



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 271 612**

(51) Int. Cl.:

A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

A61K 49/04 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03741809 .2**

(86) Fecha de presentación : **22.05.2003**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1506027**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2005**

(54) Título: **Fluido de distribución de células para prevenir la sedimentación de células en sistema de distribución.**

(30) Prioridad: **22.05.2002 US 382764 P**
21.05.2003 US 442525

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

(73) Titular/es: **MEDTRONIC, Inc.**
710 Medtronic Parkway Northeast
Minneapolis, Minnesota 55432, US

(72) Inventor/es: **Morris, Mary, M.;**
Fernandes, Brian, C., A.;
Spear, Stanton, C.;
Bergan, Matthew, A. y
Gardeski, Kenneth, C.

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 271 612 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

Fluido de suministro de células para evitar la sedimentación celular en el sistema de suministro.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un medio de vehículo de suministro de células relacionado con un dispositivo médico, y métodos para fabricar composiciones farmacéuticas para suministrar células para generar crecimiento tisular.

10 **Antecedentes de la invención**

Previamente ha habido interés en el suministro de células a localizaciones en el interior del cuerpo de mamíferos para conseguir nuevo crecimiento de tejido. Esta tecnología está diseñada para promover el crecimiento de tejido nuevo a partir de células implantadas, a menudo originadas a partir del mismo mamífero que recibe las células, y está diseñado para generar tejido nuevo en la región de implante. Se pueden implantar diversos tipos de tejido, incluyendo por ejemplo hueso, cartílago, músculo y otros tipos.

El tejido cardíaco también ha sido el sujeto de intentos de suministro de células para reparar las paredes cardíacas y otras regiones gravemente dañadas por infartos de miocardio o fallo cardíaco congestivo. Un ejemplo de tal uso incluye mioblastos procedentes de músculo esquelético o células madre suministradas quirúrgicamente al miocardio del paciente para regenerar el tejido dañado, promover la revascularización y la angiogénesis. Las concentraciones de volumen de células deseadas por suministro varían de acuerdo con las indicaciones, pero no es infrecuente tener de decenas a cientos de millones de células que se pretenden suministrar a uno o más sitios.

25 **Breve resumen de la invención**

La invención implica el reconocimiento del problema de la sedimentación celular durante el intento de suministro de células a las localizaciones designadas evitando de este modo que se suministren las concentraciones pretendidas de células. Un método para superar este problema y los suministros inexactos posteriores es proporcionar un método para preparar una suspensión líquida de vehículo de células para el implante en un mamífero, que evite la sedimentación de las células. El método implica seleccionar un tipo celular para el implante en un mamífero e identificar la densidad relativa del tipo celular. Después se selecciona un líquido de vehículo que tenga una densidad relativa dentro de un intervalo de densidades relativas. Esto posibilita una coincidencia aproximada de la densidad relativa con el tipo celular seleccionado, de forma que las células no tiendan a flotar o a sedimentar, pero se mantengan en suspensión para permitir el suministro de una proporción aceptable de células a uno o más destinos de suministro en el mamífero. Además se desea asegurar que el líquido identificado tenga una osmolalidad y un pH apropiados para asegurar una tasa de viabilidad aceptable de las células en el destino de suministro. Mezclando el líquido de vehículo y las células en una suspensión líquida apropiada, es posible conseguir un suministro más preciso y uniforme de la cantidad pretendida de células específicas a un sitio específico, de forma percutánea o quirúrgica.

También se proporciona una suspensión líquida de vehículo de células para su suministro en el tejido de un mamífero, en la que la densidad de un componente del fluido de vehículo coincide con la densidad de las células de interés. Por consiguiente, la suspensión líquida de vehículo de células proporciona una suspensión líquida formadora de tejido con mayor eficacia en el tratamiento de tejido defectuoso.

45 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es un gráfico de proporciones de recuento de células de la parte superior y del fondo.

La Figura 2 es un gráfico de una proporción de los recuentos de células totales de la parte superior y del fondo.

La Figura 3 es un gráfico de la sedimentación celular de mioblastos.

La Figura 4 es una tabla de valores de catéter.

La Figura 5 consta de imágenes tomadas durante la sedimentación de las células.

La Figura 6 es una tabla de la dinámica de suministro para el suministro de células a través de catéteres.

Las Figuras 7A-H son fotografías SEM del interior de la luz de los catéteres.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona nuevos métodos para fabricar composiciones para el suministro preciso, predecible de células en suspensión a un sitio de suministro diana en un mamífero. Los métodos y composiciones contemplan el suministro de una cantidad más exacta y precisa de células y líquido de suspensión para hacer crecer tejido nuevo en las localizaciones diana. Tales células pueden incluir células miogénicas maduras (por ejemplo, miocitos esqueléticos, cardiomiocitos, células de Purkinje, fibroblastos), células miogénicas progenitoras (tales como mioblastos), células

maduras no miogénicas (tales como células endoteliales y epiteliales), células hematopoyéticas (monocitos, macrófagos, fibroblastos, células de islotes alfa, célula de islotes beta, células de sangre umbilical, eritrocitos, plaquetas, etc.) o células madre (células madre pluripotenciales, células madre mesenquimáticas, células madre endodérmicas, células madre ectodérmicas, sean adultas o embrionarias, o sean autólogas, alogénicas o xenogénicas). Más particularmente, las células que se pueden suministrar de acuerdo con esta invención incluyen adicionalmente células de islotes, hepatocitos, condrocitos, osteoblastos, células neuronales, células de glía, células de músculo liso, células endoteliales, mioblastos esqueléticos, células de núcleo pulposo, y células epiteliales. Cualquiera de los tipos celulares mencionados se puede manipular por ingeniería genética para que contenga ADN o ARN introducido en la célula mediante técnicas recombinantes. EL ADN o ARN introducido en la célula puede incluir, pero sin limitación, nuevos genes, promotores, ARN de interferencia, y similares. Por consiguiente, se puede formar el tejido produciendo nuevo crecimiento de cartílago, hueso, piel, capas del epitelio, nuevos órganos, tejido del sistema nervioso central, y músculo, incluyendo el tejido apropiado para la regeneración de ciertas funciones cardíacas. Se reconoce que los métodos y composiciones, junto con los aspectos esenciales de la invención, pueden permitir el suministro de numerosos tipos de células que se hayan enumerado anteriormente, por ejemplo, o no, de forma mucho más mejorada y con eficacia aumentada. Se reconoce que cualquiera de las células mencionadas anteriormente usadas junto con los fluidos de vehículo correspondientes con la densidad celular se pueden marcar o etiquetar con marcadores de radioisótopo, marcar por fluorescencia, marcar enzimáticamente, o usarse adicionalmente en combinación con marcadores de anticuerpos contra proteínas celulares específicas.

