sales, aminoácidos, y azúcares, pero no factores de crecimiento o componentes indefinidos tales como suero o extractos. Se formaron imágenes del transcurso del tiempo de transmigración en los puntos temporales de 12 y 48 horas.

La Figura 8 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia. Las células SVF se sembraron en placas en una placa de 48 pocillos y se cultivaron hasta una confluencia de aproximadamente un 50%. El material de BMA se tiñó con CMDil y se aclaró. 50 µl del material de BMA se pusieron en un solo pocillo de células SVF en crecimiento. Se observa fluorescencia cuando las SVF han tomado el material teñido con CMDil y lo han incorporado en sus propias membranas. El material de BMA en el Tampón 1 se representa en la fila de la parte superior, y el material de BMA en el Tampón 2 se representa en la fila de la parte inferior. El material en la parte izquierda se irradió y el material en del lado derecho (Cont) no se irradió.

La Figura 9 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia. Las células SVF se sembraron en placas en una placa de 48 pocillos y se cultivaron hasta una confluencia de aproximadamente un 50%. El material de BMB se tiñó con CMDil y se aclaró. 50 µl del material de BMA se pusieron en un solo pocillo de células SVF en crecimiento. Se observa fluorescencia cuando las SVF han tomado el material teñido con CMDil y lo han incorporado en sus propias membranas. El material de BMB en el Tampón 1 se representa en la fila de la parte superior, y el material de en el Tampón 2 se representa en la fila de la parte inferior. El material en la parte izquierda se irradió y el material en del lado derecho (Cont) no se irradió.

La Figura 10 representa datos relacionados con la migración de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) como respuesta a exposición a tejido microvascular. Se hizo el recuento del número de células HUVEC que cruzan la membrana de una placa Transwell a las 48 horas y se comparó con los medios de cultivo + controles de EGF.

5 La Figura 11 representa datos relacionados con el restablecimiento del flujo sanguíneo a las patas traseras de ratones después de sección transversal de la arteria femoral el día 0, y los días 7 y 14 después de la administración de cualquiera de tejido microvascular liofilizado o esterilizado.

10 La Figura 12 representa datos relacionados con la generación de nuevos vasos sanguíneos en ratones SCID Después de inyecciones con matrigel solo, o en combinación con cualquiera de tejido microvascular liofilizado o esterilizado.

15 Las Figuras 13A-13C se refieren a la regeneración de hueso después del implante de tejido microvascular. La Figura 13A representar datos que se relacionan con la resistencia, módulo elástico, y dureza (en comparación con el hueso contralateral de control) después de la administración de un armazón con o sin tejido microvascular. La Figura 13B representa datos histológicos con respecto a la regeneración ósea después de la aplicación del armazón solo. La Figura 13C representa datos histológicos con respecto a la regeneración ósea después de la aplicación del armazón en combinación con tejido microvascular.

20 Las Figuras 14A-14H se refieren a la regeneración de cartílago después del implante de tejido microvascular. La Figura 14A muestra una imagen macroscópica de cartílago tratado solamente con el armazón, mientras que las Figuras 14B, 14C, y 14D muestran imágenes que se refieren al relleno de los defectos del cartílago inducidos, la retención de proteoglicano y tinción de la matriz (respectivamente) en cartílago tratado con armazón solo. La Figura 14E muestra una imagen macroscópica de cartílago tratado con armazón suplementado con tejido microvascular, mientras que las Figuras 14F, 14G, y 14H muestra imágenes relacionadas con el relleno de los defectos del cartílago inducidos, la retención de proteoglicano y tinción de la matriz (respectivamente) en cartílago tratado con armazón suplementado con tejido microvascular.

25 30 Las Figuras 15A-15F se refieren a la reparación de tendón desgastado usando tejido microvascular. Las Figuras 15A y 15B representan, respectivamente, tinción con Tricromo de Masson o inmunohistoquímica de Tenascina de tendón desgastado y sin tratar. Las Figuras 15C y 15D representan, respectivamente, tinción con Tricromo de Masson o inmunohistoquímica de Tenascina de tendón desgastado tratados solamente con armazón. Las Figuras 15E y 15F representan, respectivamente, tinción con Tricromo de Masson o inmunohistoquímica de Tenascina de tendón desgastado tratado con armazón suplementado con tejido microvascular.

Descripción detallada

40 La presente invención se basa en el desarrollo de nuevos métodos para procesar tejido microvascular para producir una composición como se define en las reivindicaciones. En diversas realizaciones, las células o tejido no se cultivan durante estos procedimientos. De forma ventajosa, la composición tiene actividad angiogénica o antiinflamatoria. La composición se esteriliza y los virus dentro de dicha composición se inactivan durante los procedimientos, además la composición aún presenta esta eficacia terapéutica inesperada.

45 Las nuevas composiciones producidas con los métodos que se desvelan en el presente documento ofrecen ventajas sobre el tejido microvascular procesado y composiciones de células multipotentes anteriores, incluyendo las ventajas asociadas con el tratamiento o prevención de una lesión, por ejemplo, una lesión en tejido blando, en un sujeto. Estas ventajas incluyen (pero no se limitan a): (1) la capacidad para usar las composiciones de la presente invención para el tratamiento alogénico o xenogénico de los sujetos; (2) las composiciones de la presente invención producen una reducción de la respuesta inmunitaria y una reducción de la probabilidad de rechazo; (3) las composiciones de la presente invención tienen actividad antiinflamatoria; (4) las composiciones de la presente invención tienen actividad angiogénica; (5) las composiciones de la presente invención son estériles y no están contaminadas con virus nocivos; y (6) las composiciones de la presente invención se pueden almacenar de manera estable antes de su uso y/o están listas para su uso inmediato. En resumen, estas composiciones proporcionan convenientemente todos los mecanismos de acción inherentes a las preparaciones de células madre o multipotentes viables, tradicionales, excepto para diferenciación en tejidos. En la siguiente descripción, se exponen ciertos detalles específicos con el fin de proporcionar una comprensión minuciosa de las diversas realizaciones de la invención.

Definiciones

60 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que normalmente entienden las personas con experiencia en la materia a la que pertenece la invención. Para los fines de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

65 Los términos "un" y "uno" indican uno o más, a menos que se indique específicamente de otro modo.

Por "aproximadamente" se hace referencia a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía en tanto, un 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o un 1 % con respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia. En cualquier realización que se discuta en el contexto de un valor usado en conjunto con el término "aproximadamente", se contempla especialmente que se puede omitir el término aproximadamente.

Al menos que el contexto lo requiera de otro modo, en toda la presente memoria descriptiva y reivindicaciones, el término "comprender" y variaciones del mismo, tales como, "comprende" y "que comprende" se debe interpretar en un sentido inclusivo, abierto, es decir, como "que incluye, pero no se limita a".

Por "que consiste en" se hace referencia a que incluye, y se limita a, lo que sea que siga a la expresión "que consiste en". Por lo tanto, la expresión "que consiste en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, y que no puede estar presente ningún otro elemento.

Por "que consiste esencialmente en" se hace referencia a la inclusión de cualquier elemento mencionado en la expresión, ilimitado a otros elementos que no interfieran o contribuyan con la actividad coacción especificada en la divulgación de los elementos enumerados. Por lo tanto, la expresión "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden estar presentes o no dependiendo de si afectan o no a la actividad o acción de los elementos enumerados.

En la presente memoria descriptiva la referencia a "una realización" o "una realización" se refiere a que un elemento distintivo particular, estructura o característica que se describe en relación con la realización está incluido en al menos una realización de la presente invención. Por lo tanto, no necesariamente todas las apariciones de las expresiones "en una realización" o "en una realización" en diversos lugares en toda esta memoria descriptiva se refieren a la misma realización. Además, los elementos distintivos particulares, estructuras o características se pueden combinar de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

Como se usa en el presente documento, los términos "función" y "funcional", y similares, se refieren a una función biológica, enzimática o terapéutica.

Una cantidad "aumentada" o "mejorada" generalmente es una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir un aumento que es 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, o 50 o más veces (por ejemplo, 100, 500, 1000 veces) (incluyendo todos los números enteros y puntos decimales entre y por encima de 1, por ejemplo, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, etc.) una cantidad o nivel que se describe en el presente documento.

Una cantidad "disminuida" o "reducida" o "menor" generalmente es una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir una disminución que es aproximadamente 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, o 50 o más veces (por ejemplo, 100, 500, 1000 veces) (incluyendo todos los números enteros y puntos decimales entre y por encima de 1, por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) una cantidad o nivel que se describe en el presente documento.

Por "obtenida a partir de" se hace referencia a que una muestra tal como, por ejemplo, una célula o tejido, se aísla de, o se obtiene a partir de, una fuente en particular, tal como un organismo deseado o un tejido específico dentro de un organismo deseado.

Como se usa en el presente documento, el término "aislada", por ejemplo, con respecto a una célula multipotente, se refiere a la eliminación de su entorno natural. Por ejemplo, una cell se aísla si esta se separa de algunos o todos los materiales coexistentes en su entorno natural.

La expresión "tejido microvascular procesado", como se usa en el presente documento, se refiere a tejido microvascular que se disocia como se describe en el presente documento.

El término "crioconservado", como se usa en el presente documento, se refiere a composiciones de célula multipotente o tejido microvascular procesado que se congelan, por ejemplo, a baja temperatura. El tejido microvascular procesado y la célula multipotente crioconservada y las composiciones de tejido microvascular tienen una diversidad de propiedades biológicas, que incluyen actividad antiinflamatoria y actividad angiogénica.

Las "células multipotentes" se refieren a células que mantienen la capacidad para diferenciarse en dos o más tipos de células especializadas. Las "células multipotentes" incluyen células madre y células precursoras multipotentes. Como se usa en el presente documento, la expresión "célula multipotente" se refiere a una capacidad original de la célula para diferenciarse en dos o más tipos de células especializadas diferentes antes de que se esterilicen o conserven de acuerdo con un método que se describe en el presente documento. Los ejemplos de células multipotentes incluyen, pero no se limitan a, células madre mesenquimales, células madre embrionarias, células madre neuronales, células precursoras endoteliales, células madre obtenidas a partir del tejido adiposo, y células madre del cordón umbilical. Se entiende que después de esterilización o conservación de acuerdo con los métodos

que se describen en el presente documento, una célula multipotente puede perder su capacidad para crecer o diferenciarse.

5 "Vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye, pero no se limita, cualquier adyuvante, vehículo, excipiente, sustancia de deslizamiento, agente edulcorante, diluyente, conservante, tinte/colorante, potenciador del sabor, tensioactivo, agente humectante, agente de dispersión, agente de suspensión, estabilizante, agente isotónico, disolvente o agente emulsionante que ha sido aprobado por la Food and Drug Administration de Estados Unidos como aceptable para uso en seres humanos o animales domésticos.

10 Una "composición farmacéutica" se refiere a una formulación de una composición de la invención y un medio generalmente aceptado en la técnica para la administración de un agente terapéutico a mamíferos, por ejemplo, seres humanos. Un medio de ese tipo incluye cualquier por lo tanto vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 Como se usa en el presente documento, a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo, "tratamiento", y términos similares tales como "tratado", "tratar" etc., indica un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. El tratamiento puede implicar opcionalmente la reducción comer fuera de los síntomas de una lesión, enfermedad o afección, o el retardo de la evolución de la lesión, enfermedad o afección. La administración de la composición que se describe en el presente documento puede tratar, en algunas realizaciones, uno o más de tales síntomas.

20 Como se usa en el presente documento, a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo, "prevención", y términos similares tales como "prevenido", "prevenir" etc., indica un enfoque para obtener prevenir, inhibir o reducir la probabilidad del inicio o recurrencia de una lesión, enfermedad o afección. También se refiere a prevención, inhibición o reducción de la probabilidad de aparición o recurrencia de uno o más síntomas de una lesión, enfermedad o afección, u opcionalmente un enfoque para retrasar el inicio o recurrencia de una lesión, enfermedad o afección o para retrasar la aparición o recurrencia de uno o más síntomas de una enfermedad o afección por lesión. Como se usa en el presente documento, "prevención" y términos similares también incluye la reducción de la intensidad, efecto, síntomas y/o carga de una lesión, enfermedad o afección.

30 Como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una composición es esa cantidad suficiente como para influir en un efecto biológico deseado, tal como, por ejemplo, resultados clínicos beneficiosos.

35 Las expresiones "transferencia autóloga", "trasplante autólogo", y similares se refieren a tratamientos en los que el donante de tejido es también el receptor de la composición producida a partir del tejido.

40 Las expresiones "transferencia alogénica", "trasplante alogénica", y similares se refieren a tratamientos en los que el donante de tejido es de la misma especie que el receptor de la composición producida a partir del tejido, pero no es el mismo individuo.

Las expresiones "transferencia xenogénica", "trasplante xenogénico", y similares se refieren a tratamientos en los que el donante de tejido es de una especie diferente a la del receptor de la composición producida a partir del tejido.

45 Métodos para Producir Composiciones de Células Madre y de Tejido Microvascular

En el presente documento se desvelan nuevos métodos de procesamiento microvascular, tejido para producir una composición que comprende células multipotentes o fragmentos de los mismos como se define en las reivindicaciones. En realizaciones particulares, la composición comprende adicionalmente uno o más componentes tisulares adicionales. Por consiguiente, la expresión "composición de tejido microvascular procesado" se refiere a composiciones de la presente invención, que pueden comprender o no células multipotentes intactas. En realizaciones particulares, una composición de tejido microvascular de la presente invención no comprende ninguna célula multipotente intacta o no comprende ninguna célula multipotente viva o no comprende ninguna célula viva. En ciertas realizaciones, una composición de tejido microvascular de la presente invención comprende fragmentos o membranas celulares de células multipotentes. Una "composición que comprende células multipotentes" o "composición de células multipotentes" de la presente invención puede comprender células multipotentes vivas y/o muertas.

60 En el presente documento se desvelan nuevos métodos para producir composiciones de tejido microvascular procesado como se define en las reivindicaciones, incluyendo los que son útiles en el tratamiento y prevención de diversas lesiones, enfermedades o afecciones patológicas, por ejemplo, una lesión en tejido blanco. Los métodos incluyen la esterilización de la composición e inactivación de los picos virus dentro de dichas células o tejido. Es un hallazgo sorprendente e inesperado que las composiciones de tejido microvascular esterilizadas de ese tipo conserven propiedades biológicas deseables, incluyendo propiedades útiles para el tratamiento o prevención de lesiones, enfermedades y otras afecciones patológicas.

- Las composiciones de tejido microvascular de la presente invención se pueden preparar a partir de cualquier tejido de mamífero, por ejemplo, tejido obtenido a partir de un mamífero, tal como un ser humano, un primate no humano, un perro, un gato o un caballo. Las composiciones de la presente invención pueden ser para uso en el tratamiento de un mamífero autólogo, alogénico o xenogénico. Por consiguiente, el tejido se puede obtener a partir del sujeto
- 5 que se va a tratar, o de un animal donante diferente, que puede ser de la misma especie o de una especie diferente a la del sujeto que se va a tratar. En realizaciones particulares, el tejido se obtiene a partir de un donante alogénico de la misma especie que el sujeto que se va a tratar, por ejemplo, un donante mamífero humano o no humano. En realizaciones particulares, un animal donante es un donante sano.
- 10 En diversas publicaciones, las composiciones de tejido microvascular se preparan a partir de una serie de tejidos diferentes. El tejido es tejido no embrionario. Por ejemplo, en realizaciones particulares, el tejido usado para preparar las composiciones de la presente invención es un tejido vascular o microvascular, tal como, por ejemplo, tejido adiposo, piel, hueso, tejido de tendón, tejido postparto (por ejemplo, tejido del cordón umbilical o tejido placentario), médula ósea, o tejido muscular.
- 15 En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención se pueden preparar mediante un método que comprende: disociar una muestra de tejido para liberar células y/u otros componentes tisulares; separar al menos una parte de las células liberadas y/o componentes tisulares de uno u otros componentes más del tejido; y esterilizar las células separadas y/o componentes tisulares y tratar las células separadas y/o componentes tisulares para inactivar los virus en la misma. En ciertas realizaciones, las células separadas y/o componentes tisulares se secan, se liofilizan, se congelan, o se criopreservan antes, durante o después de su esterilización y se trata para inactivar los virus. Las células separadas y/o componentes tisulares se esterilizan y se tratan para inactivar los virus después de ser secados, liofilizados, congelados, o criopreservados. En realizaciones relacionadas, las células separadas y/o
- 20 componentes tisulares se esterilizan y se tratan para inactivar los virus después de su puesta en contacto con un agente crioprotector, por ejemplo, un agente crioprotector que protege las células de la radiación por la esterilización. Los agentes crioprotectores pueden proteger los componentes al estabilizar las proteínas, interrumpir los radicales libres y resistir la oxidación. El daño se puede minimizar aún más al enfriar la composición durante la radiación, eliminando el oxígeno de la composición (por ejemplo, secando la composición y/o irradiando en una atmósfera de vacío o inerte).
- 30 Los métodos que se desvelan en el presente documento pueden comprender adicionalmente: disociar una muestra de tejido obtenida a partir de un mamífero donante para liberar una pluralidad de células multipotentes en la misma; separar una pluralidad de las células multipotentes liberadas de uno u otros componentes más del tejido para producir una composición que comprende células multipotentes aisladas; y esterilizar la composición que comprende células multipotentes aisladas inactivar los virus presentes en la composición que comprende células multipotentes aisladas. En realizaciones particulares, la composición que comprende células multipotentes se seca, se liofiliza, se congela, o se criopreservado antes, durante o después de su esterilización y se trata para inactivar los virus. En realizaciones particulares, las células separadas y/o los componentes del tejido se esterilizan y se tratan para inactivar los virus después ser secados, liofilizados, congelados o criopreservados. En realizaciones relacionadas,
- 35 las células separadas y/o componentes tisulares se esterilizan y se tratan para inactivar los virus después de su puesta en contacto con un agente crioprotector, por ejemplo, un agente crioprotector que protege las células de la radiación por la esterilización.
- 40 Los métodos que se desvelan en el presente documento pueden comprender adicionalmente: disociar una muestra de tejido obtenida a partir de un mamífero donante para liberar una pluralidad de componentes del tejido en la misma; separar una pluralidad de componentes de tejido liberados para producir una composición que comprende Uno o más componentes tisulares; y esterilizar la composición e inactiva los virus presentes en la composición. En realizaciones particulares, la composición se seca, se liofiliza, se congela, o se criopreserva antes, durante o después de su esterilización y se trata para inactivar los virus. En realizaciones particulares, las células separadas y/o los componentes del tejido se esterilizan y se tratan para inactivar los virus después ser secados, liofilizados, congelados o criopreservados. En realizaciones relacionadas, las células separadas y/o componentes tisulares se esterilizan y se tratan para inactivar los virus después de su puesta en contacto con un agente crioprotector, por ejemplo, un agente crioprotector que protege las células de la radiación por la esterilización.
- 45
- 50 En ciertas realizaciones, los componentes tisulares comprenden una o más células multipotentes, células diferenciadas, componentes de la matriz extracelular, factores de crecimiento, agentes angiogénicos, agentes antiinflamatorios, citoquinas, quimioquinas, y/o agentes de diferenciación. Los componentes de la matriz extracelular incluyen, pero no se limitan a, proteínas de la matriz extracelular, tales como diversos colágenos, fibronectina, vitronectina y trombospodina, y otros que se describen en el presente documento.
- 55
- 60 Las muestras de tejido se pueden obtener a partir de un sujeto o donante mediante una diversidad de métodos diferentes, que incluyen cirugía, lipoaspiración, biopsia o biopsia con aguja. Un donante puede estar vivo o muerto, por ejemplo, recientemente fallecido.
- 65 El tejido se puede disociar mediante diversos métodos, incluyendo procesamiento tanto enzimático y/o como mecánico. Por ejemplo, el tejido se puede disociar por fuerza mecánica (fuerzas de picado o de corte), digestión

enzimática con enzimas proteolíticas simples o combinatorias, tales como una matriz de metaloproteasa y/o proteasa neutra, por ejemplo, colagenasa, tripsina, dispasa, LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Ind.), hialuronidasa, y/o pepsina, o una combinación de métodos mecánicos y enzimáticos. En realizaciones particulares, los métodos que se desvelan en el presente documento no emplean el uso de una colagenasa.

5 Los métodos de digestión enzimática que se desvelan en el presente documento usan una combinación de enzimas, tal como una combinación de una metaloproteasa de matriz y una proteasa neutra. La metaloproteasa de matriz puede ser una colagenasa, y la proteasa neutra puede ser termolisina o dispasa. La colagenasa puede ser de tipo 1, 2, 3 o 4 (MMP 1, 8, 13, 18). Los métodos de digestión enzimática pueden usar una combinación de una
10 metaloproteasa de matriz, una proteasa neutra y una enzima mucolítica para la digestión de ácido hialurónico, tal como una combinación de colagenasa, dispasa y hialuronidasa o una combinación de LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Ind.) e hialuronidasa. Otras enzimas conocidas en la técnica para la disociación celular incluyen padolor, desoxiribonucleasas, serina proteasas, tales como tripsina, quimotripsina, gelatinasas o elastasa, que se pueden usar solas o en combinación con otras enzimas tales como metaloproteasas de matriz,
15 enzimas mucolíticas y proteasas neutras. Una combinación de enzimas puede comprender o consistir en colagenasa de Tipo 1 con cualquiera de dispasa o termolisina, Liberase, y/o Vitacyte. A Una combinación de enzimas puede comprender o consistir en colagenasa de Tipo 1 con dispasa o termolisina, Liberase, y/o Cizyme. No se puede usar una colagenasa, ya sea sola o en combinación con uno o más enzimas adicionales. MMP 2 y/o 14 se pueden usar en lugar de MMP 1 (solas o en cualquiera de las combinaciones que se describen en el presente documento).

20 La temperatura y el periodo de tiempo en los que los tejidos o las células están en contacto con proteasas para conseguir la disociación se conocen y los puede determinar fácilmente alguien con experiencia en la materia. El proceso de digestión enzimática se puede ajustar para aumentar o disminuir la disociación celular. Por ejemplo, si se desea una disociación celular más completa, se puede incluir más de una enzima o se puede aumentar el tiempo de
25 digestión. Aunque no es necesario mantener la viabilidad celular, en algunas realizaciones generalmente se desea que las membranas celulares permanezcan generalmente intactas para conservar las membranas que contienen moléculas de unión y señalización, incluso si se produce alguna lisis celular durante la digestión enzimática. Por lo tanto, el uso de enzimas tales como lipidasas puede no ser útil en un proceso tal como se desvela en el presente documento.

30 Como alternativa, o además del tratamiento enzimático, el tejido se puede disociar usando un método no enzimático. Por ejemplo, el tejido se puede disociar usando medios físicos o químicos, incluyendo el uso de agentes quelantes, agitación ultrasónica, ultrasonidos (por ejemplo, para someter a lisis o eliminar adipocitos), o disociación celular mecánica.

35 En realizaciones particulares en las que el tejido es hueso, el hueso se desmineraliza antes del procesamiento enzimático (u otro) para liberar células de la matriz de colágeno. En realizaciones particulares, el hueso se desmineraliza usando EDTA (a diferencia de un disolvente para desgrasar el tejido seguido de ácido para retirar los minerales óseos). Los métodos de procesamiento de tejido, por ejemplo, hueso, pueden no incluir uno o más de los
40 siguientes: extracción con disolvente de grasas y/o o células, molienda criogénica para reducir el tamaño de partícula, y/o desmineralización ácida.

45 Después de la disociación tisular, el tejido disociado se puede tratar adicionalmente para aislar o separar los componentes deseados del tejido, por ejemplo, células multipotentes (y/o u otros componentes deseados del tejido celular o no celular), de los componentes tisulares no deseados. Estos métodos se pueden usar, por ejemplo, para retirar células o moléculas no deseadas, tales como glóbulos rojos, adipocitos, otras células diferenciadas, o lípidos. Se puede usar una diversidad de métodos para separar células multipotentes y otros componentes de tejido deseados de células o componentes de tejido no deseados, tal como, por ejemplo, filtración (por ejemplo, un filtro de tamaño de oro de 20 μm podría dejar pasar células multipotentes pero retener muchos adipocitos o células
50 musculares), centrifugación (los adipocitos y los lípidos flotan, mientras que las células multipotentes sedimentan), o gradientes de densidad (los gradientes se pueden usar para sedimentar glóbulos rojos y para suspender células multipotentes a diferentes niveles que las células no deseadas). El método particular usado puede depender, en parte, de la fuente de tejido que se va a procesar. Por ejemplo, si la fuente de tejido es tejido adiposo, el tejido disociado se centrifuga opcionalmente con una fuerza relativamente baja para separar lípidos, adipocitos y algunos
55 preadipocitos de otros componentes del tejido microvascular, mientras que un gradiente de densidad se usa opcionalmente cuando se aíslan células multipotentes de la médula ósea. Los protocolos de aislamiento de células musculares, tales como el uso de centrifugación con gradiente de densidad, se pueden usar para tratar adicionalmente el tejido muscular después de digestión enzimática para extraer las células musculares y enriquecer las células deseadas.

60 En ciertas realizaciones, una composición de la presente invención también se filtra, por ejemplo, para retirar grupos de células. Por ejemplo, la filtración, por ejemplo, con un filtro de tamaño de poro de 20 a 50 micrómetros, para retirar grandes grupos de células se puede realizar durante la preparación de una composición para inyección intravenosa, para evitar la coagulación de los capilares. En realizaciones particulares, la filtración se realiza después
65 de la disociación y antes de su uso, por ejemplo, después de disociación y antes de liofilización o esterilización.

Dependiendo de la realización, las composiciones de tejido microvascular opcionalmente se congelan o se secan para su almacenamiento o conservación, por ejemplo, secadas (por ejemplo, liofilizadas o secadas por pulverización), crioconservadas, o congeladas. Cuando se conservan composiciones de la invención se puede usar cualquier excipiente apropiado, incluyendo azúcares (por ejemplo, trehalosa, manitol, sacarosa), polialcoholes (por ejemplo, polietilenglicol), aldehídos, proteínas (por ejemplo, albúmina), calcio (por ejemplo, glicina), tensioactivos (por ejemplo, Tween 20), DMSO, y/o permanganatos. En varias realizaciones, no se usa excipiente.

Las células y sus componentes activos se pueden proteger en parte del daño por radiación ionizante mediante varios métodos. Los antioxidantes o neutralizadores de radicales libres pueden ser muy eficaces. Los agentes que inmovilizan macromoléculas tales como los azúcares usados en la liofilización y el propio proceso de secado aumentan las probabilidades de que las cadenas rotas se recombinen en su estructura química original. La eliminación de agua, aire y otras fuentes de oxígeno reducirá la oxidación de proteínas u otras especies biológicamente activas. La congelación de la composición durante la radiación también reduce las probabilidades de que las moléculas escindidas se recombinen de manera inapropiada. Por último, la concentración mucho mayor de excipientes que las células o las moléculas activas en las células se refiere a que habrá menos escisiones de compuestos activos simplemente debido a los efectos de acción de la masa.