El desafío del suministro exacto de células (y los nutrientes que las acompañan) se ha abordado mediante el uso de una matriz de gel (o estructuras similares) como un medio de vehículo, tal como se muestra en las Patentes de Estados Unidos 6.71.610 B1; 6.129.761; 5.667.778. Típicamente, las células se colocan en suspensión en hidrogeles para estabilizar las células en el sitio de suministro. Sin embargo, surgen problemas del uso de los geles debido a la presión relativamente elevada requerida para inyectar los geles de elevada viscosidad a través de un catéter, que se considera generalmente un enfoque menos invasivo que un paso quirúrgico directo. Además, los geles utilizan material que tiene moléculas relativamente más grandes y viscosidades más elevadas que causa una tensión tangencial aumentada durante el suministro provocando mayor daño celular. Como alternativa, los geles suministrados quirúrgicamente o mediante endoscopia también tienen que compartir los factores de riesgo y las ineficacias relacionadas con esos procedimientos.

Otro tipo de medio de suministro de células es el mostrado en la Patente de Estados Unidos 5.543.316, que describe una composición inyectable comprendiendo mioblastos y un medio de calidad inyectable que tiene ciertos componentes concebidos para mantener la viabilidad de los mioblastos durante periodos prolongados de tiempo. La osmolalidad del medio es preferiblemente de aproximadamente 320 mOsm/kg a aproximadamente 550 mOsm/kg (por ejemplo, más preferiblemente seleccionado entre la osmolalidad de aproximadamente 250 mOsm/kg, aproximadamente 300 mOsm/kg, aproximadamente 350 mOsm/kg, aproximadamente 400 mOsm/kg, aproximadamente 450 mOsm/kg, aproximadamente 500 mOsm/kg, aproximadamente 550 mOsm/kg, aproximadamente 600 mOsm/kg, y similares). Esta técnica, combinada con los intentos de suministro de concentraciones celulares muy elevadas, representa otro método para superar los desafíos de la terapia de suministro de células eficaz.

La referencia anterior es un ejemplo de equivocación del pasado en referencia a las causas de las inexactitudes en el suministro de células. En el pasado se ha asumido que la muerte celular era la causa de los problemas del suministro de células, tal como la producida por la tensión tangencial inducida por una combinación de tiempo, presión, diámetro del lumen del vehículo de suministro, y el tamaño de las células que se administran. De lo que no se fue consciente fue que la sedimentación celular en soluciones líquidas era una causa importante de las inexactitudes en el suministro.

De lo que no se ha sido consciente o lo que no se ha identificado es una solución simple al problema de concentraciones celulares no uniformes que se suministra en un medio líquido. Los solicitantes han reconocido este problema y han identificado un medio de suministro de células que tiene características concebidas para superar este obstáculo para una terapia eficaz. El medio de suministro de células se hace coincidir en densidad con las células en su suministro. Por ejemplo, en un suministro mediante catéter transvenoso, se prefiere que el medio de suministro de células tenga una viscosidad lo suficientemente baja para que se pueda suministrar a presiones de menos de aproximadamente 689 kPa (100 psi) (incluyendo pero sin limitación presiones tales como aproximadamente igual a o menos de 552 kPa (80 psi), 483 kPa (70 psi), 414 kPa (60 psi), 276 kPa (40 psi), 241 kPa (35 psi), 138 kPa (20 psi) o 103 kPa (15 psi) y similares).

Los especialistas en la técnica reconocen que el diámetro interno (D.I.) del tubo de suministro afecta la dinámica de fluidos de las soluciones suministradas. Por ejemplo, en un catéter de diámetro interno de 0,305 mm (0,012 pulgadas) y longitud de 1,52 m (60 pulgadas) fue posible suministrar fácilmente un fluido de 1 centipoise pero no un fluido de 5 centipoise a las presiones usadas. En un ejemplo similar, en un catéter de diámetro interno de 0,432 mm (0,017 pulgadas) y longitud de 0,305 m (12 pulgadas) fue posible suministrar fácilmente fluidos de hasta e incluyendo 50 centipoise. Estas características optimizarán la viabilidad de las células, la facilidad del suministro para un médico, y el bienestar y la recuperación del paciente.

Se reconoce entonces que esos diversos diámetros internos de catéteres se pueden usar con soluciones de densidad celular seleccionada (incluyendo, pero sin limitación, 0,432 m (0,017 pulgadas), 0,406 m (0,016 pulgadas), 0,356 m (0,014 pulgadas), 0,343 m (0,0135 pulgadas), 0,305 m (0,012 pulgadas), 0,229 m (0,009 pulgadas) y similares). De forma similar, debido a la alta tasa de supervivencia demostrada para células en estas soluciones, se pueden usar índices de rotura mucho mayores de lo que se creía previamente que era posible, incluyendo pero sin limitación índices

iguales o mayores de 1000 l/s, 2000 l/s, 3000 l/s, 4000 l/s, 5000 l/s, 6000 l/s, 7000 l/s, 8000 l/s. Una característica de los fluidos de suministro de células descritos es que permiten que las células sobrevivan a tensiones de rotura mucho mayores en catéteres (incluyendo pero sin limitación igual o mayor que 1 N/m², 2 N/m², 3 N/m², 4 N/m², 5 N/m², 6 N/m² y similares). Los especialistas en la técnica reconocerían que la supervivencia de las células es proporcional a la tensión tangencial en el catéter y la cantidad de tiempo durante el que experimentan las tensiones de rotura eficaces. Se reconoce que el tiempo eficaz durante el que una célula experimenta una tensión tangencial eficaz en el catéter puede ser tan corto como aproximadamente 10 ms hasta más de 5000 ms (incluyendo intervalos de menos de 4000 ms, menos de 3000 ms, menos de 2000 ms, menos de 1000 ms). Por lo tanto, las tasas de supervivencia ideales para las células se pueden optimizar haciendo coincidir eficazmente los requisitos de suministro, la tensión tangencial, y el tiempo de suministro.

También se reconoce que pueden ser posibles viscosidades mayores con dispositivos de suministro de células mediante un enfoque quirúrgico más directo en dispositivos de suministro de longitud relativamente menor y posiblemente de un tamaño de luz mayor, y todavía disfrutar de los beneficios de esta invención. Sin embargo, un medio líquido de vehículo de células se tiene que hacer coincidir en densidad (o densidad relativa) con las células que transporta para resultados óptimos. Sin embargo, la presente invención puede usar vehículos que coinciden en densidad celular de forma menos óptima donde el uso de estos vehículos con las células suministradas mejorara al menos una dinámica de fluido que se puede medir en el catéter o al menos una medida de suministro eficaz. Consecuentemente con la anterior coincidencia de vehículos de densidad es que la solución de densidad celular puede estar en aproximadamente el 10%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 2%, aproximadamente el 1%, aproximadamente el 0,1%, aproximadamente el 0,01% de cualquier densidad celular dada. Los ejemplos conocidos de medios que pueden ser apropiados, con formulación apropiada, incluyen medio de mejora de imagen de marca Isovue (comercializado por Bracco Diagnostics), bromuro de perfluorooctilo (perflubron), conocido por el nombre de marca Oxygent (comercializado por Alliance Pharmaceuticals), soluciones de dextrano, tales como Dextran 40 I.P, Microspan 40 en solución salina normal, y MICROSPAN40 en dextrosa al 5% (fabricado por Leuconostoc mesenteroides).

En otra realización de la presente invención las soluciones coincidentes con la densidad de las células también pueden servir como agentes de mejora de imagen. Los agentes de mejora de imagen se pueden usar eficazmente para formar imágenes del fluido suministrado y para equilibrar la densidad de las células. Tales reactivos incluyen soluciones basadas en yodo (tales como yopamidol, comercializado como Isovue-300 por Bracco Diagnostics), gadodiamida (Ominiscan comercializado por Claris Life Sciences), e InFeD (hierro dextrano fabricado por Schein Pharmaceutical).

En otra realización más de la presente invención las soluciones coincidentes con la densidad de las células también se pueden marcar o etiquetar para ayudar a su detección. Varios de los reactivos mencionados son susceptibles de sintetizarse con elementos radiactivos o marcarse radiactivamente (por ejemplo, soluciones de glucosa marcadas con C¹⁴ o H³ radiactivos, Isovue radiactivo, reactivos con yodo radiactivo (I¹²⁵), y similares). Los agentes de mejora de imágenes se pueden usar eficazmente para formar imágenes del fluido suministrado y para equilibrar la densidad celular. Tales reactivos incluyen soluciones basadas en yodo (tales como yopamidol, comercializado como Isovue-300 por Bracco Diagnostics), gadodiamida (Ominiscan comercializado por Claris Life Sciences), e InFeD (hierro dextrano fabricado por Schein Pharmaceutical).

Están disponibles varias referencias para determinar la densidad celular. A continuación se enumeran algunos valores de densidad publicados para los tipos celulares dados:

Densidades Relativas de las Células

	glóbulos rojos	1,10
	células madre (células CD34)	1,065
	plaquetas	1,063
	monocitos	1,068
	linfocitos	1,077
	hepatocitos	1,07 - 1,10
	granulocitos	1,08 - 1,09

Los valores enumerados se dan como ejemplares y no limitantes, y se pueden determinar experimentalmente para la población celular relevante. Por ejemplo, el Percoll (un producto de Pharmacia) es un medio muy citado para la centrifugación de células en gradiente de densidad. El Percoll formará gradientes autogenerados durante la centrifugación de forma que las células mezcladas con Percoll antes de la centrifugación se dividirán en bandas de forma isopícnica según se forma el gradiente *in situ*. El Percoll se puede usar con gotas marcadoras de densidad (producto Sigma N° DMB-10) que se puede usar para encontrar densidades celulares.

Las células suministradas suspendidas en los vehículos descritos pueden variar ampliamente en la concentración celular eficaz real. La concentración celular puede variar de aproximadamente 1x10⁹ células por mililitro a aproximadamente 1x10⁶ células por mililitro (ml) (incluyendo aproximadamente 1x10⁹ células/ml, aproximadamente 5x10⁸ células/ml, aproximadamente 1x10⁸ células/ml, aproximadamente 5x10⁷ células/ml, aproximadamente 1x10⁷ células/ml, aproximadamente 5x10⁶ células/ml, aproximadamente 1x10⁶ células/ml, y similares, dependiendo del tamaño

de las células). La elección de la concentración celular suministrada junto con el número de células es un criterio coincidente para seleccionar el vehículo de suministro apropiado para las células y el medio suministrados al sitio diana.

5 Uno de varios objetivos del medio de vehículo de esta invención es mitigar o evitar la sedimentación no deseada de las células colocadas en el medio de vehículo. Esto se hace para conseguir una proporción de concentración celular de suministro conocida, uniforme (y preferiblemente muy elevada), es decir, las células suministradas comparadas con las células disponibles pretendidas para suministrarse por el médico a un sitio específico son cercanos al valor de 1:1. Un objetivo similar es asegurar que se consiga una proporción de viabilidad aceptable (preferiblemente también cerca de 1:1) por la que un alto porcentaje de células suministradas sean funcionales y se repliquen a niveles bien aceptados. Proporcionar métodos y composiciones que consigan este objetivo permite enormes mejoras sobre las capacidades de suministro conocidas de este tipo de tratamiento y mejora la fiabilidad de esta forma de tratamiento médico disponible para millones de personas.