El secado por congelación (por ejemplo, liofilización) generalmente implica cuatro etapas: tratamiento previo, congelación, secado primario y secado secundario. El tratamiento previo puede incluir un ajuste de la concentración o la adición de uno o más excipientes. Después del tratamiento previo, la composición de tejido microvascular se congela. La etapa de congelación se realiza de manera cuidadosamente controlada (por ejemplo, a una tasa de enfriamiento entre aproximadamente $-0,5^{\circ}\text{C}$ por minuto y aproximadamente -50°C por minuto) para conservar la estructura celular, sin embargo, no es necesario conservar la viabilidad celular. En algunas realizaciones, la composición de tejido microvascular se congela a una tasa de enfriamiento de aproximadamente -10°C por minuto. La tasa de enfriamiento se puede ajustar basándose en las células o el tejido en particular y los excipientes usados. La composición de tejido microvascular se puede congelar usando cualquier medio apropiado, incluyendo el uso de refrigeración mecánica y/o exposición de un recipiente que la composición a hielo seco o nitrógeno líquido hasta que alcance una temperatura adecuada para la liofilización. Durante la etapa de secado primario, la temperatura y la presión se ajustan para proporcionar las condiciones adecuadas para provocar la sublimación del agua de las células multipotentes o tejido microvascular. La temperatura y la presión específicas se pueden ajustar para acomodar el excipiente usado y/o la concentración de las células o tejido microvascular. Durante la etapa de secado secundario, la temperatura y la presión se pueden ajustar aún más para facilitar la eliminación del agua no congelada del tejido microvascular. El contenido final de agua después del paso de secado secundario está preferentemente entre aproximadamente un 1 % y aproximadamente un 4 % en eso (incluyendo aproximadamente de un 1 % a aproximadamente un 2 %, de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 3 %, de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 4 %, de aproximadamente un 4 % a aproximadamente un 5 %, e intervalos superpuestos de los mismos), pero se pueden ajustar para maximizar el periodo de almacenamiento o la actividad biológica.

En algunas realizaciones, la composición de tejido microvascular se seca por pulverización. Antes del secado por pulverización, la composición de tejido microvascular se puede tratar previamente de manera similar a la composición de células multipotentes o tejido microvascular que se va a liofilizar, con los excipientes siendo seleccionados si fuera apropiado para secado por utilización en lugar de liofilización. Durante el secado por pulverización, el tejido microvascular se atomiza en gotitas y se expone a aire caliente en una cámara de secado. En una realización, un excipiente es un azúcar que no se funde a las temperaturas usadas. En realizaciones particulares, un excipiente es un antioxidante, como BHA, BHT y galato de propilo, por ejemplo.

En algunas realizaciones, las composiciones de tejido microvascular no se procesan mediante secado, pero en su lugar se crioconservan. Se conocen métodos para crioconservar células. Por ejemplo, las composiciones de células o tejido microvascular se pueden mezclar con uno o más excipientes o agentes crioprotectores (por ejemplo, DMSO, PEG, albúmina, o azúcar) y se pueden enfriar de una manera controlada con cuidado. En algunas realizaciones, el enfriamiento se realiza en dos o más etapas en el que la primera etapa se realiza de una manera controlada (por ejemplo, reduciendo la temperatura en 1°C por minuto) hasta una temperatura intermedia (por ejemplo, -30°C), con la segunda etapa siendo de transferencia de células o tejidos a la temperatura intermedia hasta una temperatura de almacenamiento más fría (por ejemplo, -196°C).

Las composiciones de células multipotentes y tejido vascular crioconservadas se pueden almacenar a una temperatura adecuada para mantener el estado crioconservado (por ejemplo, de aproximadamente -30°C a -196°C). Las células o tejido microvascular procesados liofilizados o secados por pulverización se pueden almacenar en una diversidad de condiciones más amplia que las células crioconservadas, células vivas, o tejido recién extraído. Las temperaturas adecuadas para el almacenamiento de las células o tejido microvascular micro procesados incluyen temperaturas de aproximadamente -100°C a aproximadamente 45°C . En algunas realizaciones, el tejido microvascular procesado liofilizado o secado por pulverización se puede almacenar a temperatura ambiente.

En diversas realizaciones, el periodo de almacenamiento del tejido microvascular procesado proporcionado es al menos aproximadamente una semana, al menos aproximadamente un mes, al menos aproximadamente dos meses,

al menos aproximadamente seis meses, o un periodo superior a la vez que se mantienen una o más actividades biológicas. En realizaciones particulares, la composición mantiene una actividad angiogénica o antiinflamatoria mensurable cuando se almacena aproximadamente a 4 °C durante al menos aproximadamente un mes, al menos aproximadamente dos meses, al menos aproximadamente cuatro meses, al menos aproximadamente seis meses, o al menos un año. En realizaciones particulares de composiciones que se describen en el presente documento, la composición mantiene una actividad angiogénica o antiinflamatoria mensurable cuando se almacena aproximadamente a -20 °C durante al menos aproximadamente un mes, al menos aproximadamente dos meses, al menos aproximadamente cuatro meses, al menos aproximadamente seis meses, o al menos aproximadamente un año. En realizaciones particulares, la actividad angiogénica o antiinflamatoria mensurable es al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 % de la actividad antes de su almacenamiento, cuando se mide en un ensayo *in vivo* o *in vitro*, incluyendo cualquiera de los que se describen en el presente documento.

El tejido disociado, o células y otros componentes tisulares aislados a partir del mismo, incluyendo las composiciones resultantes, se esterilizan, por ejemplo, para reducir o eliminar la contaminación por microorganismos, tales como, por ejemplo, bacterias, virus, y hongos, o priones. Las composiciones que comprenden tejido microvascular procesado se esterilizan usando irradiación, en las que la esterilización por irradiación se realiza por exposición de la composición a radiación gamma o radiación de haz electrónico a una dosificación en el intervalo de 0,5 Mrad a 5,0 Mrad. Existen métodos de esterilización que usan radiación tal como haces electrónicos, rayos X, rayos gamma, o radiación ultravioleta. En realizaciones particulares, la esterilización se realiza mediante exposición de tejido disociado, o células y otros componentes tisulares aislados a partir del mismo, to radiación gamma a una dosificación en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5,0 Mrad, o De aproximadamente 1,0 a aproximadamente 3,0 Mrad, o aproximadamente 1,0 Mrad, o aproximadamente 1,5 Mrad, o aproximadamente 2,0 Mrad, o aproximadamente 2,5 Mrad, o aproximadamente 3,0 Mrad, o aproximadamente 3,5 Mrad, o aproximadamente 4,0 Mrad, o aproximadamente 4,5 Mrad, o aproximadamente 5,0 Mrad (o cualquier cantidad de radiación gamma entre esos valores). En realizaciones particulares, la esterilización se realiza mediante exposición de tejido disociado, o células y otros componentes tisulares aislados a partir del mismo, a radiación de haz electrónico a una dosificación en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5,0 Mrad, o de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 3,0 Mrad, o aproximadamente 1,0 Mrad, o aproximadamente 1,5 Mrad, o aproximadamente 2,0 Mrad, o aproximadamente 2,5 Mrad, o aproximadamente 3,0 Mrad, o aproximadamente 3,5 Mrad, o aproximadamente 4,0 Mrad, o aproximadamente 4,5 Mrad, o aproximadamente 5,0 Mrad (o cualquier cantidad de radiación gamma entre esos valores). A menudo es más fácil medir la cantidad de radiación a la que se exponen las composiciones. En realizaciones particulares, los niveles de radiación por haces E o radiación gamma A la esterilización son de aproximadamente 9 a aproximadamente 30 kGy, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 kGy, o de aproximadamente 9 a aproximadamente 17 kGy (o cualquier cantidad de radiación entre esos valores). Además, el tejido disociado, o células y otros componentes tisulares aislados a partir del mismo, Se pueden tratar para inactivar virus. En la técnica se conocen métodos para inactivar virus, incluyendo el uso de irradiación, como se ha descrito anteriormente para esterilización. Se pueden usar otros métodos para inactivar virus, incluyendo tratamientos con ácido o base, lixiviación, soluciones de aldehído u óxido de etileno, o calor. Se entiende que los agentes que crioprotectores y otros excipientes usados para liofilizar o congelar la composición también pueden proteger contra la radiación. Por ejemplo, azúcares y albúmina (u otras proteínas estabilizantes) junto con la baja temperatura protegen a las células contra el daño por radiación. Por consiguiente, en realizaciones particulares, la esterilización o la inactivación viral se realiza después de la liofilización.

Además, dado que no se requiere viabilidad para idoneidad de las composiciones de células multipotentes o tejido microvascular procesadas y crioconservadas para uso terapéutico, no es necesario ajustar el proceso de conservación y almacenamiento para mantener la viabilidad. El porcentaje de células viables en las composiciones de tejido microvascular proporcionadas antes del procesamiento, esterilización, o crioconservación puede ser hasta un 100 %. Después de procesamiento, esterilización, o crioconservación, puede ser inferior a aproximadamente un 50 %, por ejemplo, inferior a aproximadamente un 40 %, inferior a aproximadamente un 30 %, inferior a aproximadamente un 20 %, inferior a aproximadamente un 10 %, o inferior a aproximadamente un 1 %. En algunas realizaciones, la composición de tejido microvascular procesado proporcionada no contiene células viables después de procesamiento, esterilización, o crioconservación. En varias realizaciones, las composiciones de tejido microvascular procesado se usan en la reparación y/o regeneración terapéutica de, por ejemplo, tejido blando. En realizaciones adicionales, las composiciones de tejido microvascular procesado se usan en la reparación y/o regeneración terapéutica de tejido duro.

Además, para reducir la probabilidad de contaminación microbiana, los donantes se pueden identificar sistemáticamente para un listado determinado previamente de organismos microbianos (por ejemplo, VIH, HPV, EBV, TB, etc.) antes de la obtención o procesamiento. La identificación sistemática se puede realizar usando técnicas conocidas, tales como detección de la presencia de un ácido nucleico microbiano usando reacción en cadena de la polimerasa, o mediante detección de la presencia de una molécula asociada con un microbio particular por ELISA. El tejido microvascular contaminado con microbios can se puede excluir de su uso, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención. Además, el tejido procesado o crioconservado se puede producir

usando técnicas asépticas o estériles.

En realizaciones particulares, los métodos que se desvelan en el presente documento no incluyen el cultivo de las células o tejido microvascular disociados.

5

Composiciones Aisladas de Células Madre y Tejido Microvascular

Los métodos que se desvelan en el presente documento producen composiciones de tejido microvascular únicas. Las composiciones de tejido microvascular que se proporcionan en el presente documento, en varias realizaciones, células sin cultivar o tejido microvascular sin cultivar (o componentes de los mismos), mínimamente procesados, que pueden incluir una mezcla de células madre y/o precursores producidas a partir de la disociación (por ejemplo, mediante digestión enzimática) de un tejido microvascular (por ejemplo, tejido adiposo, tendón, o tejido muscular). Las composiciones de tejido microvascular procesado pueden incluir moléculas adicionales (por ejemplo, moléculas de la matriz extracelular completas o fragmentadas o factores de crecimiento). Además, las composiciones de tejido microvascular procesado pueden comprender, dependiendo de la realización, fragmentos o membranas de células multipotentes. Además, el tejido microvascular procesado puede comprender o no células multipotentes intactas.

10

15

Como se ha indicado anteriormente, los métodos que se desvelan en el presente documento se pueden usar para preparar una composición que comprende células multipotentes o tejido microvascular procesado, solos o en combinación con uno o más tipos de células y/u otros compuestos adicionales.

20

En realizaciones particulares, el tipo de célula es célula del estroma, epitelial, o obtenida a partir de la sangre, que incluye, pero no se limita a, fibroblastos, queratinocitos incluyendo células de la vaina de la raíz externa folicular, células endoteliales, pericitos, glóbulos rojos, monocitos, linfocitos incluyendo células plasmáticas, neutrófilos, trombocitos, mastocitos, adipocitos, células musculares, hepatocitos, células nerviosas y de la neuroglia, osteocitos, y osteoblastos.

25

En realizaciones particulares, el componente tisular adicional es un componente de la matriz extracelular. La matriz extracelular comprende diversos constituyentes tales como glicoproteínas, proteoglicanos, carbohidratos complejos y otras moléculas. La matriz extracelular puede comprender cualquiera de una serie de proteínas diferentes, que incluyen diversos colágenos, elastina, fibronectina, laminina, proteoglicanos, vitronectina, trombospondina, tenascina (citoactina), entactina (nidógeno), osteonectina (SPARC), ancorina CII, condronectina, proteína de unión, osteocalcina, sialoproteína ósea, osteopontina, epinectina, hialuronectina, componente P amiloide, fibrilina, merosina, s-laminina, undulina, epiligrina, kalinina, fibrina, fibrinógeno y HSP.

30

35

En realizaciones relacionadas, el componente tisular adicional comprende un factor de crecimiento, un agente angiogénico, un agente antiinflamatorio, una citoquina o un agente de diferenciación. Por ejemplo, un factor de crecimiento o un agente angiogénico se puede seleccionar entre el factor de crecimiento de fibroblastos básico, otros factores de crecimiento de fibroblastos, proteínas morfogenéticas óseas, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento de queratinocitos, factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos, factor de crecimiento obtenido a partir de las plaquetas, factor de crecimiento transformante $\beta 1$ y/o $\beta 3$, factor de crecimiento celular endotelial vascular. Los factores de crecimiento adicionales y las clases o familias de factores de crecimiento que se pueden usar incluyen cualquiera de los que se enumeran en la Tabla 15, que también incluye actividades biológicas representativas para ciertos factores de crecimiento.

40

45

En realizaciones particulares, las composiciones de la presente invención no contienen o esencialmente no contienen ningún tejido adiposo, mineral óseo, células musculares, y/o células sanguíneas, por ejemplo, uno o más de estos tipos de células o mineral óseo se retiran de la composición durante el procesamiento. Esto puede aumentar la concentración de células asociadas con la microvasculatura en la composición. En realizaciones particulares, las composiciones de la presente invención comprenden ADN o una cantidad esencial de ADN, por ejemplo, el ADN no se eliminó de la composición durante el procesamiento, por ejemplo, el tejido no se descelularizó y tampoco se eliminó el ADN mediante lavado. En realizaciones particulares, una composición de la presente invención es una suspensión soluble en agua de células y/o componentes tisulares. En ciertas realizaciones, una composición de la presente invención, sola, no comprende un armazón estructural o matriz, tal como, por ejemplo, un injerto dérmico o de tendón. En realizaciones particulares, una composición de la presente invención se puede producir usando tejidos microvasculares tales como piel, cordón umbilical, o hueso, que se tratan para células libres de la matriz.

50

55

En realizaciones particulares, una composición de la presente invención tiene una o más actividades biológicas. La composición de la presente invención tiene actividad antiinflamatoria o angiogénica. En ciertas realizaciones relacionadas, una composición estimula la formación de vasos sanguíneos o la cicatrización del tejido. Las combinaciones de estos efectos se consiguen en varias realizaciones.

60

En ciertas realizaciones, una composición de la presente invención tiene actividad antiinflamatoria. En realizaciones particulares, un tejido dañado o enfermo (por ejemplo, un tejido dañado o enfermo que está experimentando una respuesta inflamatoria) que se expone a o que se pone en contacto con una composición de la presente invención

65

5 presenta una reducción de la inflamación en comparación con cuando el tejido lesionado o enfermo se trata del mismo modo pero no se expone a, o no se pone en contacto con la composición de la presente invención. En ciertas realizaciones, la cantidad de inflamación del tejido expuesto a, o que se pone en contacto con la composición de la presente invención se reduce en al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 %, en comparación con la cantidad de inflamación cuando el tejido dañado o enfermo no se expone a, o se pone en contacto con la composición de la presente invención. La inflamación se puede medir con medios disponibles en la técnica, incluyendo, por ejemplo, el número de linfocitos observados en el
10 tejido afectado cuando se observa por vía histológica.

15 En realizaciones particulares, una composición de la presente invención tiene actividad antiinflamatoria que se puede medir en un ensayo *in vitro*. En ciertas realizaciones, la cantidad de inflamación medida en un ensayo *in vitro* en presencia de una composición de la presente invención es al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 % inferior a la cantidad de inflamación medida en el mismo ensayo en ausencia de la composición de la presente invención o en presencia de una composición de control. En realizaciones particulares, el ensayo *in vitro* es una reacción linfocitaria mixta.
20

25 En ciertas realizaciones, una composición de la presente invención tiene actividad angiogénica. En realizaciones particulares, un tejido dañado o enfermo (por ejemplo, un tejido dañado o enfermo que está experimentando una respuesta inflamatoria) que se expone a o que se pone en contacto con una composición de la presente invención presenta un aumento de la angiogénesis en comparación a cuando el tejido dañado o enfermo se trata del mismo modo pero no se expone a, o se pone en contacto con la composición de la presente invención. En ciertas realizaciones, la cantidad de angiogénesis en el tejido expuesto a, o que se pone en contacto con la composición de la presente invención aumenta en al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 100 %, al menos aproximadamente un 150 %, al menos aproximadamente un 200 %, al menos aproximadamente un 300 %, al menos aproximadamente un 400 %, o al menos aproximadamente un 500 %, en comparación con la cantidad de angiogénesis cuando el tejido dañado o enfermo no se expone a, o se pone en contacto con la composición de la presente invención. La angiogénesis se puede medir con medios disponibles en la técnica, incluyendo, por ejemplo, el modelo de isquemia de la pata trasera que se describe en el presente documento.
30
35

40 En realizaciones particulares, una composición de la presente invención tiene actividad angiogénica que se puede medir en un ensayo *in vivo* o *in vitro*. En ciertas realizaciones, la cantidad de actividad medida en un ensayo de angiogénesis *in vitro* en presencia de una composición de la presente invención es al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos un 90 aproximadamente %, al menos aproximadamente un 100 %, al menos aproximadamente un 150 %, al menos aproximadamente un 200 %, al menos aproximadamente un 300 %, al menos aproximadamente un 400 %, o al menos aproximadamente un 500 % superior a la cantidad de actividad medida en el mismo ensayo en ausencia de la composición de la presente invención o en presencia de una composición de control. En realizaciones particulares, el ensayo *in vivo* es un ensayo de matrigel, como se describe en el Ejemplo 4. En realizaciones particulares, el ensayo *in vitro* es el ensayo de migración de células endoteliales que se describe en el presente documento.
45

50 En ciertas realizaciones, una composición de la presente invención estimula la cicatrización de un tejido dañado o enfermo; es decir, tiene activación depuración tisular. Como se usa en el presente documento, la "actividad de cicatrización tisular" de una composición es la capacidad de la composición para facilitar una mejora de la cicatrización (por ejemplo, reparación o regeneración) de un tejido dañado o enfermo (por ejemplo, un tejido duro o blando) expuesto a la composición en comparación con un tejido análogo tratado del mismo modo pero sin exposición a la composición. La mejora de la cicatrización se mide usando cualquier medio apropiado, tal como el tiempo para completar la cicatrización, cantidad de tejido nuevo generado, fuerza del tejido curado resultante, o funcionalidad del tejido curado resultante.
55

60 Las composiciones de células multipotentes y tejido microvascular procesado alogénicas y xenogénicas esterilizadas o inactivadas por virus no se han usado previamente para facilitar la reparación de tejidos blandos tales como ligamentos y tendones, debido a la dificultad para producir nuevos tejidos blandos con células madre autólogas, la percepción de que las células madre alogénicas y xenogénicas serán rechazadas, y la creencia previa de que las células esterilizadas o inactivadas por virus tendrán una viabilidad reducida y, por lo tanto, una actividad biológica o terapéutica reducida. Sin embargo, el proceso y composiciones que se describen en el presente documento no se basan necesariamente en células madre purificadas o en la viabilidad celular. Más bien, el proceso proporcionado se usa para producir una composición que contiene una mezcla de células, incluyendo células no viables, células
65

madre mesenquimales y precursoras, y otras moléculas secretadas por tales células (por ejemplo, citoquinas, factores de crecimiento, moléculas quimiotácticas, y similares). En algunas realizaciones, la composición contiene una mezcla de células viables y no viables.

5 En realizaciones particulares, menos de aproximadamente un aproximadamente 50 %, menos de aproximadamente un 40 %, menos de aproximadamente un 30 %, menos de aproximadamente un 20 %, menos de aproximadamente un 10 %, o menos de aproximadamente un 5 % de las células presentes en una composición de la presente invención son viables. En varias realizaciones, esencialmente todas las células son labiales. Como se usa en el presente documento, al término "viable" se le dará su significado habitual y a la referencia a una célula que es capaz de proliferar cuando se cultiva en condiciones apropiadas, por ejemplo, condiciones en las que se podría esperar que la misma célula o tipo de célula proliferaran, por ejemplo, si no se procesara como se describe en el presente documento. En otras realizaciones, menos de aproximadamente un 2 % o menos de aproximadamente un 1 % de las células presentes en dicha composición son viables. En realizaciones particulares, ninguna o esencialmente ninguna de las células presentes en la composición es viable. Por consiguiente, el término "no viable" se refiere a que la célula no es capaz de proliferar cuando se cultiva en condiciones apropiadas, por ejemplo, condiciones en las que se podría esperar que la misma célula proliferara, por ejemplo, si no se procesara como se describe en el presente documento.

20 Sin embargo, en realizaciones particulares, al menos algunas de las células dentro de una composición de la presente invención excluyen el azul de tripano. En realizaciones particulares, al menos aproximadamente un 1 %, al menos aproximadamente un 2 %, al menos aproximadamente un 3 %, al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 % de las células presentes en una composición excluye el azul de tripano.

30 En ciertas realizaciones, una composición de la presente invención comprende células que excluyen el azul de tripano pero no son viables. En ciertas realizaciones, al menos aproximadamente un 1 %, al menos aproximadamente un 2 %, al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, o al menos aproximadamente un 50 % de las células presentes dentro de una composición excluye el azul de tripano pero no son viables.

35 De acuerdo con la presente invención se entiende que, aunque las células dentro de las composiciones que se describen en el presente documento pueden no ser viables y pueden no persistir mucho después de su trasplante en un sujeto, las composiciones desencadenan una cascada de respuestas en el sujeto que conducen a una mejor cicatrización, reducción de la inflamación, o aumento de la angiogénesis. Las composiciones de células multipotentes y tejido microvascular procesado que se describen en el presente documento no necesitan incluir células madre viables o completas para simular o inducir la cicatrización de tejido lesionado o enfermo, tal como, por ejemplo, tejido blando. Además, las composiciones de la presente invención pueden comprender tejido procesado y diversos componentes del mismo, incluidos tejido disociado, células, tales como células multipotentes (por ejemplo, células madre), membranas celulares, componentes de la matriz extracelular y diversos factores de crecimiento, factores angiogénicos, los antiinflamatorios, citoquinas, agentes de diferenciación, etc., presentes dentro de o asociados con una muestra de tejido usada para preparar las composiciones.

45 Para los fines de administración de una composición de la invención a un sujeto con necesidad de la misma, las composiciones se pueden formular como composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas que se desvelan en el presente documento comprenden una composición de la presente invención y un excipiente, vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición de la invención está presente en la composición farmacéutica en una cantidad suficiente para llevar a cabo el tratamiento o la prevención de una lesión, enfermedad o trastorno en un sujeto con necesidad de la misma, es decir, en una cantidad terapéuticamente eficaz.

50 Los excipientes, vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables son familiares para las personas con experiencia en la materia. Para composiciones formuladas como soluciones líquidas, los vehículos y/o diluyentes aceptables incluyen solución salina y agua estéril, y pueden incluir opcionalmente antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos y otros aditivos comunes. Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar combinando una composición de la invención con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y se pueden formular en preparaciones en forma sólida, semisólida, líquida o gaseosa, tales como polvos, gránulos, soluciones, inyecciones, inhalantes, microesferas y aerosoles. Estas composiciones también pueden contener agentes dispersantes y tensioactivos, aglutinantes y lubricantes. Alguien con experiencia en la materia puede formular adicionalmente una composición de la invención de una manera apropiada, y de acuerdo con las prácticas aceptadas, tales como las que se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1990.

65 Las vías de administración de las composiciones farmacéuticas que se desvelan en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, vía tópica, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, oral, nasal, trasplante, implante, inyección, administración a través de un catéter, tópica, transdérmica, inhalación, parenteral e

intranasal. El término parenteral como se usa en el presente documento incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, inyección intraesternal o técnicas de infusión. Además, las composiciones de la invención se pueden implantar de forma quirúrgica, inyectar, administrar (por ejemplo, a través de un catéter o jeringa), o se pueden administrar de manera directa o indirecta al sitio en necesidad de reparación o aumento. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención se pueden introducir por vía quirúrgica en un sitio o adyacentes a un sitio de lesión o enfermedad en un sujeto. En algunas realizaciones, la administración es intravenosa. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para una vía de administración en particular. En realizaciones particulares, el método es quirúrgico para reparación tisular, por vía intravenosa para tratamiento de la isquemia, inyección en espacios articulares para el tratamiento del dolor e inflamación, inyección en heridas e inyección en el músculo para el tratamiento de enfermedad vascular periférica.

En ciertas realizaciones, una composición de la presente invención se formula para administración intravenosa. Una composición formulada para administración intravenosa, en ciertas realizaciones, se filtra para reducir partículas o grumos de células grandes que podrían coagular potencialmente capilares u otros vasos sanguíneos. En realizaciones particulares, una composición formulada para administración intravenosa es opcionalmente isotónica, tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 9,0 (por ejemplo, aproximadamente 7,3), una osmolaridad entre aproximadamente 50 y aproximadamente 600, y/o una osmolalidad menor o igual a aproximadamente 600 mOsm/l, por ejemplo, aproximadamente 290 mOsm/l.

Implantes, Matrices y Armazones

En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención se combinan con un implante, matriz o armazón. Las matrices pueden incluir armazones biocompatibles, estructuras cristalinas, estructuras de autoensamblaje y similares. Las matrices de ese tipo se conocen en las técnicas de terapia celular, reparación quirúrgica, ingeniería de tejidos y cicatrización de heridas. Las matrices se pueden tratar previamente (por ejemplo, sembrar, inocularse, poner en contacto con) con una composición de la invención. En algunos aspectos de la invención, las células y/o componentes tisulares presentes dentro de la composición se adhieren a la matriz. En algunas realizaciones, las células están contenidas dentro o en puentes de espacios intersticiales de la matriz. En realizaciones particulares, las células y/u otros componentes tisulares están en estrecha asociación con la matriz y, cuando se usan terapéuticamente, inducen o soportan el crecimiento de las células y/o angiogénesis del sujeto.

Las matrices asociadas con o que comprenden composiciones de la presente invención se pueden introducir en el cuerpo de un sujeto de cualquier manera conocida en la técnica, que incluye, pero no se limita a, un implante, inyección, unión quirúrgica, trasplante con otro tejido, y similares. Una composición de la presente invención se puede combinar con un implante, matriz o armazón antes de su suministro o implante dentro de un sujeto, o una composición de la presente invención se puede combinar con un implante, matriz o armazón que ya está presente dentro de un sujeto. Los implantes, matrices o armazones pueden proporcionar una estructura física que retiene la composición dentro de una ubicación deseada dentro de un sujeto o tejido en la misma, protege la composición dentro del sujeto, y/o permite la liberación o la composición a una tasa deseada o durante un periodo de tiempo deseado.