15 Los solicitantes se dieron cuenta a través de la investigación de que la pérdida de células, más que la muerte celular, era posiblemente la cuestión crítica en el suministro de células basado en catéteres. Siguiendo esta comprensión, ciertos experimentos validaron la pérdida de células como provocada por la sedimentación de las células más que por la adhesión a la estructura de suministro. Los solicitantes también entendieron a través de la investigación que la cuestión de la sedimentación de las células es un componente crítico de cualquier método de suministro sea a través del uso de bombas o de catéteres. Las aplicaciones de catéter incluirían el uso con catéteres de suministro cardíaco; epicárdicas, endocárdicas, pericárdicas, intraluminales (por ejemplo, intracoronarias, endovenosas) y similares. El uso de soluciones equilibradas de densidad celular también sería apropiado en otras metodologías de suministro no cardíaco, tales como neurovasculares, vasculares periféricas, y similares, y más generalmente al suministro de células con jeringa.

25 Ejemplo I

Las células fibroblastos se almacenaron en tubos de centrífuga de 50 ml durante un periodo de 100 minutos, tanto en hielo como a temperatura ambiente (TA). Las muestras se retiraron con una pipeta de la parte superior y del fondo de las suspensiones en hielo y TA cada 20 minutos. No se realizó mezcla durante los primeros 60 minutos. En el momento puntual minuto 80 se realizó una mezcla suave (giro manual) inmediatamente antes del muestreo. En el momento minuto 100, se realizó una mezcla fuerte (giro manual vigoroso) inmediatamente antes del muestreo.

La Figura 1 ilustra las proporciones de recuento de células de la parte superior/fondo como los resultados de este experimento. La estratificación de una suspensión de fibroblastos estática, mantenida a temperatura ambiente o en hielo, está claramente demostrada. A los 60 minutos, la concentración celular tomada de la parte superior de la suspensión era de solo del 30% de la tomada del fondo. Pero después de una mezcla suave (en el momento puntual minuto 80), se restauró claramente el equilibrio de la suspensión.

40 Los resultados mostrados en el Ejemplo I demuestran que las suspensiones de fibroblastos no mantienen su concentración inicial cuando se les permite asentarse durante un tiempo. Los resultados sugieren que está sucediendo sedimentación de las suspensiones, pero que incluso una mezcla suave devuelve estas suspensiones de nuevo al equilibrio. Este descubrimiento tiene un impacto potencial sobre el dispositivo de suministro, el medio de suministro, y el diseño del sistema de suministro global, y será crítico para asegurar que la concentración celular terapéutica apropiada se puede suministrar a través del catéter repetidamente y de forma fiable. Sin embargo, hay que entender que puede suceder una sedimentación rápida, y entonces puede que sea necesaria la agitación constante de un vehículo de suministro y medio de inyección para evitar tal fenómeno. Pero como un aspecto práctico, tal agitación no es deseable para el médico. Por consiguiente, los solicitantes identificaron una nueva solución para conseguir una densidad coincidente del medio de vehículo con las células que se suministran por ese medio.

50 La prevención de la sedimentación de fibroblastos humanos se investigó usando soluciones isotónicas diluidas de medios de mejora de imágenes de marca Isovue para aumentar la densidad relativa de los medios celulares por encima de la solución salina normal.

55 Ejemplo II

Se hizo coincidir en densidad un medio de suministro de células con células como una dilución de medio de mejora de imágenes Isovue-300 (comercializado por Bracco Diagnostics) y fibroblastos dérmicos humanos. Isovue es un medio de mejora de imágenes no iónico con el agente activo yopamidol. Las instrucciones de uso para el Isovue-300 enumeran la concentración de 300 mg/ml (61%), osmolalidad de 616 mOsm/kg de agua, viscosidad a 20°C como 8,8 cP, y densidad relativa de 1,339. Isovue-300 después se diluyó 1:2 v/v (1 parte de Isovue a 1 parte de agua desionizada). La osmolalidad de Isovue diluido 1:2 es de aproximadamente 300 mOsm/kg, y la densidad relativa calculada es 1,170. Los fibroblastos suspendidos en Solución Salina Equilibrada de Hank (HBSS) se diluyeron después con el medio Isovue diluido para conseguir una densidad relativa de 1,060. Como la osmolalidad de los medios tanto HBSS como Isovue diluido es de aproximadamente 300 mOsm/kg, la dilución no cambia la osmolalidad de las suspensiones celulares diluidas.

ES 2 271 612 T3

Las densidades relativas de las soluciones ensayadas fueron 1,060 (Medio A), 1,080 (Medio B) y 1,005 (control-Medio C). Las concentraciones celulares en la parte superior y el fondo de las tres soluciones se contaron antes y después de 4 horas de tiempo de sedimentación. Como se muestra en la Figura 2, ambas soluciones de elevada densidad ralentizaron significativamente la sedimentación de fibroblastos en comparación con el control. También se puede hacer una comparación de las capas superiores en el tiempo. Después de 4 horas, el control tenía cero células en la capa superior, y las soluciones de Isovue diluido tenían el 105 y el 57% del recuento inicial de células en la capa superior. Después de 4 horas, la capa del fondo de todas las soluciones contenía más células que las que se contaron inicialmente.

Los recuentos de células con Tripano (usando solución de Azul de Tripano de Sigma Chemical) se realizaron en los dos momentos puntuales (0 y 4 horas). El número de células teñidas (muertas) no era significativamente diferente para las soluciones de Isovue diluido comparadas con el control de solución salina. Los medios Isovue diluidos no parecían romper significativamente membranas celulares después de 4 horas de contacto. El ensayo de proliferación celular indicó que los fibroblastos proliferaban después de la exposición a Isovue así como con el control de solución salina.