Las matrices usadas en varias realizaciones se pueden configurar para la forma y/o tamaño de un tejido u órgano *in vivo*. Los armazones combinados con una composición de la invención pueden ser planos o tubulares o pueden comprender secciones de los mismos, como se describe en el presente documento. Los armazones combinados con una composición de la invención pueden tener múltiples capas.

En realizaciones particulares, el implante, matriz o armazón es un implante, matriz, o armazón biocompatible. El implante, matriz o armazón puede comprender un sólido o líquido. El implante, matriz o armazón pueden ser biodegradables. El implante, matriz o armazón, en realizaciones particulares, comprende microperlas o partículas, un implante obtenido a partir de hueso, un armazón de biofibra (por ejemplo, Armazón de BioFiber™), un polímero poroso reabsorbible, un hidrogel, un producto tisular que comprende una masilla, o una sutura o un dispositivo médico implantable. El implante, matriz o armazón puede ser, por ejemplo: una matriz de colágeno o un tejido biocompatible; un implante ortopédico; un armazón implantable flexible, poroso; un implante quirúrgico; un implante revestido poroso; una solución polimérica; disolventes tales como DMSO, N-metilpirrolidona (NMP) y alcoholes; un hidrogel; ácido hialurónico u otros glicosaminoglicanos o proteoglicanos; colágeno; fibrina; trombina; coágulo de sangre; plaquetas plasma rico en plaquetas; matriz ósea desmineralizada; células autólogas; y/o hueso esponjoso.

Las composiciones de la invención se pueden suspender en una solución de hidrogel, por ejemplo, para inyección. Los ejemplos de hidrogeles adecuados incluyen péptidos de autoensamblaje, tales como RAD 16. Como alternativa, la solución de hidrogel que contiene las células se puede endurecer para formar una matriz con células dispersas en la misma antes del implante. El hidrogel puede ser un polímero orgánico (natural o sintético) que se reticula mediante enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno para crear una estructura tridimensional de estructura cristalina abierta que atrapa las moléculas de agua para formar un gel. Los ejemplos de materiales que se pueden usar para formar un hidrogel incluyen polisacáridos incluyen tales como alginato y sales del mismo, péptidos, polifosfazinas y poliacrilatatos, que se le circulan por vía iónica, o polímeros de bloque como copolímeros de bloque de óxido de polietileno-polipropilenglicol que se articulan mediante la temperatura o pH, respectivamente.

En realizaciones particulares, una composición de la presente invención se asocia con, se encuentra dentro, se aplica a, o reviste un implante, matriz o armazón biológicamente compatible. En realizaciones particulares, una composición de la presente invención se usa para revestir un material, tal como, por ejemplo, un armazón flexible biocompatible (por ejemplo, láminas o hilo tejido fabricado mediante tejido o no tejido). Las composiciones procesadas secadas por pulverización son particularmente adecuadas para revestir un material que comprende microperlas o partículas sin requerir reconstitución antes del revestimiento, ya que el revestimiento se puede realizar durante el proceso de secado por pulverización. En ciertas realizaciones, la composición está embebida dentro o revestida en una matriz, por ejemplo, una matriz porosa y/o que contiene colágeno. En ciertas realizaciones, la matriz puede ser matriz de tejido reconstructivo Conexa™, Armazón de BioFiber™, o Armazón de BioFiber™-CM (Tornier; Bloomington, MN).

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se pueden asociar con un armazón tridimensional y se pueden implantar *in vivo*, en las que la composición induce proliferación celular sobre o en el marco y forma un tejido de reemplazo *in vivo*. Las células que proliferan sobre lo en el marco pueden incluir células dentro de la composición y/o células del sujeto en el que se implanta el armazón. Dicho marco tridimensional se puede usar para formar estructuras tubulares, tales como las de los tractos gastrointestinal y genitourinario, así como los vasos sanguíneos; tejidos para la reparación de hernia; tendones y ligamentos. En relaciones relacionadas, las composiciones de la presente invención se asocian con un marco tridimensional. El marco se configura en la forma de la estructura correctora deseada.

Los ejemplos de armazones que se pueden usar en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, materiales no tejidos, espumas porosas, o péptidos de autoensamblaje, como se describe, por ejemplo, en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.560.276. Los materiales no tejidos se pueden formar usando fibras compuestas de un copolímero sintético absorbible de los ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA) (VICRYL; Ethicon, Inc., Somerville, N.J.) o poli-4-hidroxibutirato (PHA, Tepha, Lexington, MA). También se pueden usar espumas, compuestas de, por ejemplo, copolímero de poli(épsilon-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), formadas por procesos tales como secado por congelación, o liofilización, como se discute en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.355.699. En una realización, el armazón es un fieltro, que puede estar compuesto por un hilo de múltiples filamentos hecho de un material bioabsorbible, por ejemplo, copolímeros o mezclas de PGA, PLA, PHA, PCL, o ácido hialurónico.

Kits

En el presente documento también se desvelan kits que comprenden una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, de la presente invención. La composición se puede envasar sola, por ejemplo, en un vial, o En combinación con otros productos, tales como los adecuados para la combinación con tejido microvascular procesado o crioconservado. Cuando se envasa con otro material, el tejido microvascular procesado o crioconservado se puede envasar por separado, o mezclar previamente o asociar con el otro material. El tejido microvascular procesado se puede envasar como un revestimiento sobre un material biocompatible, o se puede asociar con un implante, matriz o armazón.

Un kit de la presente invención comprende un recipiente impermeable a la humedad que comprende una composición como se define en las reivindicaciones. Un kit de la presente invención comprende un recipiente impermeable a la humedad que comprende una composición seca, estéril (por ejemplo, liofilizada), en el que dicha composición comprende tejido microvascular procesado, en el que el tejido microvascular procesado comprende células multipotentes aisladas o una membrana celular obtenida a partir de o derivada de dichas células o tejido, en el que dicha composición tiene actividad angiogénica o antiinflamatoria, en el que dicha composición se esteriliza mediante irradiación y los virus dentro de dicha composición están inactivados, en el que dicha composición mantiene una actividad angiogénica o antiinflamatoria mensurable cuando se almacena aproximadamente a temperatura ambiente durante al menos un mes, y en el que la esterilización por irradiación se realiza por exposición de la composición a radiación gamma o radiación de haz electrónico a una dosificación en el intervalo de 0,5 Mrad a 5,0 Mrad. Preferentemente, dichas células o tejido no se han cultivado.

En realizaciones particulares de kits y composiciones que se describen en el presente documento, la composición mantiene una actividad angiogénica o antiinflamatoria mensurable cuando se almacena aproximadamente a temperatura ambiente durante al menos un mes, al menos dos meses, al menos cuatro meses, al menos seis meses, o al menos un año. En realizaciones particulares de kits y composiciones que se describen en el presente documento, la composición mantiene una actividad angiogénica o antiinflamatoria mensurable cuando se almacena aproximadamente a temperatura ambiente durante al menos un mes, al menos dos meses, al menos cuatro meses, al menos seis meses, o al menos un año. Como se usa en el presente documento, "temperatura ambiente" es una temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C o aproximadamente 21 °C. En realizaciones particulares de kits y composiciones que se describen en el presente documento, la composición mantiene una actividad angiogénica o antiinflamatoria mensurable cuando se almacena aproximadamente a 4 °C durante al menos un mes, al menos aproximadamente dos meses, al menos aproximadamente cuatro meses, al menos aproximadamente seis meses, o al menos aproximadamente un año. En realizaciones particulares de kits y composiciones que se describen en el presente documento, la composición mantiene una actividad angiogénica o

- antiinflamatoria mensurable cuando se almacena aproximadamente a -20 °C durante al menos aproximadamente un mes, al menos aproximadamente dos meses, al menos aproximadamente cuatro meses, al menos aproximadamente seis meses, o al menos aproximadamente un año. En realizaciones en particular, la actividad angiogénica o antiinflamatoria mensurable es al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 % de la actividad antes de su almacenamiento, cuando se mide en un ensayo *in vivo* o *in vitro*, incluyendo cualquiera de los que se describen en el presente documento.
- En realizaciones particulares de kits y composiciones de la presente invención, una cantidad inferior o igual a un 50 %, una cantidad inferior o igual a un 40 %, una cantidad inferior o igual a un 30 %, una cantidad inferior o igual a un 20 %, una cantidad inferior o igual a un 10 %, o una cantidad inferior o igual a un 5 % de las células presentes en dicha composición son viables, una cantidad inferior o igual a un 2 % de las células presentes en dicha composición son viables, o esencialmente ninguna de las células presentes en dicha composición son viables. En realizaciones relacionadas, al menos un 1 % de dichas células excluye el azul de tripano. En otras realizaciones, al menos aproximadamente un 2 %, al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 % de dichas células excluye el azul de tripano. En ciertas realizaciones, al menos aproximadamente un 1 %, al menos aproximadamente un 2 %, al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 % de dichas células excluye el azul de tripano pero no son viables.
- De acuerdo con diversas realizaciones, un kit de la presente invención puede comprender una composición farmacéutica que comprende una composición de la presente invención y un excipiente. En una realización, la composición farmacéutica se formula para administración intravenosa. En otras realizaciones, un kit de la presente invención puede comprender una composición de la presente invención y un implante, armazón o matriz, que incluye, pero no se limitan a, cualquiera de los que se describen en el presente documento. En realizaciones específicas, el armazón o matriz implantable es un implante obtenido a partir de hueso, un armazón de biofibra, un polímero poroso reabsorbible, un hidrogel, un producto tisular que comprende una masilla, o una sutura. En ciertas realizaciones, células, tejido o membrana celular de dicha composición están presentes en un hueso, tendón o superficie colocada frente a la dermis de dicho armazón o matriz implantable.
- En ciertas realizaciones, un kit de la presente invención comprende una composición de la presente invención esterilizada y seca (por ejemplo, liofilizada) en un recipiente cerrado herméticamente. El recipiente cerrado herméticamente puede ser resistente a la humedad o impermeable a la humedad, y puede contener una abertura sellada, que permite el acceso al interior del recipiente. En ciertas realizaciones, el recipiente es un vial que comprende un cierre sellado hermético. En ciertas realizaciones, el recipiente es un paquete de blíster, que puede comprender un sello de aluminio. En realizaciones particulares, el interior del recipiente sellado es estéril. Por consiguiente, antes de su uso, el usuario puede acceder al interior del recipiente, añadir un líquido a la composición seca para disolverla o reconstituirla, recombinación proporcionar o administrar la composición reconstituida a un sujeto. En ciertas realizaciones, el líquido es agua estéril o una solución estéril tal como solución salina, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato.

Usos de las Composiciones e Implantes, Matrices, y Armazones

- Las composiciones de la presente invención, y los implantes, matrices, y/o armazones que comprenden dichas composiciones, se pueden usar para tratar o prevenir una lesión o enfermedad en un mamífero. En diversas realizaciones, la composición se puede proporcionar o aplicar directamente a un tejido que lo necesite o adyacente a un tejido que lo necesite, por ejemplo, a un tejido que rodea al tejido que lo necesita. Los sujetos que lo necesiten incluyen sujetos con una lesión o enfermedad, o que se encuentran en riesgo de sufrir una lesión o enfermedad que se podría beneficiar del tratamiento con una composición de la presente invención. En realizaciones particulares, un sujeto es un mamífero, por ejemplo, un ser humano u otro mamífero, tal como un primate no humano, un perro, un gato o un caballo. En ciertas realizaciones, un sujeto presentó una reducción de las capacidades de curación, tal como un sujeto diabético y un sujeto que se está sometiendo a quimioterapia.

- En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso para tratar o prevenir lesiones o enfermedades de diversos tejidos u órganos en un mamífero, que incluyen, pero no se limitará, lesión o enfermedad de tejido blando, lesión o enfermedad de tejido duro, lesión o enfermedad de hueso, lesión o enfermedad de articulación, lesión o enfermedad del tejido cardíaco, lesión o enfermedad del tejido adiposo, lesión o enfermedad del cartílago y lesión o enfermedad de disco intervertebral.

- En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención se usan para tratar o prevenir una lesión en tejido blando. El tejido blando, como se usa en el presente documento, se refiere en general a estructuras extraesqueléticas que se encuentran en todo el cuerpo y que incluyen, pero no se limitan a, tejido de cartílago, tejido

de menisco, tejido del ligamento, tejido del tendón, tejido del disco intervertebral, tejido periodontal, tejido cutáneo, tejido vascular, tejido muscular, tejido de fascia, tejido perióstico, tejido ocular, tejido pericárdico, tejido pulmonar, tejido sinovial, tejido nervioso, tejido cerebral, tejido renal, médula ósea, tejido urogenital, tejido intestinal, tejido hepático, tejido pancreático, tejido esplénico, tejido adiposo, y combinaciones de los mismos. Las lesiones de tejidos blandos incluyen daños o lesiones a cualquier tejido blando, tal como por ejemplo, músculos, ligamentos, tendones, piel, tejido fibroso, grasa, membranas sinoviales, nervios, vasos sanguíneos y fascia, que se pueden producir en todo el cuerpo. Las lesiones de tejidos blandos que se pueden beneficiar de la suave actividad de cicatrización tisular de los tejidos microvasculares procesados proporcionados incluyen, pero no se limitan a, lesiones tales como desgarros de tendones y/o ligamentos y lesiones resultantes de sucesos isquémicos. Las lesiones comunes de los tejidos blandos pueden ser debidas a un esguince, torcedura, una lesión que da como resultado una contusión, o el uso excesivo de un tejido blando en particular. Las lesiones de los tejidos blandos incluyen lesiones tanto abiertas como cerradas.

Las lesiones, enfermedades y afecciones de los tejidos blandos, que se pueden tratar o prevenir de acuerdo con los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, lesiones en tejido vascular, cutáneo o musculoesquelético. Las afecciones de los tejidos blandos incluyen, por ejemplo, afecciones de la piel (por ejemplo, revisión de cicatrices o tratamiento de heridas traumáticas, quemaduras graves, úlceras en la piel (por ejemplo, úlceras de decúbito (presión), úlceras venosas y úlceras diabéticas) y heridas quirúrgicas tales como las asociadas con la extirpación de los cánceres de piel); afección vascular (por ejemplo, enfermedad vascular tal como enfermedad arterial periférica, enfermedad arterial coronaria, aneurisma aórtico abdominal, enfermedad carotídea y enfermedad venosa; lesión vascular; desarrollo vascular inadecuado); afecciones que afectan a las cuerdas vocales; afecciones cosméticas (por ejemplo, las que implican reparación, aumento, o embellecimiento); enfermedades musculares (por ejemplo, miopatías congénitas; miastenia grave; enfermedades musculares inflamatorias, neurogénicas y miogénicas; y distrofias musculares tales como distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia miotónica, distrofia muscular de la cintura y extremidades, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofia muscular congénita distrofias, distrofia muscular oculofaríngea, distrofia muscular distal y distrofia muscular de Emery-Dreifuss); afecciones de los tejidos conectivos, tales como los tendones y los ligamentos, que incluyen el ligamento periodontal y el ligamento cruzado anterior; y afecciones de los órganos y/o fascia (por ejemplo, vejiga, intestino, suelo pélvico). Un ejemplo de una lesión de tejidos blandos bastante común es el daño en el suelo pélvico. Esta es una afección médica potencialmente grave que se puede producir durante el parto o por complicaciones del mismo que pueden causar daño en la fascia vesicovaginal, tal como un cistocele, que es una hernia de la vejiga. Las afecciones médicas similares incluyen rectoceles (una hernia del recto), enteroceles (una protuberancia del intestino a través de la bolsa rectovaginal o vesicovaginal) y enterocistocele (una doble hernia en la que sobresalen la vejiga y el intestino).

En diversas realizaciones, las composiciones de la presente invención se usan para tratar o prevenir diversas enfermedades, e incluyen, pero no se limitan a, enfermedades asociadas con respuestas inflamatorias o inmunitarias no deseadas. Los ejemplos de las enfermedades de ese tipo incluyen artritis reumatoide, osteoartritis y enfermedades y trastornos autoinmunes. Además, las composiciones de la presente invención se pueden usar para reducir la inflamación, por ejemplo, en un sitio de lesión, y/o para reducir una respuesta inmunitaria, por ejemplo, una respuesta inmunitaria inducida por una lesión. De forma análoga, las composiciones de la presente invención se pueden usar para prevenir o reducir la probabilidad de rechazo del trasplante.

En realizaciones particulares, las composiciones de la presente invención son para uso para promover o estimular la angiogénesis o revascularización, por ejemplo, en un sitio de lesión o daño tisular. En realizaciones particulares, la lesión se asocia o da como resultado isquemia, hipoxia o lesión por reperfusión en un tejido. Los ejemplos de lesiones o enfermedades asociadas con isquemia, hipoxia o lesión por reperfusión que pueden ser tratadas o prevenidas de acuerdo con la presente invención incluyen apoplejía, infarto de miocardio y pérdida de sangre. Los ejemplos adicionales de lesiones o daño tisular que se pueden tratar con composiciones de la presente invención para promover o estimular la angiogénesis o la revascularización incluyen trasplante o inserción de extremidades.

Las composiciones de la presente invención también se pueden usar para tratar o prevenir el daño a los nervios periféricos, disfunción eréctil, hipertensión pulmonar, esclerosis múltiple y quemaduras por radiación. Además, se pueden usar para inducir hematopoyesis y/o cicatrización de heridas.

En realizaciones particulares, las composiciones de la presente invención, por ejemplo, cuando se formulan para administración intravenosa, se pueden usar para tratar o prevenir el infarto agudo de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, apoplejía, enfermedad vascular periférica o enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Las composiciones de la presente invención pueden ser para uso solas o en combinación con uno u otros agentes terapéuticos o procedimientos más para tratar o prevenir una lesión o enfermedad. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, para enriquecer el suministro de sangre a un tejido dañado y/o para estimular la regeneración tisular, las composiciones de la presente invención pueden ser para uso en combinación con plasma rico en plaquetas. Cuando se usa en combinación con uno u otros agentes terapéuticos o procedimientos más, las composiciones de la presente invención se pueden proporcionar o usar antes, durante el mismo periodo de tiempo o durante un periodo de tiempo superpuesto, o después del, tratamiento con el otro agente o procedimiento terapéutico.

5 Cuando se usan en combinación con otro agente terapéutico, una composición de la presente invención se puede proporcionar por separado del otro agente, o puede estar presente en una composición farmacéutica que también contiene el otro agente terapéutico, por ejemplo, una coformulación que comprende dos o más agentes terapéuticos, uno de los cuales es la composición de la presente invención. En realizaciones particulares, la composición de la presente invención y un agente terapéutico adicional ambos se combinan o se asocian con el mismo implante, matriz o armazón.

10 Las composiciones de la invención se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz, que variará dependiendo de una diversidad de factores que incluyen la actividad de la composición específica usada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto al que se le administra la composición de la invención; el modo y tiempo de administración; la tasa de secreción o descomposición de la composición en el sujeto; y el tipo o gravedad de la lesión, enfermedad, o afección que se va a tratar. En ciertas realizaciones, una dosis terapéuticamente eficaz resulta del material obtenido por el procesamiento de 104 a 108 células multipotentes y sus ECM asociadas.

15 Una composición de la presente invención para uso en el tratamiento o la prevención de una lesión o enfermedad, o para estimular la regeneración tisular en un mamífero se puede administrar en una, dos o más dosis. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una composición para el uso se administra como una sola dosis, múltiples dosis o en dosis repetidas durante un periodo de tiempo.

20 **Ejemplos**

Ejemplo 1 - Preparación Y Caracterización de Tejido Microvascular

25 En este estudio, el tejido microvascular se prepara a través de diferentes procesos a continuación se someten a ensayo. En resumen, al menos de 2,27 a 4,54 kg (de 5 a 10 lbs) de grasa subcutánea se obtiene de un donante de órganos y se procesa como sigue a continuación: trocear el tejido; disociado por vía enzimática; diluirlo (no interrumpirlo), centrifugar, decantar a continuación lavar el sedimento celular; volver a suspender en tampón de liofilización; y liofilización. Las condiciones de la sinusal hasta el procesamiento son las que siguen a continuación: el tejido adiposo se recupera por vía quirúrgica a partir de un donante de tejido. El tejido se trocea con tijeras, se
30 se suspende en PBS con 0,2 U/ml de Clzyme AS (Vitacyte, Indianapolis, IN) a 37 °C con agitación suave durante 60 min, a continuación se lava tres veces y se vuelve a suspender en dos millones de células/ml en M3D. La suspensión celular se mantiene a temperatura ambiente justo hasta antes de la liofilización, a continuación las células se diluyen a 50:50 con medio de criopreservación EZ-CPZ™ (Incell Corp., San Antonio, TX), se pone en viales, y se carga en las bandejas del aparato de liofilización para su enfriamiento. Las muestras se evalúan tanto
35 durante el proceso como al final del proceso.

40 En este estudio se realizan 10 procesos. Se designaron como "A" a "J" en la Tabla 1. Los métodos de ensayo usados para analizar cada método del proceso se enumeran en la Tabla 1, designados como 1, 2, 3, 4, 5, y se detallan en la Tabla 2.

Tabla 1. Métodos del Proceso, Descripciones y Métodos de Ensayo

Método del Proceso	Descripción del Método del Proceso	*Método(s) de Ensayo
A	Control: 10 g de grasa en ZTM™ troceado con tijeras/bisturí inmediatamente (< 12 h desde la cosecha) y digerido de acuerdo con condiciones de base.	M2, 3, 4, 5
B	24 h: 10 g de grasa en ZTM™ almacenado a temperatura ambiente durante 24 h antes del procesamiento con tijeras/bisturí y condiciones de base.	M2,4,5
C	48 h: 10 g de grasa en ZTM™ almacenado a temperatura ambiente durante 48 h antes del procesamiento con tijeras/bisturí y condiciones de base.	M2, 4, 5
D	Aumento a escala: 1,87+ kilogramos (5+ libras) de grasa troceada usando una trituradora de carne; digerido con condiciones de base.	M1, 2, 3, 4
E	Enzima: 10 g de grasa troceada a partir de 'D' digerido con 4X la concentración de la enzima.	M2, 5
F	Volumen: 10 g de grasa troceada a partir de 'D' digerido con 4X la concentración de la enzima pero en 1/4 del volumen total de 'E'.	M2, 5

Método del Proceso	Descripción del Método del Proceso	*Método(s) de Ensayo
G	Liofilización: Usar la formulación de EZ-CPZ™:M3D™ a 50:50 en todo el producto 'D'. La plataforma se enfrió de temperatura ambiente a -45 °C a una tasa de enfriamiento de 2,5 °C C/min hasta que la temperatura del producto alcanzó -45 °C. Las muestras se mantuvieron a -45 °C durante 180 minutos. El secado primario comenzó mediante la elevación de la temperatura de la plataforma de -45 °C a -35 °C a 2,5 °C/ minuto, reduciendo la presión de la cámara a 0,01 Kpa (80 mTorr) y manteniendo la temperatura de la plataforma a -35 °C durante 2160 minutos. Para el secado secundario, las muestras se calentaron mediante el aumento de la temperatura de la plataforma a una tasa de 0,2 °C/minuto a 20 °C y manteniendo la plataforma a esta temperatura durante 360 minutos.	M2, 3, 4, 5
H	Esterilización: 2,5 Mrad de radiación gamma de 100 viales de 'G'. Usar para estabilidad.	M2, 3, 5
I	Dosis Baja: 1,5 Mrad de radiación gamma de 80 viales de 'G'. Usar para estudios con animales, junto con 200 viales sin esterilizar.	M2, 3, 5
J	Haz de E: 1,5 Mrad de radiación de haz de e de 100 viales de 'G'. Usar para estabilidad.	M2, 3, 5

Tabla 2. Grupos de Ensayo del Estudio

Grupo de Ensayo	Descripción
M1	Identificación sistemática del donante para enfermedades infecciosas incluyendo ensayos no realizados antes de la extracción de tejido graso.
M2	Recuentos celulares usando un hemocitómetro y Azul de Tripano con tinción nuclear con DAPI) para índice y viabilidad celular.
M3	Inmunofenotipado de Bio marcadores seleccionados: CD33, CD34, CD44, CD45, y colágeno de Tipo IV
M4	Carga Biológica
M5	Bioensayos Funcionales: Migración celular; Matrigel

5 Para este estudio se realizaron varias tareas. Se denominaron A a D y se describen con detalles adicionales a continuación y se destacan en la Figura 1. Los métodos de ensayo de laboratorio específicos (M) usados en las Tareas se denominan M1, M2, M3, M4 y M5 (Tabla 2).

Tarea A. Planificación y Preparación

10 Encargar los materiales, coordinar, preparar y someter a ensayo.

Tarea B. Materiales de Fuente y Procedimientos Generales

15 El tejido graso se obtiene de un donante de órganos. La grasa subcutánea se toma de abdomen, muslos y glúteos. Se extraen de 2,27 a 4,54 kg (cinco (5) a diez (10) libras) de grasa en medio de transporte ZTM™ (Incell Corp., San Antonio, TX).

20 El tejido se extrae y se procesa inicialmente a las 12 horas de la muerte a través de diversas etapas y métodos de laboratorio (Tablas 1 y 2; Figura 1). Se procesan alícuotas de diez (10) g usando condiciones básicas después de 12, 24 y 48 horas de almacenamiento a temperatura ambiente. Los > 2,27 kg (> 5+ libras) se procesan usando un método de trituradora de carne para trocear tejido, y alícuotas de 10 g se digieren con 4X la concentración de enzima Blendzyme I (Vitacyte) en ZSolM™ y con 4X de concentración de enzimas y 1/4 del volumen de digestión de ZSolM™ en la Etapa E. La mayor parte de la muestra se digiere con concentraciones y métodos enzimáticos

convencionales.

Después de digestión, las muestras se enjuagan en ZSolF™, se centrifugan, se decantan y a continuación se lavan dos veces más en ZSolF™. Las células se pueden suspender en suspensión celular a 1:1 en EZ-CPZ™ como un producto en volumen de solución de liofilización a 10⁶ células/ml y se liofilizan (Etapa G) como volúmenes de alícuotas de 1 ml. Los viales liofilizados se someten a radiación gamma y haz de E (Etapas H, I, J). Todo el producto final se almacena y las muestras representativas se someten a ensayo, y los subconjuntos seleccionados se usan en estudios con animales posteriores.

10 Tarea C. Ensayos

A continuación se resumen brevemente los diversos tipos de ensayos (M1 a M5) usados en este estudio (Tabla 2).

15 M1: Identificación sistemática de donante para enfermedades infecciosas, incluyendo los ensayos que no se realizaron antes de la extracción de tejido graso. La identificación sistemática del donante y los acuerdos para la adquisición de tejidos se desarrollan para minimizar o eliminar cualquier enfermedad infecciosa de acuerdo con las evaluaciones convencionales. Los ensayos adicionales reales y los costes asociados se realizan caso a caso. Se realizan ensayos de carga biológica.

20 M2: Los recuentos celulares se realizan usando un hemocitómetro (microscopía óptica de luz) y tinción nuclear con Azul de Tripano con DAPI (microscopía de fluorescencia) para el índice y la viabilidad celular. Los recuentos celulares se registran como lecturas por duplicado.

25 M3: Inmunofenotipados para Biomarcadores seleccionados: CD33, CD34, CD44, CD45 y colágeno de Tipo IV. Se realizan inmunoensayos inmediatos de células suspendidas. Las células se cultivan en LabTeks y a continuación se tiñen, y se toman fotos representativas.

30 M4: Los ensayos de carga biológica se realizan en muestras de las soluciones de transporte de los tejidos recibidos en la bolsa N = 2 (y se comparan con los enjuagues {últimos} del procesamiento posterior. El ensayo de endotoxinas se realiza usando el Ensayo EndoSafe PTS (Charles River). Se realiza el ensayo microbiológico de cultivo de USP convencional. Opcionalmente se realiza el ensayo rápido de ATP.

35 M5: Los bioensayos funcionales se realizan en muestras de células aisladas, después de la liofilización y después de los diversos protocolos de procesamiento e irradiación. Se realizan ensayos de migración celular a través de los pocillos Transwell para las ADSC, células endoteliales, fibroblastos. Los ensayos de Matrigel se realizan para evaluar la formación de microvasos inducida por muestras en diversas diluciones, etapas de procesamiento y/o irradiación.

40 Tarea D. Análisis de Datos

Las lecturas y los datos observacionales se transfieren a Excel o a Prism para análisis. Los valores medios de + SD de replicados de la muestra para cada TPS y cada tipo celular se tabulan y/o se representan para análisis comparativos.

45 Los resultados obtenidos para experimentos preliminares que se realizaron mostraron poca diferencia entre las condiciones de procesamiento A, B y D con 3,5 kg de tejido adiposo que genera 1560 viales de producto liofilizado a 10⁶ células por vial.

50 **Ejemplo 2 - Tratamiento de Lesión del Tendón de Aquiles en Ratas**

Este estudio demuestra que las preparaciones de tejido microvascular de la presente invención se pueden usar para reparar lesiones en el tendón de Aquiles.

55 32 ratas Sprague Dawley macho (8 semanas de edad en el DÍA 1 y ~250 g en el DÍA 1) se adquieren en Harlan y se aclimatan durante al menos 3 días. Las ratas se tratan como se resume en el diseño del estudio de la Tabla 3.

Tabla 3: Diseño del Estudio

Grupo	N.º Animal/ grupo	Tratamiento	Vía	Puntos finales
1	8	El tendón de Aquiles se desgasta ligeramente con pinzas de diente de ratón	Tibia Derecha	Implante de armazón por cirugía entre tibia y tendón de Aquiles Día de Sacrificio 7
2	8	El tendón de Aquiles se desgasta ligeramente con pinzas de diente de ratón + Material de Injerto de Tornier revestido con Colágeno		
3	8	El tendón de Aquiles se desgasta ligeramente con pinzas de diente de ratón + Material de Injerto de Tornier revestido con Colágeno + Composición A de tejido microvascular procesado		
4	8	El tendón de Aquiles se desgasta ligeramente con pinzas de diente de ratón + Material de Injerto de Tornier revestido con Colágeno + Composición B de tejido microvascular procesado		
TOTAL	32			

El estudio se produce durante aproximadamente 10 días de la vida del animal. El animal llega el día -3, se aclimata del día -3 al día 1, se somete a cirugía del día 1, y el sacrificio se programa para el día 7.

5

Artículos de ensayo:

Armazones de BioFibra revestidos con Colágeno

10 Las preparaciones de tejido microvascular procesado A y B se reconstituyen con WFI estéril y se absorben en armazones. La composición de tejido microvascular procesado A está sin esterilizar, y la composición de tejido microvascular procesado B se esteriliza con haz de E.

15 **Anestesia:** Antes de la cirugía el Día 1, los animales se pesan y se anestesia con una inyección intramuscular de 100 mg/ml de clorhidrato de ketamina (40 mg/kg) y 100 mg/ml (5-10 mg/kg) de xilazina.

Preparación Quirúrgica: la extremidad posterior derecha de cada animal se rasura un día antes del inicio del ensayo. En el Día 1, la piel se prepara quirúrgicamente con betadine y se hacen friegas con alcohol, y se cubre usando técnicas quirúrgicas asépticas.

20

Procedimiento quirúrgico: En el Día 1, el artículo de ensayo se prepara inmediatamente antes del implante. El injerto se carga con células mediante acción de mecha. Dos suturas de polipropileno de 5-0 se colocan en el injerto para la fijación. El injerto se reserva en la placa de Petri con solución salina y se cubre hasta su uso.

25 Se realiza una incisión lateral, recta en la piel desde la tibia caudal (distal) de la extremidad trasera derecha hasta el nivel de la tibia media. Usando este método, la piel se disecciona y retrae para permitir una exposición lateral del tendón de Aquiles desde la unión calcánea a la musculotendinosa. Se usa una disección adicional para exponer y aislar el tendón de Aquiles. El tendón de Aquiles expuesto se erosiona ligeramente con pinzas de dientes de ratón antes de la colocación del artículo de ensayo de injerto. Se realiza un solo orificio de 0,5 mm en la dirección lateral a medial a través del Calcáneo para permitir el paso de la sutura para la fijación del injerto. El área del implante se irriga con solución salina para eliminar cualquier residuo y residuo seco coagulado.

30

El injerto se retira del medio de soporte y se inserta a lo largo de la superficie anterior del tendón de Aquiles con un extremo adyacente al calcáneo. La sutura de fijación del injerto craneal se coloca en el craneal gastrocnemio a la unión músculo-tendinosa usando un patrón de sutura de Mason-Allen modificado. La sutura de fijación del injerto caudal a continuación se pasa a través del orificio de perforación en el calcáneo y se tensa con el pie en una posición neutra y se ata. Se atan seis nudos de sutura para todas las suturas de fijación. La incisión se cierra de una manera en capas usando el material de sutura apropiado.

35

40 **Analgesia:** A los animales se les administra buprenorfina (0,1-0,5 mg/kg) por vía subcutánea al recuperarse de la anestesia el Día 1. Si fuera necesario para el dolor se puede administrar buprenorfina adicional con discreción.

Medición del peso corporal: Los animales se pesan de forma aleatoria, antes de la cirugía el Día 1 y una vez a la semana hasta el final del estudio, incluso antes del sacrificio. (~ 9 puntos temporales).

5 **Observaciones de salud:** Los animales se monitorizan una vez al día durante la duración del estudio. (~ 7 puntos temporales).

Observaciones de la zona del sitio de incisión: Las observaciones del sitio de la incisión se registran diariamente desde el Día 2 hasta el Día 7.

10 **Registros de Temperatura / Humedad:** Las mediciones de temperatura ambiente y humedad se registran diariamente.

15 **Sacrificio y Recogida de Tejidos:** En el Día 7, los animales se someten a eutanasia y los sitios del artículo de ensayo o de control implantados y el tejido tendinoso circundante se reconocen por escisión de cada animal. Todas las muestras recogidas se dividen por la mitad a lo largo de la línea media del armazón con la mitad del tendón incluido en cada mitad. La mitad del tejido recolectado se almacena en formalina tamponada neutra al 10 % para la evaluación histopatológica e inmunohistoquímica de rutina. La mitad restante se retira en tiras de tendón y tejido blando con un crecimiento excesivo con el borde de un bisturí, y el armazón con tejido encarnado se congela instantáneamente a < -70 °C en nitrógeno líquido para el análisis de la expresión genética.

20 Las secciones de tendón (tomadas del tendón de Aquiles contralateral), piel (tomadas de una región con menos pelo) e hígado de 2 animales/grupo seleccionados de forma aleatoria también se recogen como controles de tinción y se almacenan en formalina tamponada neutra al 10 % para evaluación inmunohistoquímica. Una porción de cada tejido de control se congela instantáneamente en nitrógeno líquido para los controles de PCR. (Los tres tejidos de control se pueden almacenar juntos en formalina y las porciones congeladas también se pueden almacenar juntas del mismo modo).

25 Los tejidos se someten a análisis de histología (H&E, tricromo de Masson), inmunohistoquímica (SMAD8 y tenascina) y PCR (SMAD8, tenascina, tenomodulina y escleraxis).

30 Ejemplo 3 - Tratamiento de Isquemia En Ratones

35 Este estudio demuestra los efectos de las composiciones tejido microvascular procesado de la presente invención en un modelo murino de isquemia de extremidades. El modelo murino de isquemia de extremidades se crea como se ha descrito anteriormente (Jang J *et al.*, Circulation 1999; Huang N *et al.*, JOVE 2009), y se usa para evaluar los efectos de las preparaciones celulares para estimular la angiogénesis después de la inducción de isquemia de extremidades posteriores.

40 Los ratones SCID de 14 a 16 semanas de edad se someten a isquemia de extremidades posteriores inducida quirúrgicamente. Inmediatamente después de la cirugía, la composición del tejido microvascular procesado o el control del vehículo se administrará a los animales como se detalla en la Tabla 4 que sigue a continuación. En resumen, se inyectan por vía intramuscular tres artículos de células de ensayo (cada uno a $0,5 \times 10^6$ células) o el control del vehículo el día 0 después de la inducción de isquemia de extremidades posteriores en el gastrocnemio. Los tres artículos de ensayo incluyen: composición de tejido microvascular procesado (Células de Ensayo - I),

45 composición de tejido microvascular procesado esterilizado por haz de E (Células de Ensayo - II), y composición de tejido microvascular procesado esterilizado por radiación gamma (Células de Ensayo - III). La mejora en la perfusión de la extremidad se evalúa cada 3-4 días durante un total de 14 días. Después de 14 días, los animales se sacrifican. Se hace un explante del gastrocnemio tanto isquémico como el contralateral y se someten a análisis histológico.

50

Tabla 4. Protocolo del Estudio

Grupo	N.º Animales	Material de Ensayo
1	10	Vehículo
2	10	Células de Ensayo - I ($0,5 \times 10^6$)
3	10	Células de Ensayo - II ($0,5 \times 10^6$)
4	10	Células de Ensayo - III ($0,5 \times 10^6$)

Ensayo de Punto Final

El flujo sanguíneo se evalúa mediante Formación de Imágenes con Láser Doppler en los Días 0, 3, 7, 11 y 14.

- 5 Los animales se sacrifican el Día 14, y el tejido de la extremidad posterior se recolecta, se procesa y se almacena para los estudios de explantes.

Ejemplo 4 - Formación de Vasos En Ratones SCID

- 10 Estos estudios usan ensayos de tapón de matrigel para demostrar la capacidad de las preparaciones de tejido microvascular de la presente invención para formar estructuras vasculares *in vivo*. El ensayo de tapón de matrigel es un ensayo definitivo de la formación de vasos verdaderos *in vivo*. Este ensayo consiste en la implantación de células terapéuticas con matrigel por vía subcutánea en la región abdominal. Durante el transcurso de 2 semanas, las células dentro del matrigel están en un ambiente favorable para formar neovasos, algunos de los cuales pueden formar anastomosis con vasos hospedadores.

15 En este ensayo, $0,5 \times 10^6$ células se embeben en 0,5 ml de matrigel suplementado con 200 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico y a continuación se inyectan por vía subcutánea en ratones SCID. En cada animal se implantan 2 tapones. Después de 2 semanas, se hace un explante de los tapones para análisis histológico de formación de vasos. Para distinguir los vasos murinos humanos de los nativos, se usan anticuerpos específicos humanos dirigidos a las células endoteliales (por ejemplo, CD31) para identificar vasos específicos para seres humanos. La presencia de vasos humanos específicos, como se demuestra histológicamente por las estructuras lumenales realizadas con elementos sanguíneos, es demostrativa de células endoteliales funcionales. De forma análoga, los anticuerpos de células endoteliales específicas de ratón se pueden usar para identificar vasos específicos de ratón. La capacidad de las células terapéuticas para secretar factores angiogénicos paracrinos da como resultado un aumento relativo en la formación de vasos murinos.

20 Los ratones SCID de 14-16 semanas de edad se someten al implante de tapones de matrigel que contienen preparaciones de tejido microvascular de la presente invención o control de vehículo, como se detalla en la Tabla 5 que sigue a continuación

Tabla 5. Protocolo del Estudio

Grupo	N.º Animales	Material de Ensayo
1	5	Vehículo
2	5	Células de Ensayo - I ($0,5 \times 10^6$)
3	5	Células de Ensayo - II ($0,5 \times 10^6$)
4	5	Células de Ensayo - III ($0,5 \times 10^6$)

35 Los tres artículos de ensayo incluyen: composición de tejido microvascular procesado (Células de Ensayo - I), composición de tejido microvascular procesado esterilizado por haz de E (Células de Ensayo - II), y composición de tejido microvascular procesado esterilizada por radiación gamma (Células de Ensayo - III).

Ejemplo 5 - Tratamiento de Artritis Reumatoide En Ratas

40 Este estudio demuestra la eficacia de las preparaciones de tejido microvascular de la presente invención para inhibir la inflamación, destrucción del cartílago y resorción ósea asociada con artritis por deficiencia de colágeno de tipo II establecida de 7 días en ratas.

Sistema del Ensayo

- 45 Número de animales: 44
 Especies/Cepa o Raza: ratas Lewis
 Distribuidor: Charles River
 Edad/Peso en el momento de la Llegada: 125-150 g
 50 Género: Hembra
 Intervalo de Edades al Inicio del Estudio: Al menos 125 gramos en el momento de la primera inmunización.
 Aclimatación: Aclimatadas durante 4-8 días después de su llegada a BBP.
 Alojamiento: 3-5/animales/jaula

Materiales

Artículos de ensayo (Preparaciones de composición de tejido microvascular procesado) y vehículo apropiado. Triamcinolona y solución salina estéril para dilución (BBP), colágeno bovino de Tipo II (Productos de Elastina), adyuvante incompleto de Freund (Difco).

Diseño General del Estudio

Las ratas se anestesiaron con Isoflurano y se les administraron 300 µl de colágeno Bovino de Tipo II en inyecciones de adyuvante incompleto de Freund ID/SC diseminadas en la parte del lomo distal, 100 µl por sitio el Día 0 y de nuevo el Día 6).

La clasificación de forma aleatoria en cada grupo se produce el día 1 de la artritis (día 10 del estudio) cuando la enfermedad es evidente en ambas patas traseras (las rodillas generalmente tendrán una enfermedad similar a la de los tobillos, pero son difíciles de calibrar de manera confiable, por lo que la medida del tobillo es un sustituto de la rodilla para fines de determinar el inicio de la enfermedad). Esto se convierte en el día 1 de la artritis. Los animales con artritis se clasifican de forma aleatoria en grupos de tratamiento mediciones medias con calibre de tobillo para cada grupo.

El tratamiento (IA, bilateral en ambas rodillas) se produce solo en el día 1 de la artritis. Las rodillas se tratan, porque los tobillos son demasiado pequeños para inyectar. Los efectos sistémicos del tratamiento se controlan con medidas de calibre de los tobillos y los efectos locales del tratamiento se determinan mediante histopatología en las rodillas. Las medidas del calibre del tobillo se toman diariamente desde los días 0 (medida inicial) -7. Las mediciones iniciales del calibre del tobillo se toman el día 0 usando un tobillo con valores redondeados a 25,4 µm (una milésima de pulgada). Las mediciones se confirman como clínicamente normales (6,660-0,671 mm (0,260-0,264 in) en comparación con los valores históricos para ratas basándose en un intervalo de pesos corporales. A continuación las mediciones de medida inicial se aplican a ambos tobillos, y estos valores permanecen con el animal siempre y cuando el tobillo sea clínicamente normal, con una buena definición de todos los huesos del tobillo y sin evidencia de inflamación.

Tabla 6: Denominaciones de Grupo de Estudio

Grupo	N	Compuesto	Vía	Régimen	Nivel de Dosis	Vol Dosis	Conc de Dosis
Grp 1	4	Sin tratamiento previo	N/D	N/D	N/D	N/D	N/A
Grp 2	8	Control de Vehículo	IA	Bilateral, D1		40 µl	
Grp 3	8	Triamcinolona	IA	Bilateral, D1	0,03 mg	40 µl	0,75 mg/ml
Grp 4	8	TX-1	PO	Bilateral, D1	2x10 ⁵ células	40 µl	5x10 ⁶ células/ml
Grp 5	8	TX-2	PO	Bilateral, D1	2x10 ⁵ células	40 µl	5x10 ⁶ células/ml
Grp 6	8	TX-3	PO	Bilateral, D1	2x10 ⁵ células	40 µl	5x10 ⁶ células/ml

Los tres artículos de ensayo incluyen: composición de tejido microvascular procesado (TX-I), composición de tejido microvascular procesado esterilizada con haz de E (TX-II), y composición de tejido microvascular procesado esterilizada con radiación gamma (TX-III).

Inducción de Enfermedad

Los animales aclimatados se anestesian con Isoflurano y se les administran inyecciones de colágeno (DO). En el día 6, sean expresión de nuevo para la segunda inyección de colágeno. El colágeno preparando una solución de 4 mg/ml en Ácido acético 0,01 N. Se emulsionan volúmenes iguales de colágeno y ayudante incompleto de Freund mezclando a mano hasta que una perla de este material mantiene su forma cuando se coloca en agua. Cada animal recibe 300 µl de la mezcla cada vez extendida sobre 3 sitios son cutáneos (100 µl por sitio) en el lomo.

ES 2 710 921 T3

Materiales

<i>Nombre (Distribuidor):</i>	Colágeno de Tipo II (Elastin Products)
<i>Denominación:</i>	Colágeno de Tipo II Bovino
<i>Características:</i>	Soluble, de articulaciones de terneros recién nacido
<i>Condiciones de Almacenamiento:</i>	2-8 °C
<i>Pureza:</i>	> 99,6 %
<i>Nombre (Distribuidor):</i>	Adyuvante Incompleto de Freund (Difco)
<i>Denominación:</i>	Adyuvante Incompleto
<i>Condiciones de Almacenamiento:</i>	Ensayo a 2-8 °C

Artículo y Vehículo

5 Artículo y Vehículo de Ensayo: Preparaciones de células madre preparadas el día de la inyección, Triamcinolona (Vetalog, Ft. Dodge).

10 Artículo y Formulación de Ensayo: Preparaciones de células madre en vehículo fisiológico a concentraciones apropiadas para inyección de 400 µl/articulación de la rodilla. 2 mg/ml de Triamcinolona para su dilución en solución salina.

Tabla 7: Calendario del Estudio

<i>Día -8</i>						
		<i>Día 0</i>	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 3</i>	<i>Día 4</i>
	Distribuir las ratas en el momento de la llegada en grupos para aclimatación					
		Anestesiar , 1ª Inyección de Colágeno				
<i>Día 5</i>	<i>Día 6</i>	<i>Día 7</i>	<i>Día 8</i>	<i>Día 9 (0)</i>	<i>Día 10 (1)</i>	<i>Día 11 (2)</i>
	2ª Inyección de Colágeno			Pesar, Medida Inicial Calibrar	Pesar, Dosis, Calibrar (Inscripción)	Pesar, Calibrar
X/XX/2012	X/XX/2012	X/XX/2012	X/XX/2012	X/XX/2012	X/XX/2012	X/XX/2012
<i>Día 12 (3)</i>	<i>Día 13 (4)</i>	<i>Día 14 (5)</i>	<i>Día 15 (6)</i>	<i>Día 16 (7)</i>	<i>Día 17</i>	<i>Día 18</i>
Pesar, Calibrar	Pesar, Calibrar	Pesar, Calibrar	Pesar, Calibrar	Pesar, Calibrar Necropsia		

Realización de la Fase en Vivo

15 La clasificación aleatoria en cada grupo por su gravedad de artritis se realiza en el día 1 de artritis (día del estudio 10). El tratamiento (bilateral IA, 40 µl/articulación) se inicia después de la clasificación aleatoria (día 1). Los pesos corporales y las medidas/puntuaciones del tobillo con calibre se toman diariamente.

20 Práctica Humana: Los animales que muestran signos de morbilidad de acuerdo con el Programa de Cuidados Veterinarios del IACUC de Bolder BioPATH, que incluye la pérdida de más de un 20 % de peso corporal (en una semana) se retiran del estudio y se sacrifican con humanidad mediante inhalación de CO₂.

Tabla 8: Agentes Administrables en Fase Viva

Recogida de Datos en Fase Viva		
Peso Corporal	Artritis días 0-7	
Medición con Calibre	Artritis días 0-7	Tobillos Izquierdo y Derecho
Recogida de Muestra en Fase Viva (No PK)		
N/D	N/D	N/D

Necropsia

- 5 Los animales se sacrifican en el Día de Artritis 7 mediante exsanguinación.

Los datos de necropsia se recogen, incluyendo el peso de las patas traseras tanto derecha como izquierda, y el peso del hígado, bazo y timo.

- 10 Las muestras de necropsia recogidas incluyen una alícuota del suero terminal, y las patas traseras izquierda y derecha y rodillas.

Procesamiento de Articulaciones/Puntuación Histopatológica

- 15 Después de 1-2 días en fijador y después de 4-5 días en descalcificado, las articulaciones del tobillo se cortan por la mitad longitudinalmente, las rodillas se cortan por la mitad en el plano frontal, se procesan, se embeben, se seccionan y se tiñen con azul de toluidina.

Métodos de Puntuación Histopatológica para Articulaciones de Ratas con Artritis por Deficiencia de Colágeno de Tipo II

- 20

A los tobillos y rodillas artríticos de colágeno se les dan puntuaciones de 0-5 para inflamación, formación de pannus y resorción ósea de acuerdo con los siguientes criterios:

Inflamación de Rodilla y/o Tobillo

0 = Normal

0,5 = Inflamación focal mínima

1 = Infiltración mínima de células inflamatorias en tejido sinovial/periarticular.

2 = Infiltración leve

3 = Infiltración moderada con edema moderado.

4 = Infiltración notable con edema notable

5 = Infiltración grave con edema grave

- 25 El infiltrado inflamatorio en ratones y ratas con artritis por deficiencia de colágeno de tipo II consiste en neutrófilos y macrófagos con números pequeños de linfocitos cuando las lesiones están en la fase aguda o subaguda. El edema tisular y los ex soldados de neutrófilos dentro del espacio articular son comunes de la fase aguda a subaguda. A medida que la inflamación evoluciona a crónica, las células inflamatorias mononucleares (monocitos, linfocitos) predominan y la proliferación de fibroblastos, a menudo con deposición de matriz metacromática, se produce en el tejido sinovial y periarticular. El exudado es menos común en el espacio articular. A menos que se indique en la zona de comentarios con el tipo de inflamación es de aguda a subaguda.
- 30

Pannus en Tobillo

- 35
- 0 = Normal
- 0,5 = Infiltración mínima de pannus en cartílago y hueso subcondral, afecta solo a zonas marginales y solo a pocas articulaciones.
- 1 = Infiltración mínima de pannus en cartílago y hueso subcondral, afecta principalmente a zonas marginales.