Ejemplo III

Este experimento fue muy similar al realizado en el Ejemplo II, excepto en que se usaron mioblastos en vez de fibroblastos. La prevención de la sedimentación de mioblastos se investigó usando soluciones isotónicas diluidas de medios de mejora de imágenes Isovue para aumentar la densidad relativa de los medios celulares sobre la solución salina normal. Las densidades relativas de las soluciones ensayadas fueron 1,060 (Medio A), 1,080 (Medio B) y 1,005 (control-Medio C). Las concentraciones celulares en la parte superior y el fondo de las tres soluciones se contaron antes y después de 4 horas de tiempo de sedimentación.

Como se muestra en la Figura 3, ambas soluciones de elevada densidad ralentizaron significativamente la sedimentación de mioblastos en comparación con el control de HBSS. Después de 4 horas, el control tenía cero células en la capa superior, y las soluciones de Isovue diluido tenían el 75 y el 85% del recuento inicial de células en la capa superior. Después de 4 horas, los medios A y B tenían trazas de células suspendidas teniendo el control algunas de las células agrupadas en la capa del fondo del tubo de centrifuga. Las trazas de mioblastos después de 4 horas eran inesperadas, ya que esto no se observó con los fibroblastos. Los tubos de centrifuga se mezclaron suavemente por giro manual antes del ensayo de proliferación. Estos recuentos de células, después de la mezcla suave, indicaron que el 24-40% de las células se perdieron después de cuatro horas debido a la adherencia a la pared del recipiente o entre ellas (agrupamiento). La sedimentación celular era una cuestión más significativa que la adherencia ya que el control tenía un aumento de 29 veces de células en el fondo del tubo después de cuatro horas de sedimentación. La densidad de los mioblastos es aproximadamente 1,06 g/ml. El número de células teñidas con Tripano (muertas) era muy bajo y no significativamente diferente para las tres soluciones. El medio Isovue diluido no parece romper significativamente las membranas de las células mioblastos después de 4 horas de contacto. El ensayo de proliferación celular indica que los mioblastos proliferaron también después de la exposición a Isovue así como antes de la exposición.

Los experimentos previos de los solicitantes demostraron que haciendo coincidir la densidad y osmolalidad de un fluido de vehículo al de las células que se suministran, entonces se puede minimizar la sedimentación de las células. Se hicieron experimentos adicionales en vista del problema conocidos de posible daño a las células debido a la adhesión con diversos materiales. Aunque los solicitantes realizaron satisfactoriamente los experimentos que verificaron que mioblastos viables, proliferativos se pueden suministrar uniformemente a través de un amplio intervalo de materiales de catéter. Los materiales de catéter pueden incluir diversos polímeros, incluyendo pero sin limitación, polieterecetona (PEEK), poliimida (PI - calidad médica), poliuretanos, poliamidas, siliconas, polietilenos, mezclas de poliuretanos, amidas de bloque de poliéter (por ejemplo, PEBAX), y similares, o incluyendo diversos materiales metálicos, incluyendo pero sin limitación, acero inoxidable (SS), aleaciones de titanio, aleaciones de níquel y titanio (por ejemplo, Nitinol), aleaciones de cromo (MP35N, Elgiloy, Phynox, etc.), aleaciones de cobalto, y similares. Más preferiblemente, los materiales de catéter se eligen entre el grupo de polieterecetona (PEEK), poliimida (PI) y acero inoxidable (SS). Una característica estudiada cuando las células se suministran a través de catéteres (después de la mezcla apropiada en la solución de densidad celular) fue el comportamiento de los mioblastos y fibroblastos en los diversos recipientes usados para contener, transportar e inyectar las células durante el periodo de implante esperado. Por consiguiente, experimentos adicionales incluyeron combinaciones de medios de suministro coincidentes en densidad y no coincidentes en densidad en catéteres de longitudes, tamaños de luz, y materiales representativos de aquellos adecuados para el suministro transvenoso de células. Como se muestra en las Figuras 4 y 6, y como se usa en las investigaciones de los siguientes Ejemplos IV y VI, algunos de los medios experimentan un tiempo de rotura relativamente elevado, que previamente se creía que era un indicador clave de la adhesión y las inexactitudes del suministro de células.

El ejemplo IV evalúa las dos tecnologías de suministro de células y la prevención de sedimentación celular realizadas simultáneamente suministrando mioblastos a través de catéteres usando medios de prevención de sedimentación celular. La investigación se centra en la variación de los parámetros y su efecto sobre la supervivencia de las células. Los parámetros de diseño de interés incluyen presión, caudal, diámetro del catéter, longitud del catéter, y concentración celular. Las concentraciones y tasas de supervivencia de células suministradas desde los medios de prevención de sedimentación se miden y se comparan con las de las células suministradas desde HBSS. Se permite que las células sedimenten durante 40 minutos en un esfuerzo para determinar si las células suspendidas en el medio de prevención de sedimentación se pueden suministrar sin necesidad de mezclarse.

ES 2 271 612 T3

Ejemplo IV

Se prepararon tres soluciones de suministro diferentes. La concentración celular se mantuvo constante usando la proporción (2 ml de suspensión celular/1 ml de solución de vehículo) para un total de 3 ml añadidos a cada una de las tres jeringas de suministro. La suspensión celular fue la misma en las tres soluciones. La composición de cada una de las tres soluciones de vehículo fue la siguiente:

Soluciones 1 y 2: solución salina equilibrada de Hank (HBSS) usada en experimentos previos.

Solución 3: mezcla de Isovue 370/H₂O desionizada (DI), ajustada para una densidad relativa de 1,060 y una osmolaridad de 300 mOsm/kg.