ES 2 710 921 T3

- 2 = Infiltración leve (< 1/4 de tibia o tarsos en zonas marginales)
- 3 = Infiltración moderada (de 1/4 a 1/3 de tibia o tarsos pequeños afectados en zonas marginales)
- 4 = Infiltración notable (1/2-3/4 de tibia o tarsos afectados en zonas marginales)

- 5 = Infiltración grave (> 3/4 de tibia o tarsos afectados en zonas marginales, distorsión grave de la arquitectura global)

Pannus en Rodilla

- 0 = Normal
- 0,5 = Infiltración mínima de pannus en cartílago y hueso subcondral, afecta solo a zonas marginales y solo a pocas articulaciones.
- 1 = Infiltración mínima de pannus en cartílago y hueso subcondral, aproximadamente un 1-10 % de superficie de cartílago o hueso subcondral afectado.
- 2 = Infiltración leve (se extiende hasta 1/4 de superficie o área o subcondral de tibia o fémur), aproximadamente 11-25 % de superficie de cartílago o hueso subcondral afectado
- 3 = Infiltración moderada (se extiende sobre > 1/4 pero < 1/2 de superficie o área o subcondral de tibia o fémur) aproximadamente un 26-50 % de superficie de cartílago o hueso subcondral afectado
- 4 = Infiltración notable (se extiende de 1/2 a 3/4 de superficie tibial o femoral) aproximadamente un 51-75 % de superficie de cartílago o hueso subcondral afectado
- 5 = Infiltración grave aproximadamente un 76-100 % de superficie de cartílago o hueso subcondral afectado

5 Daño en Cartílago del Tobillo (Énfasis en tarsos pequeños)

- 0 = Normal
- 0,5 = Disminución mínima en tinción con azul de T, afecta solo a zonas marginales y afecta solo a unas pocas articulaciones
- 1 = Pérdida de tinción con azul de toluidina de mínima a leve sin pérdida de condrocitos o alteración de colágeno evidente
- 2 = Pérdida leve de tinción con azul de toluidina con pérdida de condrocitos leve focal (superficial) y/o alteración de colágeno
- 3 = Pérdida moderada de tinción con azul de toluidina con pérdida de condrocitos moderada multifocal (zona de profunda a media) y/o alteración de colágeno tarsos más pequeños afectados a una profundidad de 1/2-3/4 con zonas raras de pérdida de grosor total
- 4 = Pérdida notable de tinción con azul de toluidina con pérdida de condrocitos notable multifocal (zona de profundidad a profunda) y/o alteración de colágeno, 1 o 2 superficies pequeñas de tarsos tienen pérdida de grosor total de cartílago
- 5 = Pérdida difusa grave de tinción con azul de toluidina con pérdida de condrocitos grave multifocal (marca de profundidad a la parte baja) y/o alteración de colágeno que afecta a más de 2 superficies de cartílago

Daño en Cartílago de la Rodilla

- 0 = Normal
- 0,5 = Disminución mínima en tinción con azul de T, afecta solo a zonas marginales y

- afecta solo a unas pocas articulaciones
- 1 = Pérdida de tinción con azul de toluidina de mínima a leve sin pérdida de condrocitos o alteración de colágeno evidente
 - 2 = Pérdida leve de tinción con azul de toluidina con pérdida de condrocitos y/o leve focal (superficial) alteración de colágeno puede tener pocas zonas pequeñas con un 50 % de profundidad de cartilago afectado
 - 3 = Pérdida moderada de tinción con azul de toluidina con pérdida de condrocitos moderada de multifocal a difusa (zona de profunda a media) y/o alteración de colágeno, puede tener 1-2 zonas pequeñas de pérdida de grosor completo que afectan a menos de ¼ del ancho total de una superficie y no más de un 25 % del ancho total de todas las superficies
 - 4 = Pérdida notable de tinción con azul de toluidina con pérdida de condrocitos notable de multifocal a difusa (zona de profundidad a profunda) y/o alteración de colágeno, o 1 superficie con pérdida casi total y pérdida parcial en otros, pérdida global total inferior a un 50 % de ancho de todas las superficies combinadas
 - 5 = Pérdida difusa grave de tinción con azul de toluidina con pérdida de condrocitos grave multifocal (marca de profundidad a la parte baja) y/o alteración de colágeno tanto en fémures y/o tibias, pérdida global total superior a un 50 % de ancho de todas las superficies combinadas

Resorción Ósea del tobillo

- 0 = Normal
- 0,5 = Resorción mínima que afecta solo a zonas marginales y afecta solo a unas pocas articulaciones
- 1 = Zonas pequeñas de resorción, no rápidamente evidentes con un aumento bajo, osteoclastos escasos
- 2 = Leve = zonas de resorción más numerosas, no rápidamente evidentes con un aumento bajo, osteoclastos más numerosos, < 1/4 de tibia o tarsos en zonas marginales reabsorbido
- 3 = Moderada = resorción evidente de hueso trabecular de cavidad medular y cortical sin defectos de grosor total en el córtex, pérdida de una cierta parte de la trabécula de la cavidad medular, lesión aparente con un aumento bajo, osteoclastos más numerosos, de 1/4 a 1/3 de tibia o tarsos afectados en zonas marginales
- 4 = Notable = Defectos de grosor total en el hueso cortical, a menudo con distorsión del perfil de la superficie cortical restante, pérdida notable de hueso de la cavidad medular, numerosos osteoclastos, 1/2-3/4 de tibia o tarsos afectados en zonas marginales
- 5 = Defectos de grosor total en el hueso cortical, a menudo con distorsión del perfil de la superficie cortical restante, pérdida notable de hueso de la cavidad medular, numerosos osteoclastos, > 3/4 de tibia o tarsos afectados en zonas marginales, distorsión grave de la arquitectura global

5 Resorción Ósea de la Rodilla

- 0 = Normal
- 0,5 = Resorción mínima que afecta solo a zonas
- 1 = Mínima = zonas pequeñas de resorción, no rápidamente evidentes con un aumento bajo, aproximadamente un 1-10 % del ancho total de la articulación del hueso subcondral afectado
- 2 = Leve = zonas de resorción más numerosas, pérdida definitiva de hueso subcondral, aproximadamente un 11-25 % del ancho total de la articulación del hueso subcondral

- afectado
- 3 = Moderada = resorción evidente de hueso subcondral aproximadamente un 26-50 % del ancho total de la articulación del hueso subcondral afectado
- 4 = Notable = resorción evidente de hueso subcondral aproximadamente un 51-75 % del ancho total de la articulación del hueso subcondral afectado
- 5 = Grave = distorsión de toda la articulación debido a la destrucción de aproximadamente un 76-100 % del ancho total de la articulación del hueso subcondral afectado

Deposición de la Matriz Periarticular (Solamente puntuada si se observa un aumento en cualquier grupo tratado con respecto a controles de enfermedad)

- 0 = Normal
- 1 = Tinción metacromática multifocal, apenas visible, sin expansión excesiva de tejido periarticular
- 2 = Tinción metacromática difusa, más oscura, sin expansión excesiva de tejido periarticular
- 3 = Tinción metacromática difusa, más oscura, expansión leve de tejido periarticular
- 4 = Tinción metacromática difusa, más oscura, expansión moderada de tejido periarticular
- 5 = Tinción metacromática difusa, más oscura, expansión grave de tejido periarticular

5

Análisis Estadístico

Datos clínicos

- 10 Los datos se analizan mediante un ensayo t de Student o un ensayo U de Mann-Whitney (no paramétrico). Si fuera aplicable, los datos se analizan adicionalmente en todos los grupos mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA de 1 vía) o ensayo de Kruskal-Wallis (no para México), junto con el ensayo posterior de comparación múltiple apropiado. A menos que se indique, el análisis estadístico se realiza solo en datos sin procesar (no transformados). Los ensayos estadísticos hacen ciertas suposiciones con respecto a la normalidad de los datos y la
- 15 homogeneidad de la varianza, y es posible que se requiera un análisis adicional si los ensayos dieran como resultado violaciones de estas suposiciones. La importancia de todos los ensayos se establece en $p < 0,05$.

El porcentaje de inhibición del peso de la pata y el AUC se calcula usando la siguiente fórmula:

- 20 $\% \text{ de inhibición} = A - B/A \times 100$
 A = Control Medio de Enfermedad - Normal Media
 B = Tratado Media - Normal Media

Ejemplo 6 - Tratamiento de Espacios Óseos, Defectos de Cartílago y Lesiones de Menisco en Cabras

25

Este estudio demuestra el efecto del tejido microvascular en la preparación de la presente invención en el tratamiento de huesos óseos, defectos de cartílago y lesiones de menisco. En este estudio, para cada animal, se opera la articulación trasera derecha, y se crean 3 defectos quirúrgicos distintos y separados. Cada fémur derecho analizado tendrá un defecto óseo de 8 mm de diámetro por 20 mm de profundidad en la región epicondilar lateral del fémur, un defecto de cartílago rectangular de 4 x 7 mm por 2 mm de profundidad creado en el surco troclear y uno de 7 mm de largo por 1-2 mm de defecto de menisco de grosor total de 2 mm de ancho creado en la zona blanca-blanca del menisco medial. El grupo de tratamiento de 3 animales tiene cada defecto tratado con la preparación microvascular del tejido, mientras que el grupo de control tiene los defectos rellenados solo con el andamio. Las cabras se evalúan a las 8 semanas para evaluar y caracterizar el tejido reparado en los distintos sitios de defectos.

30 Se espera que los defectos tratados sean superiores en apariencia general e histológica en comparación con los controles.

35

La cabra se eligió debido al gran tamaño relativo de la articulación suprimida, la facilidad de manipulación, uso en otros estudios de reparación de cartílago, menisco y hueso, y similitud de respuesta a la que se observa en seres humanos. Para la investigación del cartílago se han usado diversas especies de cabras debido al gran tamaño de sus articulaciones, similitud de la fisiología de la reparación del menisco, grosor del cartílago en la articulación de la rodilla (Stifle) entre 1,5-2 mm, similar a los caballos y los seres humanos, y que poseen hueso esponjoso y cortical

40

similar a los humanos (osteonal secundario). Los procesos de reparación de hueso, cartílago y menisco son un proceso muy complejo que no se puede imitar en un entorno *in vitro*. Los modelos animales son necesarios ya que la fisiología de las articulaciones, especialmente las articulaciones lesionadas, es muy compleja y no se puede duplicar en el laboratorio. Los animales usados en este estudio se resumen en la Tabla 9.

5

Tabla 9. Uso en Animales

Nombre Común	Número	Edad	Peso	Sexo	N.º Alojados Simultáneamente	Duración del Alojamiento
Cabra de Cruce Nubio y Boer	6	2-4 de edad	> 54,4 kg (> 120 lb).	Macho Castrado	6	6 a 12 semanas
Cabra de Cruce Nubio y Boer	2	2-4 de edad	> 54,4 kg (> 120 lb).	Macho Castrado	2	Sustitución de los animales; máximo de 12 semanas

10 Un defecto unicortical de 8 mm de diámetro por 20 mm de profundidad se crea en la región epicondilar lateral del fémur derecho; se crea un defecto rectangular de 4 x 7 mm por aproximadamente 2 mm de profundidad en el surco troclear lateral del fémur derecho, y se creará un defecto de grosor total de aproximadamente 7 mm de largo por 1-2 mm de ancho en el menisco medial derecho. Cada rodilla se examina físicamente examinada para cajón, rango de movimiento (goniómetro), hinchazón, temperatura, crepitación, seguimiento de la rótula y valgo/varo. Se realiza un lavado quirúrgico convencional con clorohexidina seguido de alcohol al 70 % y seguido de una pintura de betadine. El enfoque quirúrgico consiste en una incisión medial curvada de la piel desde el tercio distal del fémur derecho hasta el nivel de la meseta tibial.

15

20 El ligamento colateral medial se identifica y se hace un esbozo de la huella de unión del ligamento óseo con precaución. En el centro de la huella, una broca de 2,8 mm y una rosca se usa para crear un orificio de tornillo para volver a colocar el ligamento. Una sierra oscilante se usa para cortar la huella de fijación del ligamento colateral medial, permitiendo que se refleje hacia la tibia. La cápsula articular se abre y la rodilla se flexiona y gira lateralmente para exponer el menisco medial. Se coloca una lengüeta protectora de plástico debajo del menisco medial y, mediante un punzón oval especialmente diseñado, se realiza un defecto de espesor completo en la zona blanca-blanca del menisco. El defecto se trata con armazón o armazón + compuesto. La rodilla se endereza y el ligamento colateral medial se vuelve a colocar con un tornillo y una arandela.

25

30 A continuación la rodilla se flexiona y se identifica el punto medio del surco de la tróclea lateral. El punto de perforación para el defecto del cartílago se define como 20 mm distal al borde proximal del surco troclear lateral. El cartílago se puntúa con un punzón de 6 mm de diámetro, y usando instrumentos especializados, se realiza un defecto de 6 mm de diámetro por un espesor aproximado de 2 mm en la superficie del cartílago. Este defecto se trata con armazón o armazón + compuesto.

30

35 Con la rodilla aún flexionada, se usa una broca de 3 mm de diámetro con collarín para perforar un orificio piloto en la región epicondilar del cóndilo femoral lateral hasta una profundidad de 20 mm. La broca se alinea de forma perpendicular a la línea de unión y paralela a la superficie anterior. Este agujero piloto se ensancha a un diámetro de 8 mm. El defecto óseo se lavar abundantemente y a continuación se trata con un armazón o armazón + compuesto.

35

40 Después del cierre de la incisión quirúrgica en 3 capas usando Vicryl 1-0 para las capas profundas y grapas en la piel, se aplica una férula de Thomas modificada a la pata para limitar el peso y el movimiento. El yeso y la férula de fibra de vidrio permanecerán puestos durante un mínimo de 14 + 2 días después de la operación. Durante este tiempo los animales se mantendrán en pequeñas zonas de ejercicio.

40

Tabla 10: Asignación de tratamiento por defecto

Grupo	Número de Animales	Tratamiento
1	1	Defecto Óseo: Compuesto Defecto de Cartílago: Compuesto Defecto de Menisco: Compuesto
1	2	Defecto Óseo: Compuesto Defecto de Cartílago: Compuesto Defecto de Menisco: Compuesto

Grupo	Número de Animales	Tratamiento
1	3	Defecto Óseo: Compuesto Defecto de Cartílago: Compuesto Defecto de Menisco: Compuesto
1	4	Defecto Óseo: Cartílago de Armazón Defecto: Menisco de Armazón Defecto: Armazón
2	5	Defecto Óseo: Cartílago de Armazón Defecto: Menisco de Armazón Defecto: Armazón
2	6	Defecto Óseo: Cartílago de Armazón Defecto: Menisco de Armazón Defecto: Armazón

Los animales se someten a eutanasia bajo anestesia en estadio III con Cloruro Potásico IV en los días 84 + 2, después de la operación. Después de la eutanasia, las articulaciones suprimidas se evalúan ampliamente, el líquido sinovial se evalúa ampliamente para determinar el color y la viscosidad, y las muestras se recogen como se describe en la Tabla 12. Las articulaciones se abrirán, se fotografian y la superficie de los sitios condrales se puntuarán como se indica en la Tabla 13 Las superficies de articulación que se oponen a los sitios defectuosos se examinarán para detectar cualquier superficie anómala de la articulación. La evaluación general se realizará en las articulaciones de rodilla de control y operadas. Los ganglios linfáticos poplíteos y las membranas sinoviales se examinarán para detectar cualquier inflamación.

Tabla 11: Evaluación Total y Recogida de Muestra

Muestra	Evaluación Total	Fotografía y Puntuación	Recogida de Muestra
Ganglio linfático Poplíteo Derecho	X		
Cartílago y menisco Articulación de la Rodilla Derecha		X	X (H)
Ganglio linfático Poplíteo Izquierdo	X		
Cartílago y menisco Articulación de la Rodilla Izquierda	X	X	

H = histología – Solo fémur derecho: defecto óseo, defecto troclear, menisco medio

La rodilla contralateral se examina para detectar cualquier superficie anómala de la articulación. Se realizan evaluaciones morfológicas generales de las articulaciones de la rodilla derecha para determinar la reparación de la superficie condral en función de los criterios de puntuación anteriores que se enumeran en la Tabla 3. El fémur derecho se corta para separar el defecto del cartílago de la región vacía del hueso y se coloca en recipientes debidamente etiquetados y rellenos con un volumen de 10 veces de formalina tamponada a pH neutro al 10 por ciento. El menisco medial se evalúa de manera general, se recoge y se coloca en recipientes debidamente etiquetados y llenos con un volumen de 10 veces de formalina tamponada a pH neutro al 10 por ciento.

Tabla 12: Criterios de Puntuación para Evaluaciones Morfológicas Totales

Característica	Clasificación	Puntuación
Integración en el borde (nuevo tejido con respecto a cartílago nativo)	Total	2
	Parcial	1
	Ninguna	0

Característica	Clasificación	Puntuación
Uniformidad de la superficie del cartílago	Uniforme	2
	Intermedio	1
	Irregular	0
Superficie del cartílago, grado de relleno	Descarga	2
	Depresión ligera	1
	Deprimido/crecimiento excesivo	0
Color del cartílago, opacidad o carácter translúcido del neocartílago	Opaco	2
	Translúcido	1
	Transparente	0

El líquido sinovial se recoge, se evalúa para volumen, viscosidad (rigidez), claridad y color. Si fuera apropiado, se aplica una puntuación semicuantitativa de la evaluación total del líquido sinovial tal como se destaca en la Tabla 13.

5

Tabla 13: Descripción y Puntuación para Líquido Sinovial

Puntuación	Color	Transparencia	Rigidez
0	S = AMARILLO CLARO	C = TRANSPARENTE	N = NORMAL
1	P = ROSA	H = DIFUSO	A = ANÓMALO
2	Y = AMARILLO/R = ROJO	D = IMPRECISO	W = ACUOSO
3	B = SANGUINOLENTO	T = TURBIO	

La puntuación total de líquido sinovial es una suma de las puntuaciones de color, transparencia y rigidez (0-8 puntos).

10 **Ejemplo 7 - Ensayos de Migración Celular Usando Tejido Microvascular de Rata Procesado**

Para demostrar el efecto de la composición del tejido microvascular procesado en la migración celular, los ensayos de migración de células endoteliales humanas (quimioatracción por las composiciones de tejido microvascular procesado) y absorción de microvesículas (MV) de la composición de tejido microvascular procesado por la fracción vascular estromal obtenida a partir de tejido adiposo (SVF) las desarrollaron y usaron como medidas de la actividad biológica de la composición.

15

La razón para elegir estos estudios fue que: (1) la composición de tejido microvascular procesado puede inducir aumentos en la reparación vascular; por lo tanto, la migración de células endoteliales podría ser una métrica válida; y (2) la liberación y absorción de MV es una actividad importante que se podría producir en múltiples tipos de células en un modelo de reparación de tejidos; por lo tanto, la población de células SVF, que tiene tipos de células importantes para la reparación vascular, se usó para someterá ensayo la absorción de MV.

20

Diseño General del Estudio

25

Para evaluar la capacidad de quimioatracción de la composición de tejido microvascular procesado para células endoteliales, se colocaron muestras de la composición en las cámaras inferiores de las placas de Transwell, y se controló la migración de células endoteliales marcadas con un colorante lipófilo fluorescente de color naranja-rojo (CM-Dil) en el tiempo, de 12 a 48 horas. El ensayo también incluyó un medio de crioconservación químicamente definido EZ-CPZ™ (Incell Corp., San Antonio, TX) a un 100 % y como una mezcla a 50/50 de EZ-CPZ™ con medio M3D™ (Incell Corp., San Antonio, TX) como control de medida inicial.

30

Un segundo estudio se realizó para evaluar la absorción de la composición de tejido microvascular procesado por las células SVF. La composición se incubó con CM-Dil para permitir que el colorante se incorporara en las MV y las membranas celulares de las muestras de la composición. Las muestras de la composición marcada se aclararon, se diluyeron en medio, a continuación se colocaron sobre cultivos de monocapa de células SVF. Después de 24 h de absorción, las células se aclararon, a continuación se visualizaron para absorción de colorante de color rojo fluorescente.

35

Materiales y Métodos

5 M3D™ es un medio de cultivo químicamente definido fabricado por INCELL. En algunos ensayos, M3D™ se suplementó con antibióticos (1X PSF: antibiótico Pen/Estrep/Fungizona/antimicótico; Invitrogen, Grand Island NY). El medio M3D:10 (INCELL) fue M3D™ suplementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS) y 1X PSF. EZ-CPZ™ (Incell Corp., San Antonio, TX) es un medio de crioconservación de células químicamente definido. EZ-CPZ™ y EZ-CPZ™: M3D™ (1:1; v/v) se usaron como medios de control de referencia.

10 CM-Dil es el colorante fluorescente "Cell Tracker®" en una formulación acuosa para medio de cultivo (Invitrogen / Molecular Probes). Se asocia con materiales lipófilos tales como membranas celulares y las MV y se puede visualizar como fluorescencia de color rojo brillante mediante microscopía de fluorescencia. Para este estudio, un microscopio invertido EVOS se usó con un filtro rojo: 530 nm de excitación, 593 nm de emisión).

15 Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) en el pase 1 (p1) se recuperaron del Biorrepositorio de INCELL. Las células p1 de SVF humanas para los ensayos de absorción de MV se recuperaron del Biorrepositorio de INCELL.

20 Todas las células se cultivaron en M3D: 10™ (Incell, San Antonio, TX). Las células endoteliales se incubaron con CM-Dil durante 30 minutos a 37 °C y a continuación se enjuagaron con M3D™ con 1XPSF. Se hizo el recuento de las células y un número igual de células por pocillo se aplicó a la cámara superior de cámaras Transwell de PET de tamaño de poro de 3 micrómetros (Thermofisher; Waltham, MA) cargada previamente con los materiales de ensayo de la composición de tejido microvascular procesado en pocillos por triplicado.

25 Las células SVF para el ensayo de adsorción se cultivaron en placas de 48 pocillos en fase de crecimiento logarítmico.

Composición de Tejido Microvascular Procesado

30 Dos composiciones de tejido microvascular procesado se preparan y someten a ensayo, es decir, BMA y BMB. Las muestras de BMA eran células SVF de rata y BMB eran células mononucleares de médula ósea, cada una liofilizada a 10⁶ células/ml. Las células SVF de rata se prepararon picando almohadillas de grasa epididimales con tijeras hasta que no hubo trozos mayores de 1 mm de diámetro, y a continuación se lavaron y se incubaron en 1 U/ml de Clzyme AS (Vitacyte, Indianapolis, IN) en PBS durante 60 min a 37 °C con agitación suave. Las células se lavaron dos veces y se volvieron a suspender a 10⁶/ml en tampones de liofilización. Las células de la médula ósea de rata se obtuvieron mediante lavado abundante de los fémures y las tibias con solución de ACDA/PBS y se disocia mediante aspiración y expulsión repetidas a través de una aguja de calibre 20 ga. A continuación las células de la médula ósea se separaron en un gradiente de Ficoll, se lavaron con PBS + FBS al 1% dos veces y se volvieron a suspender en tampones. Después de la liofilización, las muestras de BMA dieron recuentos celulares por debajo del límite de detección (menos de 10.000), mientras que las muestras de BMB dieron recuentos celulares de 0,6 a 1,0 millones y viabilidades (azul de tripano) de un 10 a un 50 %, como se muestra en La tabla 14.

Tabla 14: Viabilidad de Preparaciones de BMA y BMB

Muestras	N.º Células		Viabilidad (%)	N.º Viales
	Pre-liof	Post-liof		
Tampón BMA 1	45.000	2.500	80	3
Tampón BMA 2	27.000	7.500	0	3
Tampón BMB 1	4,4 x 10 ⁵	6 x 10 ⁵	48	4
Tampón BMB 2	5 x 10 ⁵	10 x 10 ⁵	10	4

45 Todas las muestras se almacenaron refrigeradas en la oscuridad durante un año y las muestras de ensayo se esterilizaron con radiación de haz de E de 11 kGy. Las muestras de control no irradiadas no se esterilizaron.

Migración Transwell De Células Endoteliales Etiquetadas

50 El material liofilizado se reconstituyó en 1 ml de agua UFDI con 1X PSF. De esta muestra total, se pusieron 300 µl en el fondo de cada uno de los 3 pocillos y se llevaron a un volumen final de 500 µl con 200 µl de M3D. Las cámaras

superiores se colocaron en los pocillos de muestra y un número igual de células HUVEC p2 etiquetadas con CM-Dil pusieron en cada uno. La placa se incubó a 37 °C, y se tomaron imágenes de los pocillos a las 12, 24 y 48 horas. Las imágenes se examinaron haciendo el recuento de las células en los campos para determinar los resultados.

5 Absorción de Microvesículas Etiquetadas con Células SVF

Los 100 µl restantes de material liofilizado se incubaron con CM-Dil para etiquetar las membranas celulares presentes. El material se lavó 3 veces con M3D + 1XPSF por centrifugación. Las células SVF sembradas en placas de 48 pocillos para el ensayo de absorción se hicieron crecer hasta un 50 % de confluencia y 50 µl de CM-Dil material liofilizado etiquetado con CM-Dil en capas en la parte superior. La mitad de los pocillos se enjuagaron a las 24 horas, se revistieron con líquido de montaje y se dejaron secar; la otra mitad se aclaró, se fijó y se montó después de 3 días. Las imágenes se examinaron para determinar los resultados.

15 Resultados

Migración Transwell De Células Endoteliales Etiquetadas

Para todos los pocillos, había un número mínimo de células en la cámara inferior en el punto temporal de 12 horas. Véase la Figura 2 y la primera fila de las Figuras 3-7 a medida que el tiempo avanzaba, las células comenzaron a migrar en la cámara inferior. Algunas de las muestras se llevaron a la cámara inferior más rápidamente. Las muestras de BMA tendían a atraer a las células más que BMB como se observa en la Figura 2. El grupo de ensayo de Tampón BMA 2 tuvo el índice celular más bajo a las 24 horas, pero los recuentos celulares más altos en el punto de tiempo de 48 horas entre las muestras de ensayo. En general, las muestras de BMA funcionaron mejor que las muestras de BMB con el tampón 2, ya que mostraron una tendencia (pero no estadísticamente significativa) de inducción de mayor tasa de migración que el tampón 1.

El otro efecto notable del ensayo fue la tendencia a una disminución en la migración de la irradiación causada en BMA de aproximadamente un 20 %, mientras que BMB tuvo poco efecto y tenía esencialmente el mismo nivel (la diferencia no era estadísticamente significativa) a las 24 y 48 horas.

El control de medios EZ-CPZ™ tuvo cierta transmigración pero solo más tarde en el transcurso del tiempo y en menor grado que las muestras de BMA y BMB. Estos resultados demuestran de forma espectacular que las células no tienen que ser viables o autólogas para que la composición induzca una actividad angiogénica.

35 Absorción de Microvesículas de Composición de Tejido Microvascular Procesado Etiquetado con Células SVF

Este ensayo se realizó para determinar si las MV de la composición de tejido microvascular procesado se transportaban en células SVF (fracción vascular estromal). El ensayo se realizó mediante etiquetado de los 100 µl restantes del material de composición tejido microvascular procesado en cada vial con CM-Dil, que se incorporan membranas celulares incluso si las propias células están muertas. Las células SVF se sembraron en placas en una placa de 48 pocillos con medios M3D:10 y se permitió que se adhirieran y crecieran hasta que tuvieran una confluencia de aproximadamente un 50 %. Los 50 µl del material etiquetado se añadieron a los pocillos y se incubaron durante 6 horas. Los pocillos se enjuagaron 3 veces con M3D™ y se fijaron con montaje con humedad. Las imágenes mostraron que varias de las células efectivamente absorbían el material a medida que el tinte se transfería a las células SVF tal como se observa en las Figuras 8 y 9.

Discusión

En este ensayo, el material liofilizado de BMA y BMB con o sin irradiación actuó como agentes quimioattractores para las células endoteliales. Se observó una leve disminución de la transmigración celular cuando el material se irradió. La diferencia entre los tampones 1 o 2 fue insignificante.

El material de BMA y BMB se recogió mediante células SVF vivas cuando el material se puso en la parte superior de un cultivo que ya estaba creciendo y se incubó durante 24 horas.

Hay varios conceptos importantes ilustrados con estos experimentos. Aunque las muestras de SVF mostraron enormes pérdidas celulares y no tenían viabilidad después de la liofilización, retuvieron más actividad biológica que las muestras de médula ósea, que no mostraron pérdidas celulares y una viabilidad de un 10 a un 50 %. (La pérdida de células SVF puede haber sido causada por una actividad enzimática excesiva durante la etapa de digestión). Ambas preparaciones celulares se mantuvieron estables durante más de un año. La esterilización no afectó materialmente a su capacidad para atraer células endoteliales.

Tabla 15: Factores de Crecimiento, Receptores, Hormonas, Genes, Factores de Transcripción Asociados con Hueso

FACTORES DE CRECIMIENTO Y RECEPTORES		
SUPERFAMILIA DE TGF- β		
Identidad	Fuente Ejemplo	Descripción General
TGF- β 1	Genentech, Chiron, Colágeno/Celltrix,	cicatrización de heridas de tejido blando y duro, oncología, hematopoyesis, la forma latente de TGF-beta se une al receptor de manosa-6-P, cánceres de colon y pancreático
TGF- β 2	Genzyme T.R., Celltrix	orificios maculares, ulceradas, oncología), betaglicano
TGF- β 3	Oncogene (B-M-Squibb)	Oncología, esquelético
TGF- β 4	(pollo)	
TGF- β 5		
TGF- β R 1-3		El receptor de Tipo III ayuda a unirse al receptor de Tipo II
BMP 2	Genetics Institute	KO letal, expresado en pulpa dental
BMP 3 (osteogenina)	Urist, Reddi	También conocido como osteogenina, G. I., expresado en pulmón
BMP 4 (2a)		KO letal, expresado en pulmón, diente: sobreexpr. = engrosamiento del hueso (neonatos)
BMP 5		expresado en pulmón, el ratón mutante de orejas cortas tiene deformidades óseas
BMP 6 (vgr-1)		expresaron pulmón, osificación del esternón retrasada por KO (fenotipo leve)
BMP 7 (OP-1)	Creative	
Biomoléculas	riñón de KO, ojo; expresado en pulpa dental	
BMP 8 (OP-2)	Creative Biomoleculas	pulpa dental
BMP 9 (OP-3)	Creative Biomoleculas	
BMP 10		
BMP 11		
BMP 12 (GDF-V)		Crecimiento de cartílago y tendón estimulado por G.I., reparación de P-T
BMP 13 (GDF-6, CDMP-2)		Crecimiento de cartílago y tendón estimulado por G.I.
BMP 14		
BMP 15		G.I.
BMPR IA		El Tipo IA regula de forma positiva el Tipo IB, hueso y cartílago ectópico de KO (sin feno en otro lab)

ES 2 710 921 T3

FACTORES DE CRECIMIENTO Y RECEPTORES		
SUPERFAMILIA DE TGF-β		
BMPR IB		La activación de IB da cartílago (incluso ectópico); KO sin cartílago.
BMP2R		El receptor de Tipo II se une al de tipo IA (aumento de los nódulos) o IB (menos nódulos)
GDF1		expresado el cerebro, pulpa dental
GDF2		
GDF 3 (Vgr-2)		
GDF4		
GDF 5 (MP52, CDMP-1)		tejido blando, pulpa dental, hueso y cartílago
GDF 6 (BMP-13, CDMP-2)		tendón, ligamento, cartílago, huesos más gruesos y más largos (Gene TX para aumentar la producción en neonatos), pulpa dental
GDF 7 (BMP-12)		cartílago y tendón, pulpa dental
GDF 8 (miostatina)	MetaMorphix	KO permite un aumento de la masa muscular de 2-3X
GDF 9		
GDF 10		Hueso membranoso, tejido adiposo
Dpp		Proteína de mosca de la fruta análoga a BMP 2 y OP-1, Induce hueso, cartílago, y médula ósea en mamíferos
60A		Proteína de mosca de la fruta análoga a BMP 2 y OP-1, Induce hueso, cartílago, y médula ósea en mamíferos
MP52		Diferenciación de progenitores mesenquimales, tejidos blandos, pulpa dental
univina		
Vg1		
Vgr-1 (BMP-6)		Expresado en pulmón
Vgr-2 (GDF3)		
nodal		
fugacina		
ADMP		
dorsalina-1		
PC-3		
radar		
screw		
lefty		

ES 2 710 921 T3

FACTORES DE CRECIMIENTO Y RECEPTORES		
SUPERFAMILIA DE TGF- β		
GDNF		Expresado en pulpa dental
α -inhibina		Los KO desarrollan gónadas y a continuación tumores adrenales
inhibina β A		
Inhibina β B		
Inhibina β C		
Inhibina β D		
MIS		Sustancia Inhibidora Mulleriana
CDMP 1		Aumenta la condrogénesis y la osteogénesis <i>in vitro</i> , cartíl. y hueso subQ
CDMP 2		Aumenta la condrogénesis <i>in vitro</i> , cartíl. y hueso <i>in vivo</i> .
Péptido osteogénico OGP (I. Bab).		Factor traumático que induce hueso. 14-mer, los últimos 5 AA son esenciales.
TGF- α		Curación de heridas de tejido blando, similar a EGF
PDGF AA	Chiron, Creative Biomolecules	El agente clínico de Fase III de Chiron mostró un 50 % de reducción en el tamaño de la herida a los 28 días, en agentes clínicos para enfermedad periodontal
PDGF BB	Zymogenetics	reparación de cartílago
PDGF AB		
CTGF (factor de crecimiento del tejido conectivo)		Se une al receptor PDGF-BB en células 3T3
CEF10		45 % de homología con CTGF
EGF		Acciones muy relacionadas con TGF- α
HB-EGF		Relacionado con TGF- α , potente en cicatrización de heridas
Pleiotrofina (HB-GAM)		Indujo hueso y cartílago en defecto de calv de rata
VEGF		Factor de Crecimiento Endotelial Vascular - - secretado por osteoblastos
FGF-1 (aFGF)		Las interacciones de receptor con heparina, polianiones, moléculas de la matriz (sulfato de heparano) son importantes en acción y regulación de los FGF
FGF-2 (bFGF)		El estudio clínico de Synergen sobre la cicatrización del tejido blando (malos resultados) Mundy mostró formación ósea después de inyección sistémica. Orquest aprobado por SCIOS, se inyecta vehículo de ácido hial Ossigel para reparación de fractura
FGF 3-6		Productos oncogénicos

FACTORES DE CRECIMIENTO Y RECEPTORES		
SUPERFAMILIA DE TGF- β		
FGF-7 (KGF)		Estimulación mesenquimal del crecimiento y cicatrización cutáneos (queratinocitos)
FGF-8		
FGF-9		
FGF-18(Zfgf5)	Zymogenetics	Se muestra que tiene efecto condrogénico <i>in vivo</i>
FGFR 1-4		
NGF		
Osteopontina	Metra (Orquest)	posible inducción de osteoprogenitores
Osteopoyetina		Hormona de Crecimiento, actúa a través de IGF-I
IGF I (somatomedina C)	Genentech, Cephalon	crecimiento esquelético y metabolismo de proteínas, formación ósea cuando se infunde en ratas
IGF II	MSA	Embriogénesis, Forma más común en mamíferos > ratas
IGFBP 1		
IGFBP 2		
IGFBP 3	Celltrix	Aumento de la masa ósea local y sistémica
IGFBP 4		
IGFBP 5	Chiron, Baylink, BMGmbH	
IGFBP 6		
LDGF		
TNF- α		
INF α		
INF β	Chiron, Betaseron	comercializado por MS
INF γ		consenso de Genentech en ensayos clínicos
CSF-1		Requerido para formación de osteoclastos
IL-4		Inhibe la función de OB
IL-6	Imclone, Sandoz, Serono	Fabricado para y activa el receptor OB y O'clst, (2Xgp130)
IL-8		
IL-11		receptor [2Xgp130]
LIF (Factor Inhibitorio de Leucemia)		hecho por y activa OB, [LIFR+gp130]
Oncostatina-M [OSMR+gp130 orLIFR+gp130]		activar OB, aumentar la diferenciación

FACTORES DE CRECIMIENTO Y RECEPTORES		
SUPERFAMILIA DE TGF-β		
Cardiotrofina-1 [LIFR+gp130]		aumentar la formación de nódulos
CNTF [LIFR+gp130]		
ACTIVINA βA		Pulpa dental
ACTIVINA βB		Pulpa dental
Nogina	Regeneron, P&G	Se une a los BMP y antagoniza acciones
BNP (péptido natriurético cerebral)	Scios	Aumento de condroprogenitores <i>in vivo</i> ,
ROBO-1	Glaxo	Regulado de forma positiva cuando las vértebras se estiran, 37 kd, aumenta estrógeno, disminuye PTH
VEGF-1		Einhorn encontró expresión durante la técnica de Ilizarov
BSP (sialoproteína ósea)		Defecto de calvaria curado cuando se inmoviliza en gelatina
Osteopontina		Formación ósea inducida en defecto de calv de rata
Endotelina 1		Expresado por OB y condro (y endotelial), ambos tienen receptores.
Endotelina 3		formación de hueso y cartílago inducida en calv de rata
HORMONAS		
PTH		
PTHrP		
PTHrP		Señales desde el pericondrio a los receptores en los condrocitos de placa de crecimiento para prevenir la diferenciación hipertrófica = retroalimentación negativa para Ihh, Bcl-2.
PTHrP (107-111)		Región de inducción ósea. KO letal todo el cartílago osificado y fusionado, la sobreexpresión causa onlages masivos de cartílago
Metabolitos de vitamina D		
Vitamina DRs		
Calcitonina		
Estrógeno		Aumenta prolif. y difern. de células de médula, menos adipogénesis
RA (ácido retinoico)		Diferenciación
RAR		receptores α, β, γ en el núcleo, α e γ implicados en la formación de cartílago

FACTORES DE CRECIMIENTO Y RECEPTORES		
SUPERFAMILIA DE TGF- β		
HORMONAS		
T4 (tiroides)		Acelera la diferenciación de la placa de crecimiento
GH (hormona de crecimiento)		Retrasa de la diferenciación de la placa de crecimiento
PGE 1		Infusión local causada por la formación de hueso
PGE2		
EB2		receptor de PG en células de médula
EB4		receptor PG en precursores óseos
VARIOS		
PGP		
CTAP-III		
b-TG		
NAP (1-3)		
PF-4		
MGSA		
GRO		
IP10		
C9E3		
CEF-4		
MMP-2		
GENES		
HoxA-1		
HoxA-2		Segundo arco branquial, elementos craneofaciales
HoxA-3		
HoxA-4		
HoxA-4		
HoxA-6		
HoxA-7		
HoxA-9		Hombro
HoxA-10		Húmero
HoxA-11		Radio-cúbito
HoxA-13		falanges
HoxB 1		
HoxB2		
HoxB 3		
HoxB 4		
HoxB 5		

FACTORES DE CRECIMIENTO Y RECEPTORES		
SUPERFAMILIA DE TGF- β		
HoxB 6		
HoxB7		
HoxB8		
HoxB9		Hombro
HoxB 13		Falanges
HoxC4		
HoxC5		
HoxC6		
HoxC8		
HoxC9		hombro
HoxC 10		Húmero
HoxC 11		Radio-cúbito
HoxC 12		Metacarpos
HoxC 13		Falanges
HoxD 1		
HoxD3		
HoxD 4		
HoxD 8		
HoxD 9		Hombro
HoxD 10		Húmero
HoxD 11		Radio-cúbito
HoxD 12		Metacarpos
HoxD 13		falanges, gen Homeobox, 4ª vértebra sacra
Shh (erizo Sonic)		formación de patrones esqueléticos, induce FGF-4, BMP-2 y 4, HoxD-13
Ihh (erizo Indio)		actividad similar y señalización para Shh, regula (previene) diferenciación hipertrófica, (-) retroalimentación a través de PTHrP, induce BMP2, PTC, GLI, HOXD-11, HOXD-13, reprime el colágeno de tipo X y BMP-6.
Dhh (erizo del desierto)		supervivencia de espermatozoides
Pax 1		fenotipo ligero de KO
Pax 2		
Pax 3		
Pax 4		
Pax 5		
Pax 6		

FACTORES DE CRECIMIENTO Y RECEPTORES		
SUPERFAMILIA DE TGF- β		
Pax 7		
Pax 8		
Pax 9		KO no dio dientes ni timo, paladar hendido, y pulgar extra
WNT5A		Excrescencia proximal-distal de las extremidades bajo el control del borde ectodérmico apical y FGF
WNT7A		Formación de patrones dorsal-ventral a través de LMX-1a
LMX1a		Formación de patrones dorsal-ventral, activado por WNT-7a y reprimido por En-1
Enl		Formación de patrones dorsal-ventral
MSX 1 (Hox7)		Gen Homeobox implicado en el crecimiento de hueso intramembranoso, reg'd por BMP-4. feno ligero para KO mild pheno a menos que MSX-2 también KO'd
(Hox8, 1)		Factor de transcripción, gen homeobox, implicado en el cierre de sutura, reg'd por BMP-4. Específico del sitio óseo incluso en adultos. Inhibe la diferenciación de OB en pollo. EtOH bloquea la expresión de msx-2 en el desarrollo. Feno leve de KO a menos que MSX-1 también KO'd
MSX3		
c-jun		
c-ras		
junb		
egr-1		
c-src		Gen requerido para que los OC reabsorban hueso
c-fos		Gen requerido para que los OC se formen
dHand		
eHand		
twist		
ID		
Permo-1		
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN		
*bHLH		Familia de factores de transcripción que desencadenan el compromiso del linaje (por ejemplo, MyoD)
paraxis		marcador más temprano de células que se convertirán en somites, ¿marcador epitelial?
escleraxis		predice el esqueleto después de paraxis, pero KO no forma somitas. La sobreexpresión favorece el feno de condrocitos

FACTORES DE CRECIMIENTO Y RECEPTORES		
SUPERFAMILIA DE TGF-β		
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN		
CK-ERG		Precede a la formación de cartílago
SOX9		Factor de transcripción, huesos largos arqueados, relacionado con SRY
MAD-1		señal de BMP-2 en C2C12
AP-1		TGF
NF-1		TGF
SP-1		TGF
SP-2		
SP-3		TGF
TIEG		TGF, estrógeno

Ejemplo 8 - Efectos de Tejido Microvascular *In Vitro* e *In Vivo*

5 Como se ha analizado anteriormente, diversas preparaciones de células madre han mostrado efectos beneficiosos en estudios clínicos y en animales para una diversidad de indicaciones. En muchos casos, la supervivencia de las células madre administradas es relativamente escasa. Por lo tanto, los estudios actuales se diseñaron para abordar si, como se analiza en relación con diversas realizaciones anteriores, se necesitan células madre viables para conseguir algunos (o todos) de los beneficios terapéuticos asociados con las células madre. El presente estudio usó tejido microvascular, una rica fuente de células madre y precursoras, que se procesó de acuerdo con los métodos que se han descrito anteriormente.

10 En resumen, el tejido microvascular se aisló de tejido adiposo de cadáver humano prosperando el tejido y posteriormente haciendo digestión enzimática del tejido troceado. El tejido digerido se centrifugó a continuación para eliminar la grasa, dando como resultado tejido microvascular. El tejido microvascular se volvió a suspender en un tampón de crioconservación (mezcla a 1:1 de medios M3:DC y EZ-CPZ, INCELL Corporation, San Antonio, TX), se distribuyó en viales y se liofilizó o tanto se liofilizó como se esterilizó con radiación.

15 El tejido microvascular procesado resultante se sometió a ensayo para recuentos celulares, viabilidad, fenotipo, CFU-F, y bioactividad en angiogénesis y modelos ortopédicos.

20 Resultados

25 Los recuentos celulares y la viabilidad de tejido microvascular recién aislado, liofilizado y liofilizado/esterilizado se muestran en la Tabla 16. El fenotipo de cada preparación se muestra en la Tabla 17.

Tabla 16

Preparación	Aislado	Liofilizado	Liofilizado + Esterilizado
Recuento Celular (DAPI/gramo de grasa)	1,2 ± 0,2 millones	0,9 ± 0,1 millones	1,0 ± 0,3 millones
Viabilidad (Azul de Tripano)	85 ± 5 %	15 ± 1 %	2 ± 1 %

Tabla 17

Fenotipo	Colágeno de Tipo IV	CD31+	CD34+	CD44+	CD45+
Tejido Microvascular Recién Preparado	65 ± 5 %	52 ± 7 %	58 ± 4 %	55 ± 10 %	5 ± 1 %
Liofilizado + Esterilizado	85 ± 13 %	73 ± 17 %	65 ± 9 %	61 ± 13 %	11 ± 3 %

Los datos del recuento celular/viabilidad celular demuestran claramente que no hay un cambio significativo en el número de células basándose en el procesamiento del tejido microvascular (por ejemplo, ya sea recién obtenido, seco, seco y esterilizado, los recuentos celulares son aproximadamente equivalentes, basándose en la absorción nuclear de la tinción de ADN con DAPI). Sin embargo, la liofilización del tejido microvascular reduce de forma significativa la capacidad de las células en el tejido microvascular para excluir el azul de tripano. La liofilización induce aproximadamente una reducción de un 70 % en el porcentaje de células viables. La exposición a la radiación redujo adicionalmente la viabilidad, de modo que solo aproximadamente un 2 % de las células en el tejido microvascular eran viable. Además, cuando se analizaron para células madre mesenquimales funcionales (usando un ensayo establecido de unidad formadora de colonias - fibroblastos (CFU-F)), no se detectaron células madre mesenquimales funcionales en las preparaciones liofilizadas o liofilizadas/esterilizadas.

De manera interesante, a pesar del número de células sin cambios y la reducción de la viabilidad, los diversos métodos de procesamiento alteraron el fenotipo de las células. Como se muestra en la Tabla 17, el colágeno de Tipo IV aumentó de forma moderada (en comparación con una preparación recién preparada) en el tejido microvascular liofilizado/esterilizado. Estos datos sugieren que el tejido microvascular liofilizado/esterilizado puede ser muy adecuado para la reparación de tejidos blandos, debido al menos en parte a su aumento de la densidad de colágeno. Los materiales a base de colágeno se han sometido a ensayo para su uso en ingeniería tisular, sin embargo, el tejido microvascular que se describe en el presente documento es particularmente ventajoso debido a la fácil disponibilidad del material y el aumento de su "severidad" (que se discute a continuación). Cada uno de los marcadores establecidos de células madre hematopoyéticas CD31 (células madre hematopoyéticas), CD34 (células madre de médula ósea/hematopoyéticas), CD44 (células similares a células madre cancerosas) y CD45 (células madre hematopoyéticas) fueron esencialmente regulados de forma positiva como respuesta a la liofilización y a la esterilización. Por lo tanto, a pesar de una reducción casi completa de la viabilidad de las células en tejido microvascular liofilizado/esterilizado, cualquier célula restante tiene un aumento de la expresión de marcadores conocidos por que son expresados por células madre. Como tal, el tejido microvascular liofilizado/esterilizado puede ser más adecuado para regeneración tisular debido a esta mayor severidad (y los efectos indirectos que induce la mayor severidad, por ejemplo, reclutamiento paracrino de otras células endógenas que mejoran la reparación, liberación de factores de crecimiento del tejido microvascular, etc.).

Los diversos tejidos microvasculares se evaluaron para su capacidad para reclutar otros tipos de células. El reclutamiento de células puede mejorar la reparación o regeneración de tejido dañado o enfermo mediante una variedad de mecanismos. Por ejemplo, el reclutamiento de células endoteliales puede mejorar la formación de vasos sanguíneos, mejorando de ese modo el suministro de sangre que facilita la formación de nuevos tejidos. El reclutamiento de células madre endógenas puede iniciar una cascada de sucesos que fomentan el crecimiento de tejido nuevo y/o reparación del tejido dañado existente. Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se marcaron con Dil y se colocaron en la parte superior de las placas Transwell con varios tipos de tejido microvascular en los pocillos del fondo. Se hizo el recuento del número de células HUVEC que atravesaron la membrana intra-pocillo para cada tipo de tejido microvascular después de 48 horas y se comparó con el medio de cultivo solo o medios suplementados con factor de crecimiento epidérmico (EGF) como controles. La Figura 10 representa los resultados. Se detectó poca migración de células HUVEC como respuesta a los medios solos. El EGF, que se establece como un inductor de la migración HUVEC dio como resultado una migración aproximadamente 10 veces mayor que solo los medios. El tejido microvascular recién aislado ("digerido" en la Figura 10) indujo una migración ligeramente menor que el EGF, y la fracción liofilizada indujo una migración incluso menor (aunque fue aún mayor que el medio solo). De forma inesperada, el tejido microvascular liofilizado/esterilizado indujo una migración casi 2 veces más elevada en comparación con EGF, y casi 20 veces más que el medio solo. Por lo tanto, el secado y la esterilización del tejido microvascular mejoran de forma significativa su capacidad para reclutar células *in vitro*. El aumento de la disponibilidad, en varias realizaciones, proporciona, al menos en parte, un aumento de la reparación y/o regeneración tisular *in vivo*.

Ese aumento de la reparación *in vivo* se corroboró al demostrar que el tejido microvascular liofilizado/esterilizado induce un restablecimiento más robusto y rápido del flujo sanguíneo al tejido que se convirtió en isquémico. Los

ratones SCID se sometieron a ligadura unilateral y sección transversal de la arteria femoral de acuerdo con métodos establecidos para replicar la isquemia (una afección que conduce a un daño tisular grave). El tejido microvascular se procesó de diversas maneras y se introdujo en la extremidad isquémica los días 0, 3 y 7, y se tomaron imágenes de los ratones con láser Doppler en los días 0, 7 y 14. Como se muestra en La Figura 11, los animales de control a los que se les inyectó solución salina muestran poco restablecimiento del flujo sanguíneo (la extremidad isquémica se designa con una flecha) después de 7 o 14 días. Por el contrario, el tejido microvascular liofilizado dio como resultado un restablecimiento al menos parcial del flujo sanguíneo en 14 días. Sin embargo, el tejido microvascular liofilizado/esterilizado dio como resultado aumentos significativos en el flujo sanguíneo en 7 días, con el flujo sanguíneo a los 14 días siendo en gran parte indistinguible de la extremidad de control contralateral. Estos datos corroboran los datos de migración *in vitro* e indican que, en varias realizaciones, el tejido microvascular liofilizado/esterilizado puede mejorar el restablecimiento del flujo sanguíneo.

En varias realizaciones, el restablecimiento del flujo sanguíneo se debe, al menos en parte, a la formación de nuevos vasos sanguíneos, incluyendo los vasos pequeños (por ejemplo, microvasculatura), vasos medianos y vasos de gran diámetro (por ejemplo, aquellos que son proveedores principales de sangre a un tejido). Matrigel (0,5 ml) se mezcló con solución salina o tejido microvascular (humano) para generar un implante de tejido microvascular, que se inyectó por vía subcutánea en ratones SCID. Después de 14 días, los implantes se retiraron, se fijaron y se tiñeron con el anticuerpo fluorescente a-CD31. Los vasos sanguíneos que se habían infiltrado en los implantes se dimensionaron y se hizo su recuento con un microscopio. Las desviaciones estándar fueron un 12-30 % del promedio de recuentos/campo. Se sometieron a ensayo 2 dosis de tejido después de cada etapa de procesamiento. No se encontraron células CD31+ humanas.

La Figura 12 resume los datos relacionados con la infiltración de diversos tamaños de vasos después de los implantes de tejido microvascular que tienen varios números de células y que se procesaron de diferentes maneras. El Matrigel dio como resultado aproximadamente 35 vasos por campo, la mayoría de los cuales eran pequeños. El implante de tejido microvascular liofilizado con aproximadamente 50.000 células proporciona un aumento de la infiltración, con una generación más robusta de vasos de tamaño mediano. El implante de tejido microvascular liofilizado con aproximadamente 500.000 células de cómo resultado una generación de vasos aún mayor, con un aumento esencial en el número de vasos de gran diámetro. El implante de tejido microvascular liofilizado/esterilizado con aproximadamente 50.000 células dio como resultado un aumento en el número de vasos en comparación con el control, con cierta generación de vasos grandes. El implante de tejido microvascular liofilizado/esterilizado con aproximadamente 500.000 células dio como resultado una generación de vasos significativa, aproximadamente dos veces mayor que el control. De forma interesante, en comparación con la dosis de 50.000 células, el número de células más grande, a pesar de la viabilidad de casi cero, proporciona un número de vasos de diámetro grande. Por lo tanto, parece que la administración de tejido microvascular procesado, ya fuera liofilizado o liofilizado/esterilizado, estimula la formación de vasos de mayor diámetro. Estos datos respaldan aún más la capacidad del tejido microvascular para aumentar la migración y/o formación de vasos sanguíneos, que es un aspecto importante en la reparación del tejido. Además, en varias realizaciones, la generación de vasos sanguíneos de diversos tamaños garantiza que no solo haya una capacidad adecuada para transportar sangre desde las ramas principales del sistema circulatorio hasta el tejido diana (gran diámetro), sino que la sangre se pueda distribuir de manera eficaz en todo el tejido diana, incluso a partes interiores (vasos medianos y pequeños).

Tomados en conjunto, estos datos indican que el tejido microvascular tiene la capacidad de inducir angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo*. Como tal, el tejido microvascular es un mecanismo muy atractivo mediante el cual se puede establecer reparación y/o regeneración tisular, basándose en su capacidad para mejorar la angiogénesis, lo que facilitará y/o mantendrá la reparación y/o regeneración tisular al garantizar un suministro adecuado de sangre y flujo de nutrientes/oxígeno.

Además, el tejido microvascular se evaluó por su capacidad para mejorar la reparación de hueso y cartílago. Con respecto a un hueso, se perforaron defectos de tamaño crítico de 8 mm x 2 cm en la metafisis distal de cabras maduras. Los armazones tisulares (BIOFIBER, Tornier) se enrollaron firmemente y se insertaron solo en los defectos, incluyendo el tejido microvascular (volumen de 1 ml, $\sim 10^6$ células). Las células se cargaron simplemente añadiendo 1 ml de agua al vial, agitando brevemente, luego añadiendo mediante goteo el contenido en un armazón y esperando 5 min para que se uniera. A las 12 semanas, los defectos se sometieron a ensayos de compresión y se descalcificaron para histología.

Las Figuras 13A-13C muestran datos relacionados con la reparación de defectos óseos. La Figura 13A muestra la resistencia, módulo elástico y dureza de hueso reparado en comparación con el control contralateral. El uso del armazón solo dio como resultado el hueso dañado con aproximadamente un 20 % de la resistencia y módulo elástico del puesto de control, y prácticamente un 50 % de la dureza del hueso de control. Cuando el armazón se suplementó con un tejido microvascular liofilizado/esterilizado, cada uno de resistencia, módulo elástico y dureza aumento con respecto al armazón solo. Por lo tanto estos datos indican que el uso de tejido microvascular facilita la reparación del daño al hueso. Las Figuras 13B y 13C, muestran histología representativa de huesos tratados con el armazón solo y huesos tratados con el armazón suplementado con tejido microvascular. La Figura 13B (armazón solo) muestra una cierta formación inicial de osteofitos en la unión entre el hueso y el armazón de fibra que se puso dentro del defecto. Esto sugiere que el armazón de fibra establece al menos una cierta reparación del hueso, tal

como se pone en evidencia con los datos de la Figura 13 A. En la Figura 13C, la histología sugiere que la adición del tejido microvascular liofilizado/esterilizado dio como resultado una buena formación de hueso en los bordes del armazón. Por lo tanto, dentro del mismo periodo de tiempo, tejido microvascular facilita la formación de hueso, en lugar del precursor desmineralizado para hueso. Esto sugiere que el uso de tejido microvascular en conjunto con un armazón puede acelerar el proceso de curación.

Con respecto a la reparación del cartílago, se perforaron defectos de tamaño crítico de 4 mm x 7 mm en el cartílago en el surco medular troclear de las cabras maduras. Los defectos tenían aproximadamente 1 mm de profundidad, y es un poco más profundo que el cartílago. Los armazones de tejido (BIOFIBER, Tornier) solos o suplementados con tejido microvascular liofilizado/esterilizado ($\sim 10^6$ células) se ajustaron a los defectos y se mantuvieron en el lugar con una sutura de nailon 7-0 en cada esquina. Después de 3 meses los defectos se examinaron histológicamente. Estos datos se muestran en las Figuras 14A-14H. Las Figuras 14A-14D muestran datos del armazón solo, mientras que las Figuras 14E-14H muestran datos del armazón suplementado con tejido microvascular. La Figura 14A muestra una vista macroscópica del Armazón sobre el cartílago previamente dañado, mientras que la Figura 14E muestra la misma vista para el armazón suplementado con tejido microvascular. Ambos grupos de tratamiento mostraron evidencias de reparación. Las Figuras 14B y 14F muestran tinción del cartílago con hematoxilina y eosina. El uso del armazón que incluye tejido microvascular mostró una mejora del relleno en los márgenes de llenado en comparación con el uso del armazón solo. Las Figuras 14C y 14G muestran tinción con safranina O, y desvelan un mayor grado de proteoglicanos y retención en los defectos tratados con tejido microvascular. Las Figuras 14D y 14H muestran tinción de los defectos con azul de toluidina, y desvelan que la matriz de cartílago recién generada se tiñe más como cartílago maduro cuando se usó tejido microvascular para tratar el defecto. En conjunto, estos datos, al igual que en los experimentos anteriores con huesos, confirmaron que el tejido microvascular facilita la reparación del cartílago.