La Solución 3 se preparó de forma similar a los medios de prevención de sedimentación celular de experimentos previos, con la excepción de que se usó el medio de mejora de imágenes Isovue 370 en lugar de Isovue 300. Isovue 370 es simplemente una solución de yopamidol más concentrada que Isovue 300, y se descubrió que una dilución adicional con H₂O DI (3,8 ml de H₂O DI por cada 16,2 ml de Isovue 370) devolvía las propiedades del medio Isovue 370 de nuevo a las del medio Isovue 300. Las diluciones después continuaron como por el método mencionado anteriormente en el Ejemplo III.

Las soluciones de células y vehículo se mezclaron en tubos de centrifuga de 50 ml, Soluciones marcadas 1, 2 y 3 y se usaron como se describe a continuación. Los ensamblajes de catéter de 152,4 m (60 pulgadas) de longitud se construyeron a partir de tubos de 0,305 (0,012'') de DI de PEEK. Los mioblastos se almacenaron en tubos de centrifuga de 50 ml durante todo el experimento y nunca se congelaron antes de su uso. Las células se suministraron a través de los ensamblajes de catéter usando el sistema de suministro de fluidos EFD Modelo 1500XL. Para cada experimento se recogieron los siguientes datos:

- Recuentos en hemocitómetro y tinción de viabilidad con Azul de Tripano, sobre mioblastos de cada uno de los tubos de centrifuga iniciales de 50 ml;

- Recuentos en hemocitómetro y tinción de viabilidad con Azul de Tripano, sobre mioblastos de cada solución inmediatamente después de el suministro (t=0 minutos) a través de sus catéteres respectivos; y

- Recuentos en hemocitómetro y tinción de viabilidad con Azul de Tripano, en mioblastos de cada solución inmediatamente después del suministro (t=40 minutos) a través de sus catéteres respectivos.

Las siguientes Tablas I, II y III muestran los protocolos de mezcla para cada solución. En resumen, la Solución 1 es la solución de HBSS/células, mezclada antes de t=0 pero no antes de t=40; la Solución 2 es la solución de HBSS/células, mezclada antes de t=0 y de t=40; y la Solución 3 es la solución de Isovue/células, mezclada antes de t=0 pero no antes de t=40.

TABLA I

Solución N° 1: HBSS, sin mezcla en 40
(t=0: 11:35 am; t=40: 12:15 pm)
1A (t=0): 4,30 M, 95% viable
1B (t=0): 3,80 M, 94% viable
1C (t=0): 4,30 M, 94% viable
1D (t=40): 1,93 M, 92% viable
1E (t=40): 1,43 M, 97% viable
1F (t=40): 1,33 M, 95% viable

TABLA II

Solución N° 2: HBSS, mezcla en 40
(t=0: 11:48 am; t=40: 12:28 pm)
2A (t=0): 4,20 M, 93% viable
2B (t=0): 3,83 M, 93% viable
2C (t=0): 3,83 M, 93% viable
2D (t=40): 4,10 M, 91% viable
2E (t=40): 3,98 M, 91% viable
2F (t=40): 3,93 M, 88% viable

ES 2 271 612 T3

TABLA III

Solución N° 3: **Isovue/HBSS, sin mezcla en 40**
(t=0: 12:01 am; t=40: 12:41 pm)
3A (t=0): 4,18 M, 97% viable
3B (t=0): 4,03 M, 96% viable
3C (t=0): 4,25 M, 96% viable
3D (t=40): 3,75 M, 96% viable
3E (t=40): 3,93 M, 93% viable
3F (t=40): 4,00 M, 94% viable

Se cultivaron mioblastos esqueléticos caninos hasta que estuvieron disponibles suficientes células. Los mioblastos se disociaron, se aclararon y se resuspendieron en HBSS en un tubo de centrifuga de 50 ml que contenía la solución de vehículo apropiada. En este experimento los solicitantes fueron capaces de suministrar un mínimo de 1 millón de células/ml en los catéteres.

Las células de todas las muestras descritas en las secciones precedentes se contaron manualmente por duplicado usando un hemocitómetro. La Tabla IV muestra las proporciones de recuento de células, en unidades de células/ml.

TABLA IV

N° Solución	Solución de Suministro	Concentración celular inicial	Concentración de células suministradas t=0 (promedio)	Concentración de células suministradas t=40 (promedio)	Proporción, t=0/inicial (% de inicio)	Proporción, t=40/t=0 (% de t=0)
1	HBSS, sin mezcla	3,95 M	4,13 M	1,56 M	104%	38%
2	HBSS, con mezcla	3,95 M	3,95 M	4,00 M	100%	101%
3	Isovue, sin mezcla	4,47 M	4,15 M	3,89 M	93%	94%

Los resultados del Ejemplo IV demuestran claramente que el uso de un medio de prevención de sedimentación celular (en este caso, una solución diluida de medio Isovue 370) permite el suministro de la concentración inicial de mioblastos, incluso después de que hayan transcurrido 40 minutos sin mezcla. La concentración de mioblastos después del suministro de medio de prevención de sedimentación es esencialmente igual después de 40 minutos (94% de la concentración en t=0), mientras que se pierde una cantidad significativa de mioblastos después del suministro después de 40 minutos en HBSS sin mezcla (solamente se administró 38% de la concentración en t=0). Estos resultados muestran claramente la eficacia del medio de prevención de sedimentación celular para la retención de las concentraciones de mioblastos en el suministro por catéter, incluso sin mezcla.

Ejemplo V

Se recogieron fibroblastos dérmicos humanos, se contaron y se dividieron en partes iguales en dos tubos diferentes. El número de células en cada tubo era de aproximadamente 375 millones de células. La composición de cada tubo era la siguiente:

Solución -: solución salina equilibrada de Hank (HBSS) con células

Solución +: solución salina equilibrada de Hank con células mezcladas con Isovue 370, ajustada para una densidad relativa de 1,060 y una osmolalidad de 300 mOsm/kg. Los tubos se dejaron a temperatura ambiente y se tomaron fotografías en los tiempos 0, 40 minutos y 3 horas (Figura 5). La Figura 5 ilustra el efecto que tienen las soluciones coincidentes en densidad relativa con Isovue 370, comparadas con soluciones salinas equilibradas de Hank normales sobre la sedimentación celular.