También se realizaron experimentos para evaluar la capacidad del tejido microvascular para reparar el tendón. Los tendones de Aquiles de rata se expusieron y se erosionaron con pinzas con dientes de ratón. Los controles fueron operados de la misma manera. Un grupo de ratas se trato con armazón solo y otro con armazón suplementado con tejido microvascular liofilizado/esterilizado. Las ratas se sacrificaron para qPCR, histología e inmunohistoquímica después de 7 días. El grupo de Armazón recibió un Armazón de BIOFIBER-CM de 4 mm X 7 mm en la superficie anterior del tendón Aquiles. El armazón se cargó con 106 células microvasculares en el tejido microvascular y en el grupo de tratamiento. Los datos de control se muestran en las Figuras 15A (tinción con tricromo de Masson) y 15B (inmunohistoquímica con tenascina). Los datos para el grupo de armazón se muestran en las Figuras 15C y 15D. La tinción con tricromo de Masson (Figura 15C) desveló pequeños bolsillos de colágeno denso en y alrededor del armazón, lo que indica reparación inicial del tendón. De forma análoga, la tinción inmunohistoquímica con tenascina (Figura 15D) desveló aumentos en la expresión en el margen entre el tendón y el armazón implantado, lo que nuevamente sugiere una reparación inicial del defecto.

Los datos para el grupo microvascular del tejido se muestran en las Figuras 15E y 15F. La tinción con tricromo de Masson (15E) desveló una formación esencial de colágeno denso en y alrededor del armazón, lo que indica una reparación del defecto considerable. De forma análoga, la tinción inmunohistoquímica con tenascina desveló una amplia expresión entre el tendón y el armazón implantado. Estos datos también son indicativos de una reparación significativa del defecto.

Tomados en conjunto, los datos presentados en estos experimentos establecen que el tejido microvascular es capaz, no solamente de angiogénesis (que desempeña un papel importante en el establecimiento y mantenimiento del suministro sanguíneo a un tejido diana), sino que también son capaces de aumentar la reparación de hueso, cartílago, y tendón. En varias realizaciones, el aumento de la angiogénesis, al menos en parte, desempeñe un papel en la capacidad del tejido microvascular para dar como resultado la generación y mantenimiento de tejido nuevo.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende tejido microvascular procesado,
5 en la que el tejido microvascular procesado comprende células multipotentes aisladas o una membrana celular
obtenida a partir de o derivada de células multipotentes o del tejido microvascular,
en la que la composición tiene actividad angiogénica o antiinflamatoria,
en la que la composición se esteriliza mediante irradiación y los virus dentro de la composición se inactivan, y
10 en la que la esterilización por irradiación se realiza por exposición de la composición a radiación gamma o radiación
de haz electrónico a una dosificación en el intervalo de 0,5 Mrad a 5,0 Mrad.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que las células o tejidos no se han cultivado.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que una cantidad inferior o igual a un 50 % de las células presentes
15 en la composición son viables.
4. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición retiene una actividad angiogénica o
antiinflamatoria mensurable cuando se almacena aproximadamente a temperatura ambiente durante al menos un
mes.
- 20 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición se seca, se liofiliza o se
crioconserva.
6. La composición esterilizada de la reivindicación 1, en la que la composición no comprende ninguna célula viable.
- 25 7. Un recipiente impermeable a la humedad que comprende la composición de la reivindicación 1, en el que la
composición retiene una actividad angiogénica o antiinflamatoria mensurable cuando se almacena aproximadamente
a temperatura ambiente durante al menos un mes y en el que la composición se seca.
8. El recipiente impermeable a la humedad de la reivindicación 7, en el que:
- 30 (a) las células o tejidos no se han cultivado; o
(b) una cantidad inferior o igual a un 50 % de las células presentes en la composición son viables.
9. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 para uso en el tratamiento o la prevención de una
35 lesión o enfermedad, o para estimular la regeneración tisular, en un mamífero.
10. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la composición es adecuada para
implante quirúrgico en el mamífero.
- 40 11. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la composición es adecuada para
administración intravenosa al mamífero.
12. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la composición es adecuada para
administración tópica.
- 45 13. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la composición es adecuada para
tratamiento de una lesión y en la que la lesión está presente en un tendón, un ligamento, piel, un hueso, un cartilago,
un disco, o tejido microvascular.
- 50 14. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la composición es adecuada para
tratamiento de una enfermedad y en la que la enfermedad es artritis.