Ejemplo VI

Se hicieron varios ensayos para evaluar el funcionamiento de los fluidos de suministro de células a través de diferentes sistemas de catéter variando los materiales, longitudes, diámetros y presiones de suministro (véanse también los siguientes ensamblajes de catéter generales) para diferentes tipos celulares (por ejemplo, fibroblastos y mioblastos - véase también la siguiente preparación de células) (Figura 6). En base a los diversos parámetros de suministro, por ejemplo, se midieron el índice de rotura, la tensión tangencial, el tiempo de rotura (véanse también los siguientes parámetros de flujo de fluido), el porcentaje de células vivas resultantes del suministro.

Las Figuras 7A a 7H son fotografías SEM de superficies de lúmenes de catéteres. En cada par de figuras, la imagen de la izquierda se tomó con un aumento 100X, y la imagen de la derecha a 1000X. Las imágenes a 1000X son áreas representativas de los centros aproximados de las imágenes a 100X análogas: las Figuras 7A y 7B son fotografías de lúmenes de catéteres de PEEK después de no exponerse a células; las Figuras 7C y 7D son fotografías de lúmenes de catéteres de PEEK después del suministro de mioblastos; las Figuras 7E y 7F son fotografías de lúmenes de catéteres de acero inoxidable después de no exponerse a células; las Figuras 7G y 7H son fotografías de lúmenes de catéteres de acero inoxidable después del suministro de mioblastos. Estas imágenes indican que los vehículos de suministro de células dejan muy pocas células residuales en las superficies internas del catéter.

Preparación General de Células

Se cultivaron fibroblastos dérmicos humanos, (Clonetics, Inc.) o, en experimentos posteriores, mioblastos esqueléticos caninos, en matraces de cultivo tisular usando un medio especial de crecimiento (Clonetics, Inc.). El medio se reemplazó cada tres días y cuando confluían, se realizaron pases celulares para propagar los cultivos. Después de determinar que había suficientes células disponibles, las células se aclararon una vez con solución salina equilibrada de Hank (HBSS) y después se disociaron con un lavado enzimático de 5 min (tripsina al 0,25%) a 37°C. La suspensión celular resultante se neutralizó con medio de crecimiento que contenía suero y después se centrifugó (800 g) durante 10 minutos para sedimentar las células. Se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en solución HBSS. En este punto, la concentración celular aproximada se determinó por un recuento de células en hemocitómetro. Se ajustó el volumen de HBSS para obtener la concentración celular deseada. La concentración celular inicial se calculó a partir del recuento de células en hemocitómetro y la dilución de HBSS. La suspensión celular final se almacenó en hielo mientras duró el experimento.

Ensamblaje del Catéter de Ensayo General

Los ensamblajes de catéter de ensayo se hicieron uniendo segmentos de PEEK (polieteretercetona), PI (poliimida), [o en experimentos posteriores, acero inoxidable (SS)] de diversas longitudes y diámetros a adaptadores con conexión de ajuste luer con adhesivo Loctite 401 después de la preparación con Loctite 7701.

Preparación de Flujo de Fluido General

La preparación de flujo de fluido constaba de un dosificador de fluido (EFD, Modelo 1500XL) que funciona con aire comprimido (máx. 586 kPa (85 psi)) acoplado con una jeringa de 3 cc. El fluido a dosificar (la suspensión celular de interés o agua DI) se cargó en la jeringa. La punta de la jeringa se acopló en el ensamblaje de catéter de ensayo descrito en la sección previa. Se puede fijar el tiempo de suministro (lo más cercano a 0,1 segundos) y presión (hasta 552 kPa (80 psi)) con este sistema. Para asegurar que se suministraba un volumen adecuado de suspensión celular, se realizaron mediciones de caudal preliminares con agua DI.

Se reconoce que cualquiera de los diversos medios puede ser adecuado para el medio de vehículo, con la condición de que tenga las características básicas de coincidencia de densidad de las células pretendidas para el suministro, una compatibilidad biológica conocida, sea preferiblemente económico, y sea preferiblemente adecuado para usos de tipo solución salina iónica. El dispositivo de suministro para un fluido de suministro de células preferido puede utilizar componentes y técnicas que tengan un aspecto y ambiente conocido para el médico y que tengan facilidad de funcionamiento debido a las características del medio que son las de un fluido con una baja viscosidad. La técnica de coincidencia de densidad identificada por los solicitantes permite una estructura más simplificada del sistema de suministro obviando la necesidad de zonas de mezcla complejas, luers, o similares. Con las células distribuidas uniformemente en todos los recipientes y tubos del sistema de suministro, se suministrará un número exacto y uniforme de células, consiguiendo un resultado terapéutico más uniforme. Esto se puede conseguir sin requerir mezclar o hacer vibrar el fluido después de la colocación en el catéter de suministro. En una realización, un catéter es un dispositivo médico desechable, aunque esto no es necesario. Un catéter de sistema de suministro puede estar construido de plástico de calidad médica y/u otros materiales, tales como acero inoxidable u otro material adecuado.