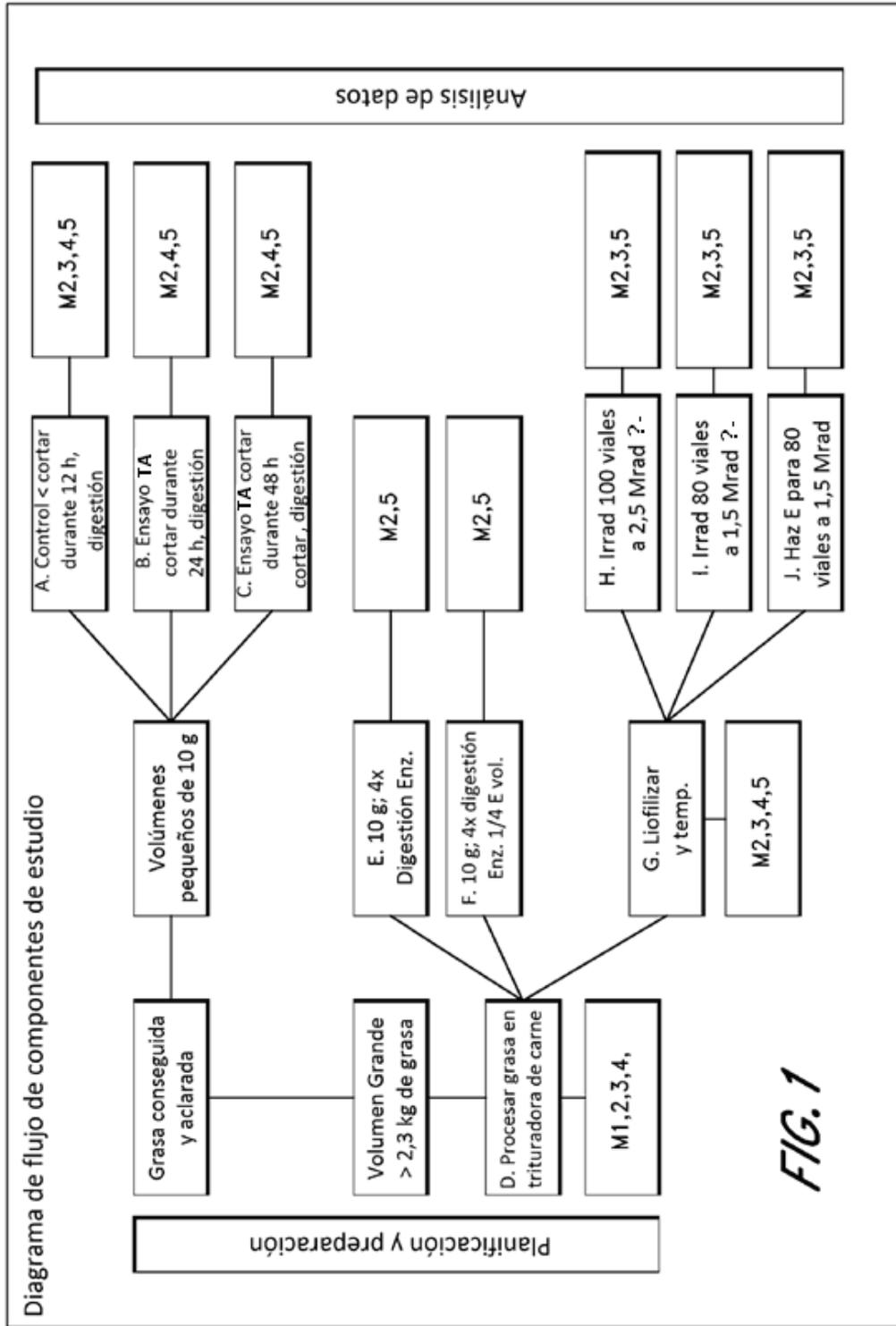


FIG. 1

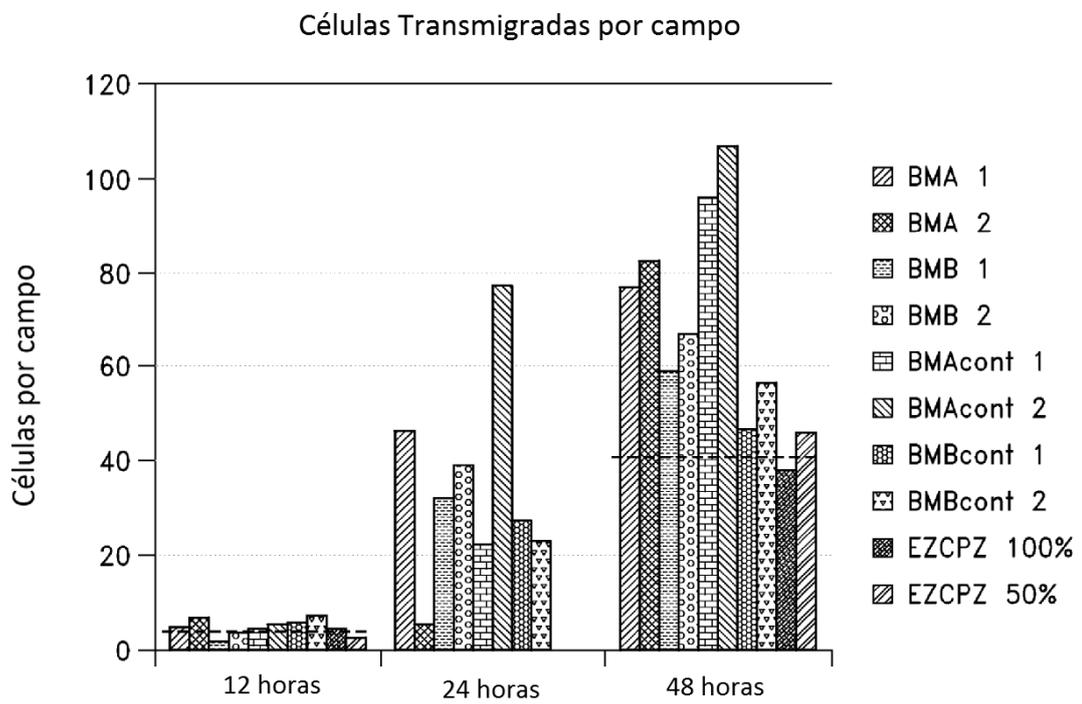


FIG.2

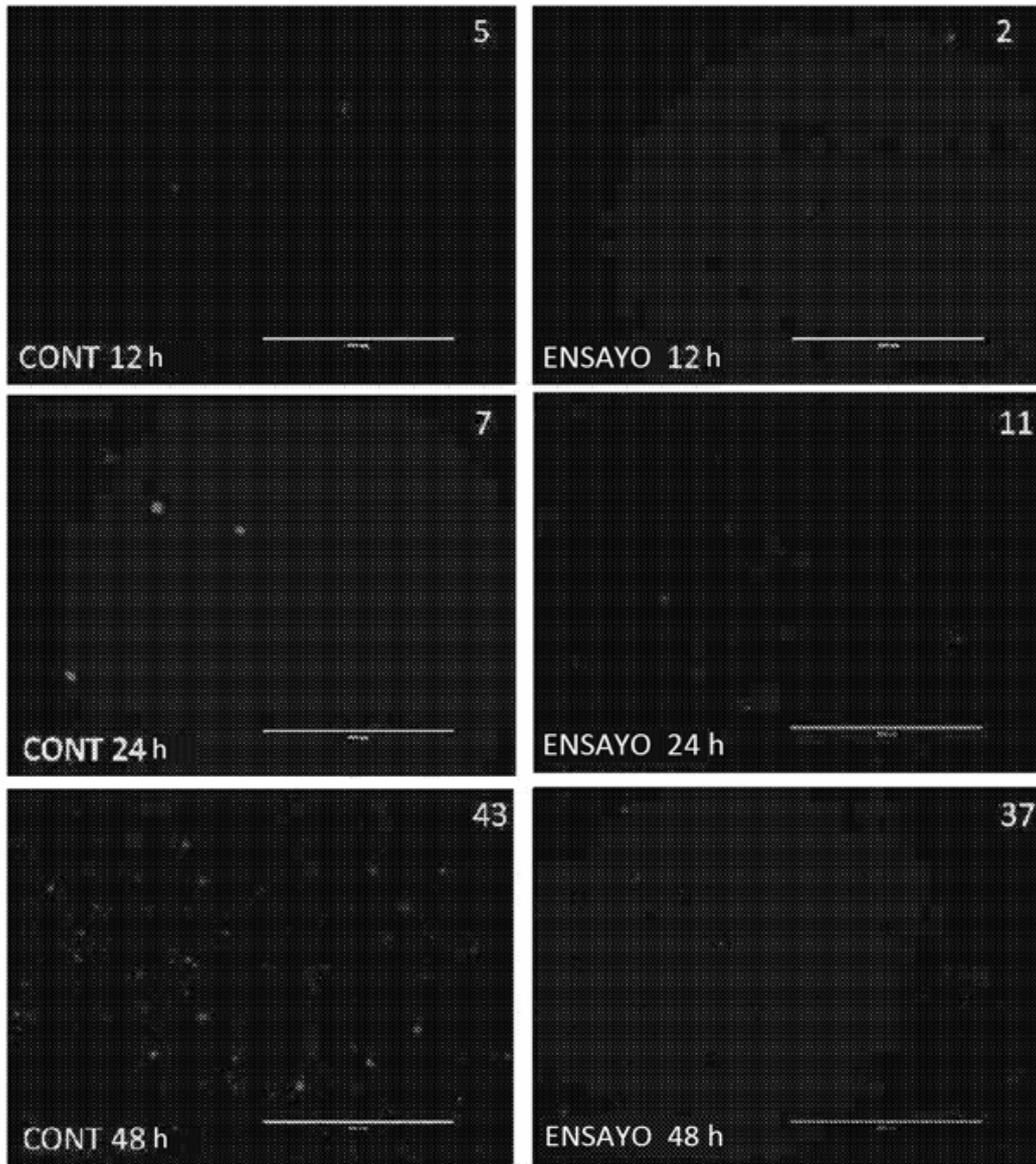


FIG. 3

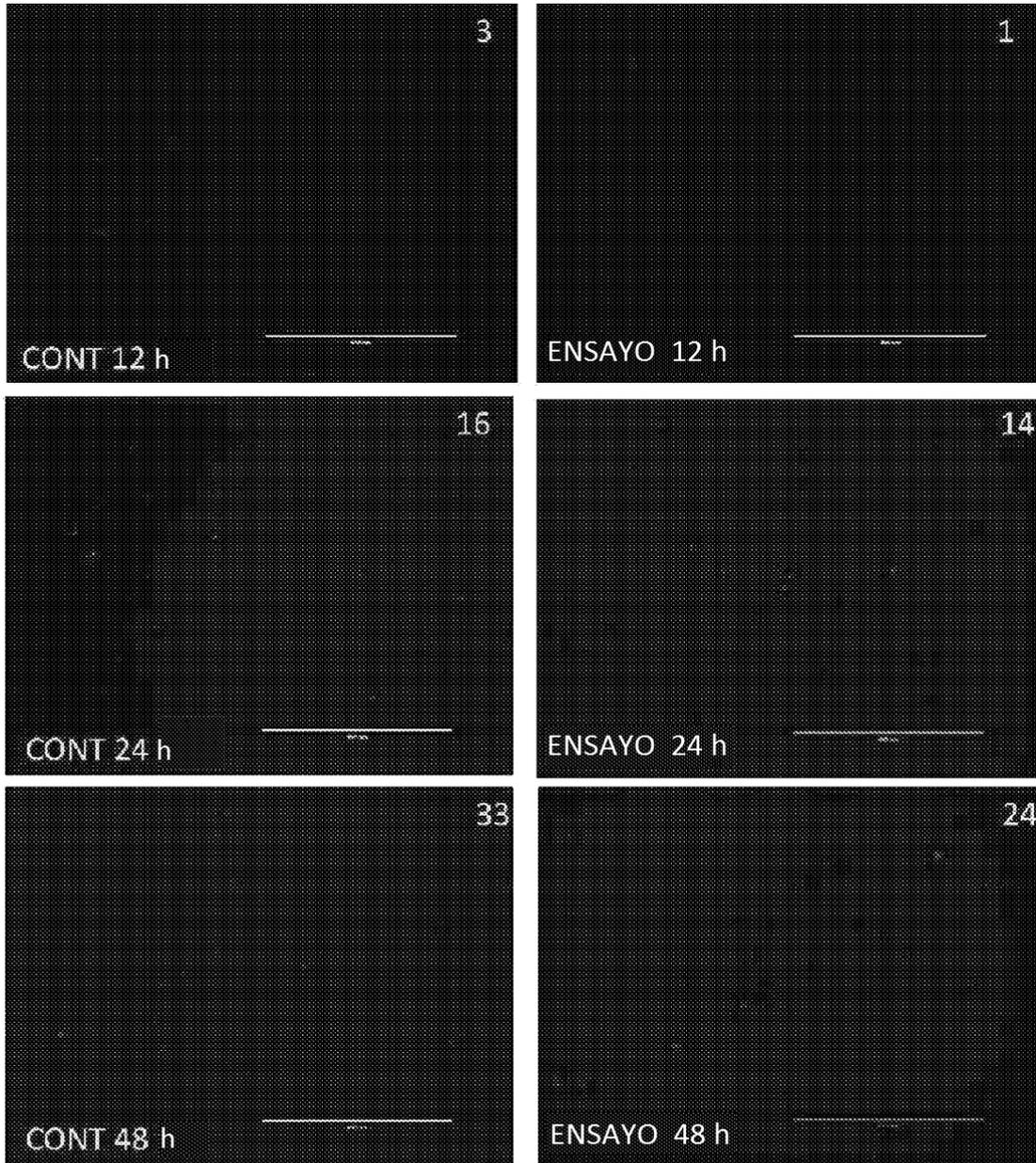


FIG. 4

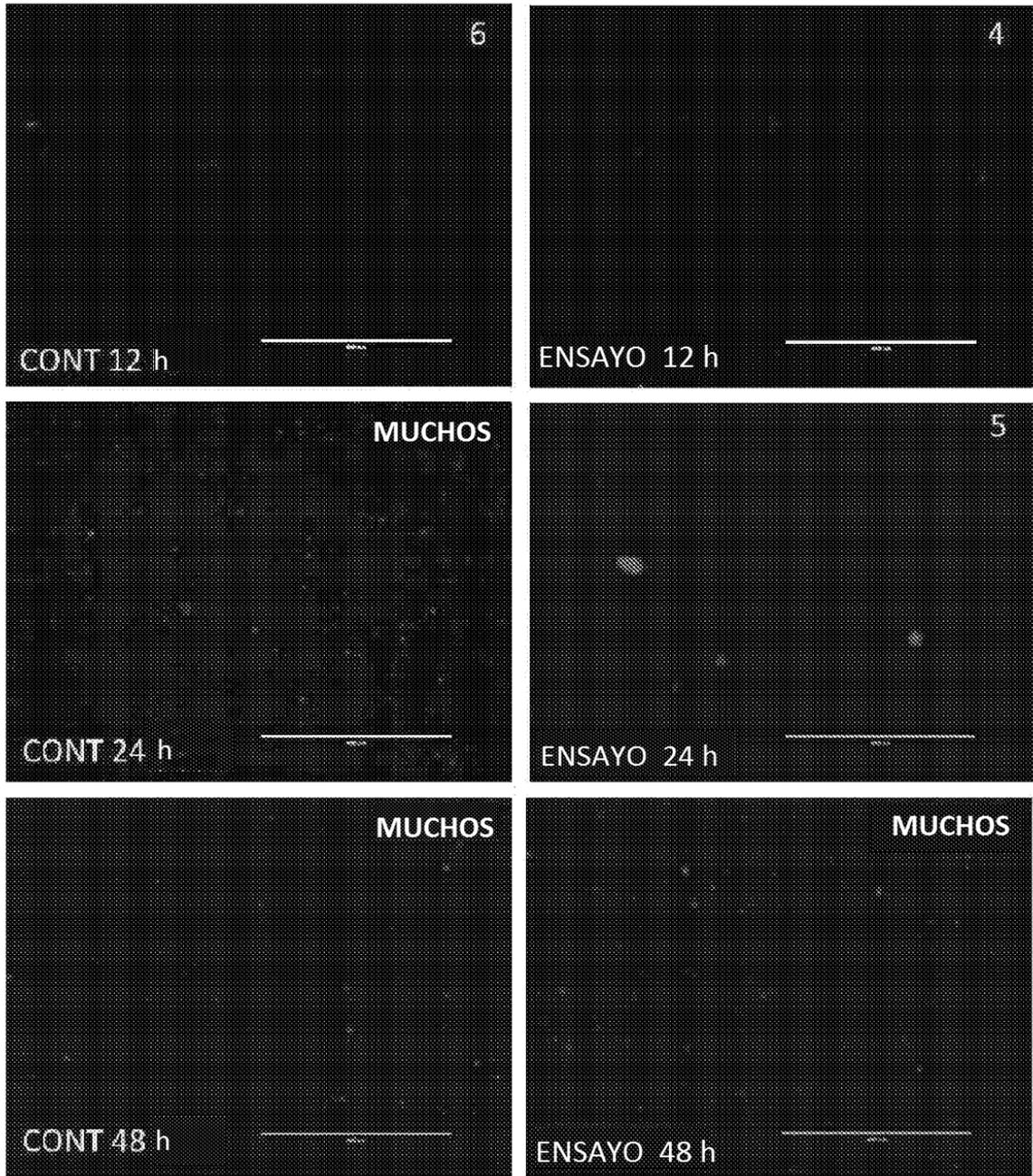


FIG.5

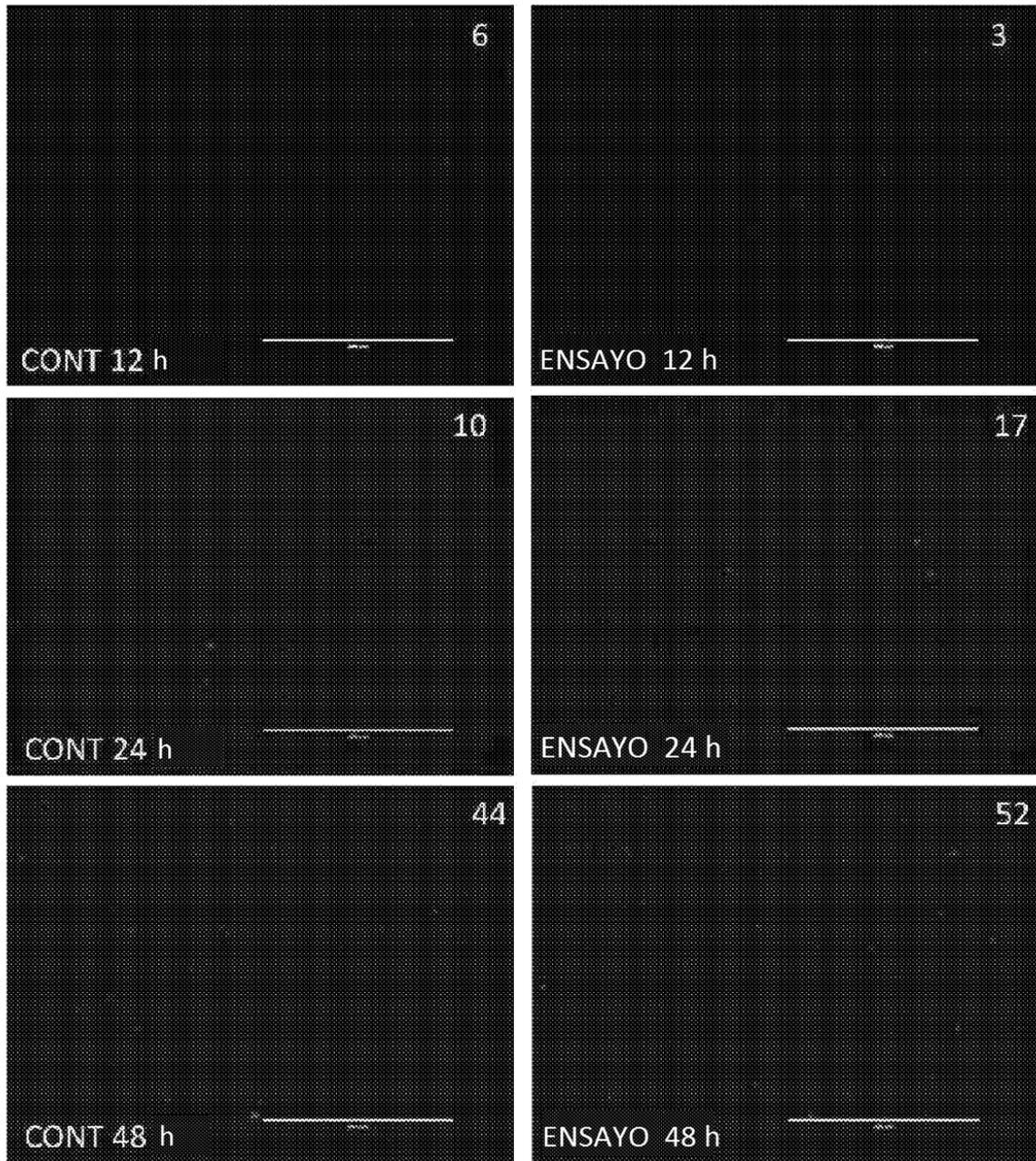


FIG. 6

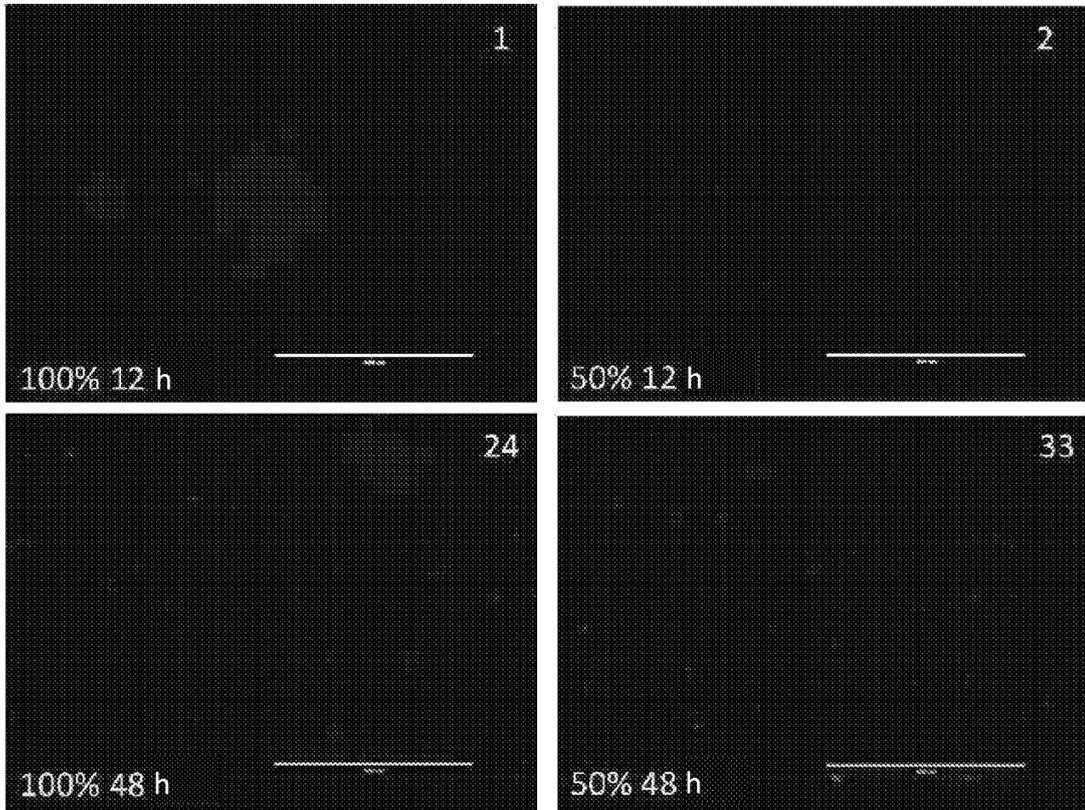


FIG. 7

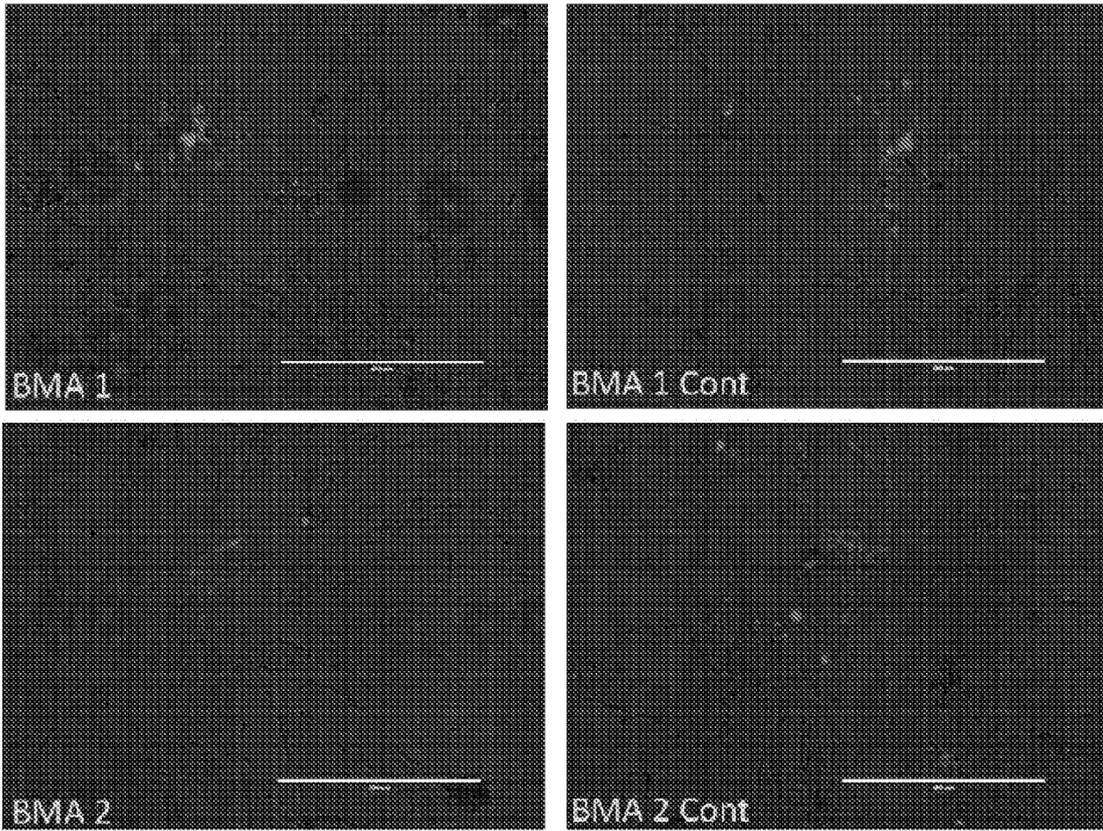


FIG. 8

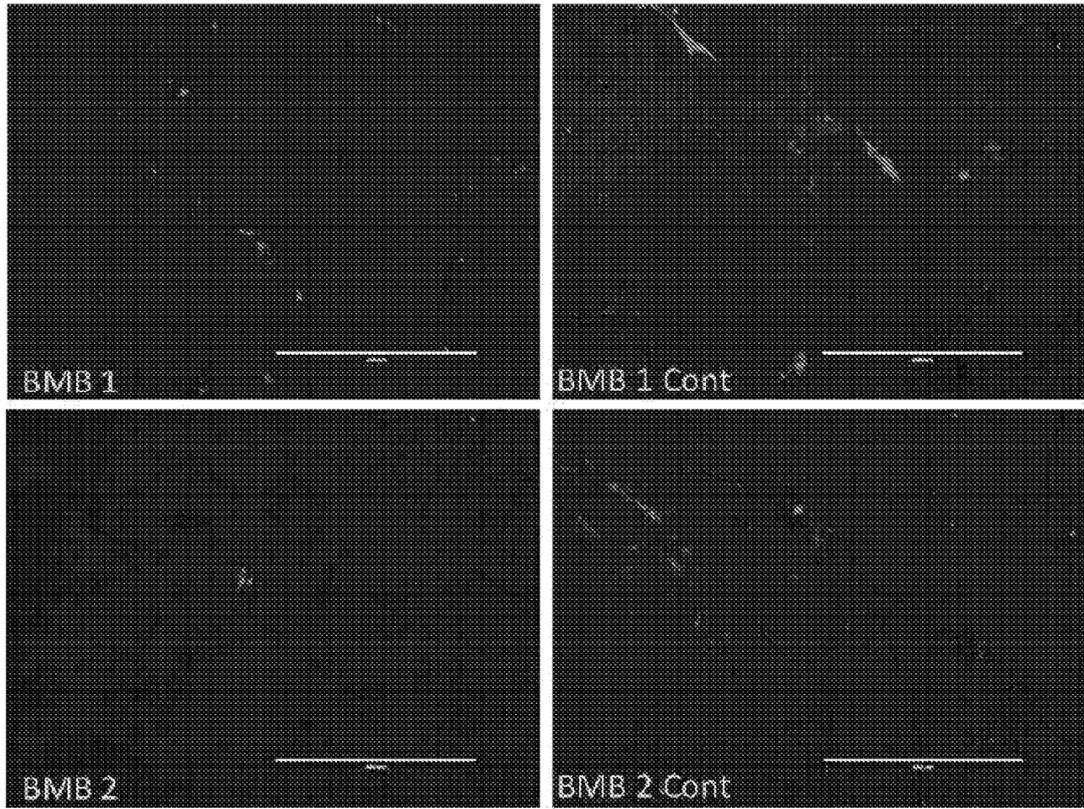


FIG. 9

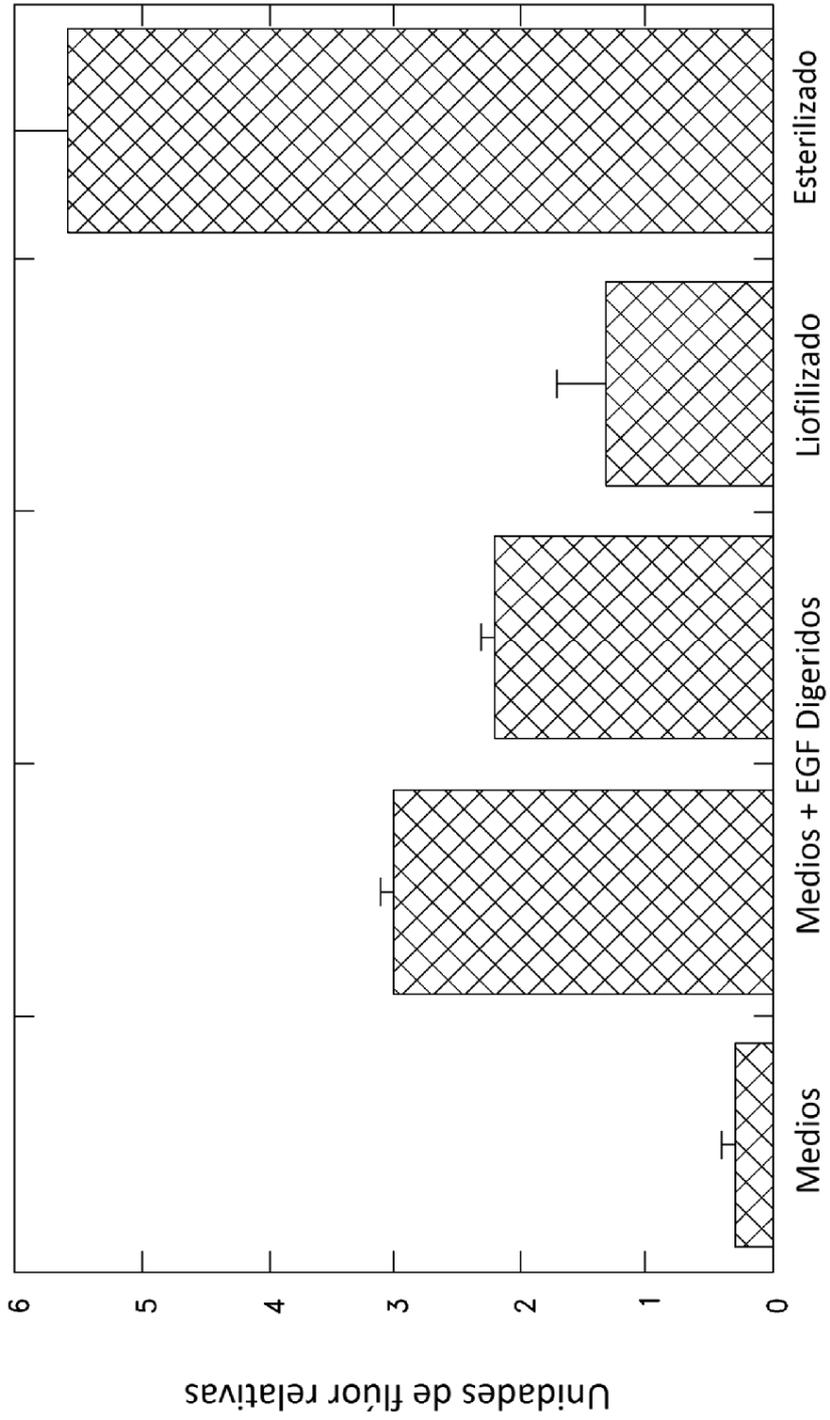


FIG. 10

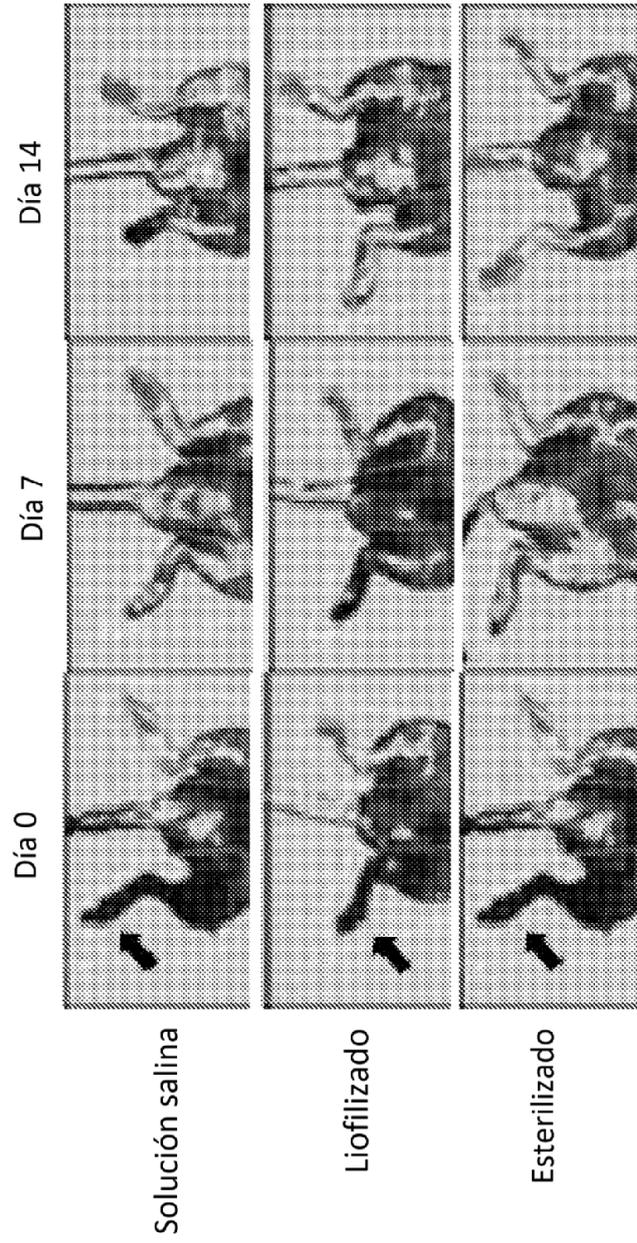


FIG. 11

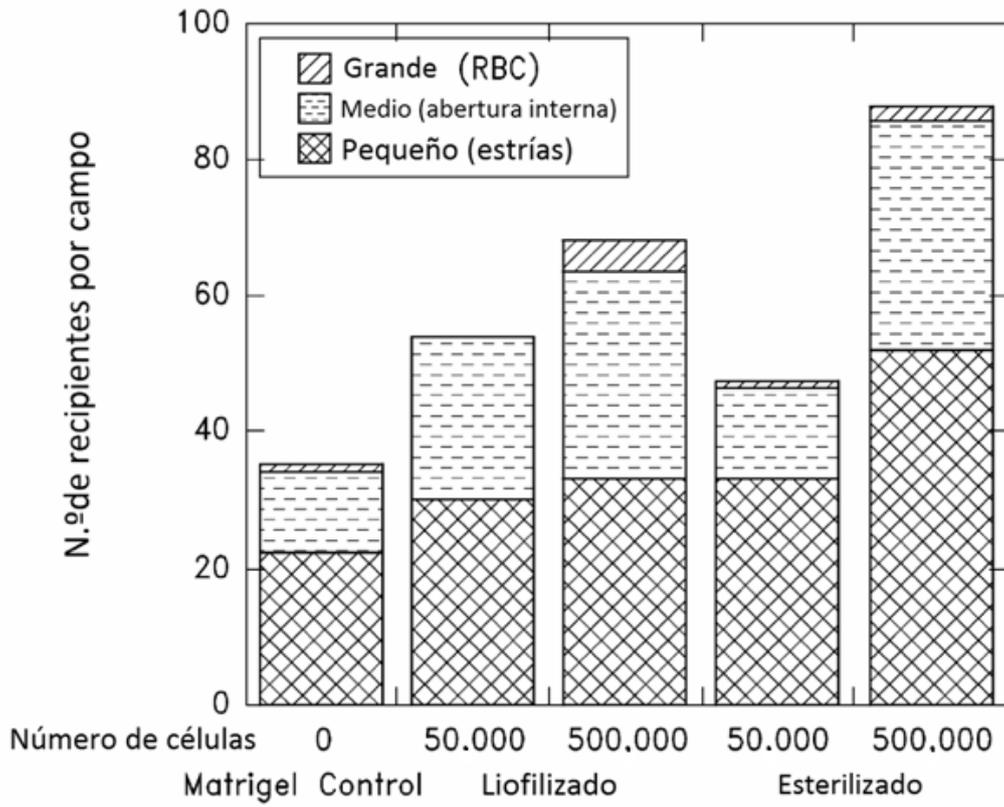


FIG. 12

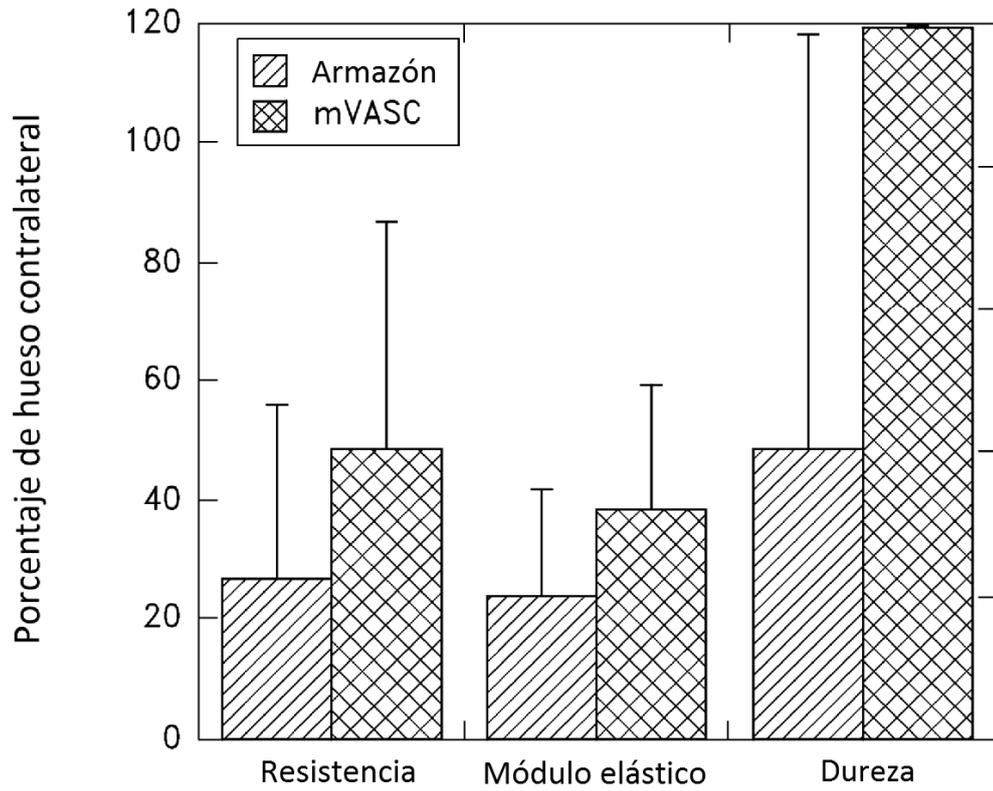


FIG. 13A

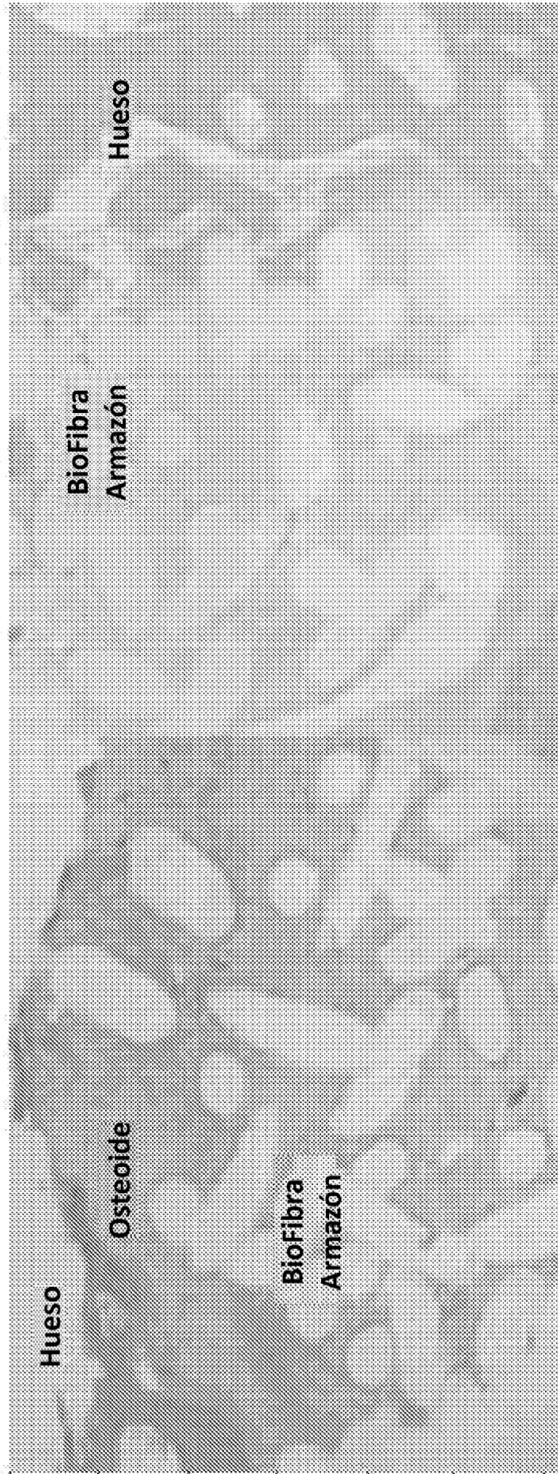


FIG. 13B

FIG. 13C

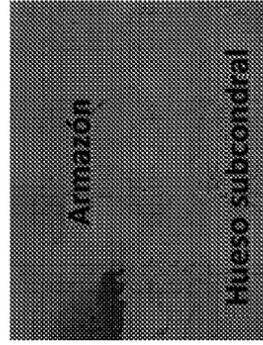


FIG. 14D

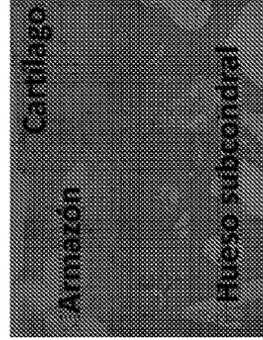


FIG. 14C

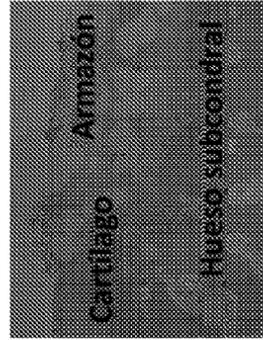


FIG. 14B

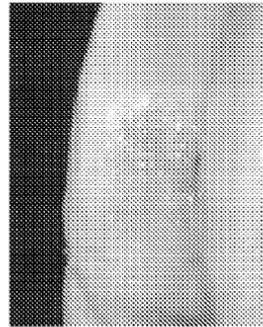


FIG. 14A

Armazón



FIG. 14H

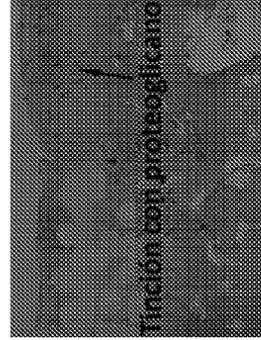


FIG. 14G

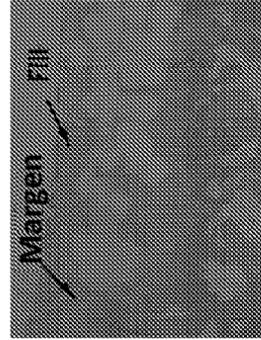


FIG. 14F

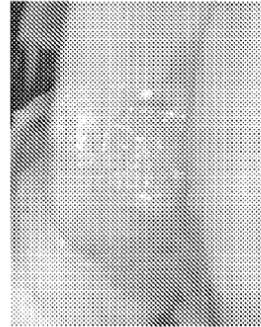


FIG. 14E

+mVASC

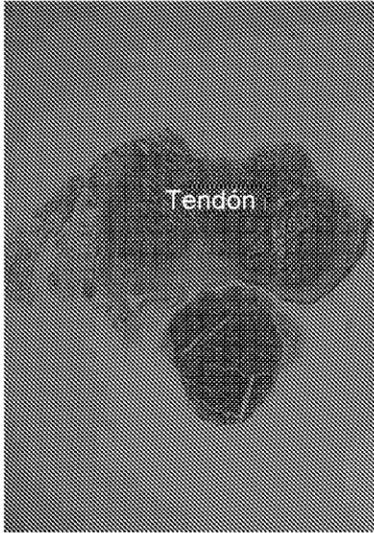


FIG. 15A

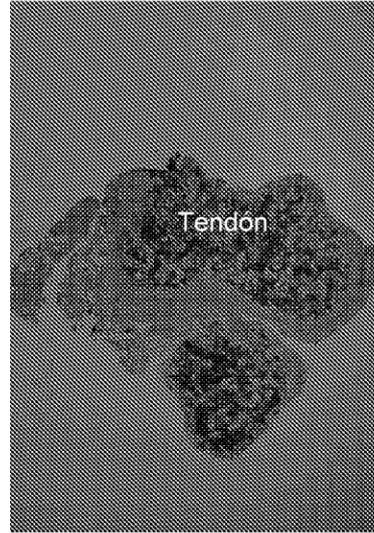


FIG. 15B



FIG. 15C

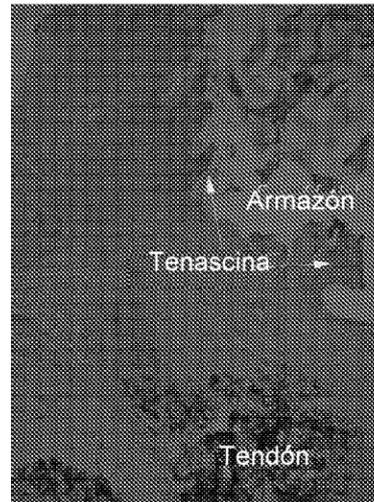


FIG. 15D

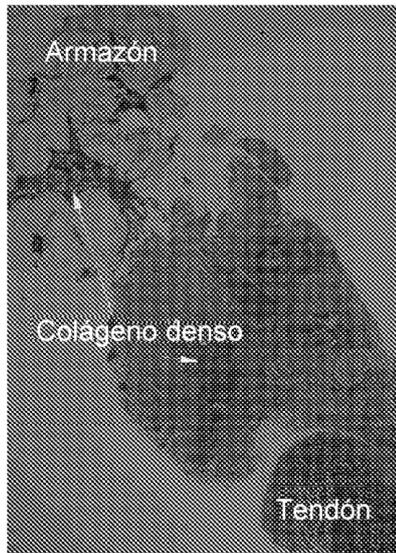


FIG. 15E

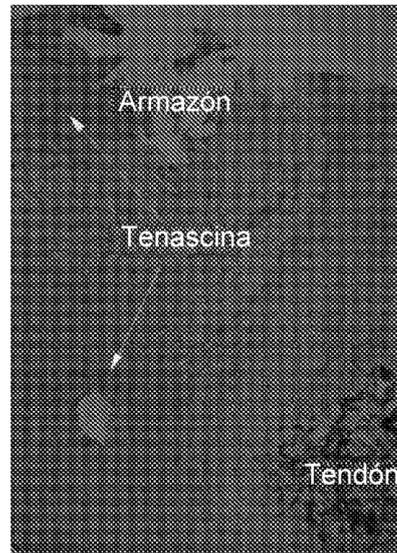


FIG. 15F