Otra realización de esta invención incluye un método para aumentar la eficacia del suministro de células a un paciente que comprende las etapas de proporcionar un líquido de vehículo para suministrar concentraciones exactas de células a un paciente. El líquido de vehículo tiene una densidad que coincide sustancialmente con la densidad de las células a suministrar al paciente cuando se mezclan en solución. Además, la solución debe tener un pH en el intervalo de aproximadamente 6,0 a 8,0, y más preferiblemente 6,8 a 7,6, y mucho más preferiblemente aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,2, y aproximadamente 7,4. Preferiblemente, el medio equilibrado es sustancialmente isotónico como se ha descrito previamente. Una etapa adicional implica combinar el suministro de células de la solución

coincidente en densidad de líquido de vehículo y células con otro procedimiento médico. El procedimiento médico puede ser de diversos tipos, y para casi cualquier aplicación médica. Aunque la combinación puede suceder al mismo tiempo, la combinación puede que no se consiga simultáneamente, sino de manera sinérgica para aumentar la eficacia del suministro de células o del otro procedimiento médico o de ambos. En una realización, el procedimiento médico se puede seleccionar de la lista de colocación de marcapasos cardiacos, estimulación cardiaca, terapia cardiaca eléctrica, terapia cardiaca farmacológica, control cardiaco, formación de imágenes cardiacas, detección cardiaca, mapeo cardiaco, procedimientos de intervención, procedimientos quirúrgicos, procedimientos de infusión, procedimientos de diagnóstico, y procedimientos terapéuticos. En otra realización, el procedimiento médico se puede seleccionar de la lista de estimulación neurológica, terapia neurológica eléctrica, terapia neurológica farmacológica, control neurológico, formación de imágenes neurológicas, detección neurológica, mapeo neurológico, procedimientos de intervención, procedimientos quirúrgicos, procedimientos de infusión, procedimientos de diagnóstico, y procedimientos terapéuticos.

Por tanto, se han descrito realizaciones de un fluido de suministro de células para la prevención de la sedimentación celular en los sistemas de suministro. Los especialistas en la técnica apreciarán que la presente invención se puede practicar con realizaciones diferentes a las descritas. Las realizaciones descritas se presentan para propósitos de ilustración y no de limitación, y la presente invención se limita solamente por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una suspensión de líquido de vehículo de células para el implante en un mamífero, que comprende:

a. seleccionar un tipo celular para el implante en un mamífero e identificar la densidad relativa del tipo celular;

b. seleccionar un líquido de vehículo que tenga una densidad relativa en un intervalo de densidades relativas indicadas para coincidir aproximadamente con la densidad relativa del tipo celular seleccionado para producir una tasa de suministro de células aceptable en un destino de suministro en el mamífero;

c. asegurar que el líquido identificado tiene una osmolalidad y pH apropiados para asegurar una viabilidad aceptable de las células en el destino de suministro; y

d. mezclar el líquido de vehículo y las células en suspensión líquida.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de selección de células comprende seleccionar entre tipos celulares que incluyen fibroblastos o mioblastos.

3. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de selección de células comprende seleccionar un tipo celular entre grupo compuesto por células de islotes, células madre pluripotenciales, células madre mesenquimáticas, células madre endodérmicas, células madre ectodérmicas, hepatocitos, condrocitos, osteoblastos, células neuronales, células de glía, células de músculo liso, células endoteliales, mioblastos esqueléticos, células de núcleo pulposo, células epiteliales, mioblastos, células de islotes alfa, células de islotes beta, macrófagos, cardiomiocitos, células de Purkinje, eritrocitos, plaquetas y fibroblastos.

4. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de selección del líquido de vehículo comprende seleccionar un líquido que tenga una densidad relativa que está en el grupo seleccionado entre 5%, 2%, 1%, 0,1% y 0,01% de la densidad relativa del tipo celular.

5. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de selección del tipo celular incluye adicionalmente la colocación del tipo celular seleccionado en una solución.

6. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de mezcla produce una suspensión líquida sustancialmente isotónica.

7. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de mezcla produce una suspensión líquida que está en +300/-50 mOsm/ de isotonicidad.

8. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de asegurar que el líquido identificado tiene una osmolalidad y pH apropiados asegura que las células suministradas sean al menos 80% viables durante un periodo de al menos 4 horas.

9. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de asegurar que el líquido identificado tiene un pH apropiado comprende la selección de un líquido que tenga un pH en el intervalo de 6,0 a 8,0.

10. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de mezcla comprende mezclar el líquido de vehículo y las células en un biorreactor.

11. El método de la reivindicación 1, en el que las células se han marcado o etiquetado con un marcador de identificación celular.

12. El método de la reivindicación 1, en el que el líquido de vehículo de células también contiene un agente de mejora de imágenes.

13. El método de la reivindicación 1, en el que el líquido de vehículo de células también es un agente de mejora de imágenes.

14. El método de la reivindicación 1, en el que el líquido de vehículo de células también contiene un elemento radiactivo.

15. Una suspensión de líquido de vehículo de suministro de células para el suministro de células en un tejido de un mamífero, que comprende:

a. un volumen de células para su suministro a un sitio de destino en un mamífero para generar crecimiento de tejido nuevo;

ES 2 271 612 T3

b. un líquido de vehículo que tiene una densidad que coincide sustancialmente con la densidad de las células cuando se mezcla en solución, y teniendo la solución un pH en el intervalo de 6,0 a 8,0, y siendo sustancialmente isotónica;

5 c. en la que las células permanecen sustancialmente dispersas en la solución de líquido de vehículo para proporcionar una concentración celular de suministro uniforme al sitio de destino.

16. La suspensión de la reivindicación 15, en la que las células se seleccionan entre el grupo compuesto por células que forman cartílago, células que forman hueso, células musculares, fibroblastos, y células de órganos.

10 17. La suspensión de la reivindicación 15, en la que la osmolalidad de la suspensión es 300 mOsm/kg.

18. La suspensión de la reivindicación 15, en la que las células se seleccionan entre grupo compuesto por células de islotes, células madre pluripotenciales, células madre mesenquimáticas, células madre endodérmicas, células madre ectodérmicas, hepatocitos, condrocitos, osteoblastos, células neuronales, células de glía, células de músculo liso, células endoteliales, mioblastos esqueléticos, células de núcleo pulposo, células epiteliales, mioblastos, células de islotes alfa, células de islotes beta, macrófagos, cardiomiocitos, células de Purkinje, eritrocitos, plaquetas y fibroblastos.

19. La suspensión de la reivindicación 15, en la que el líquido de vehículo comprende una formulación seleccionada entre grupo de yopamidol, bromuro de perfluorooctilo, gadodiamida, y hierro dextrano.

20 20. La suspensión de la reivindicación 15, en la que las células se han marcado o etiquetado con un marcador de identificación celular.

21. La suspensión de la reivindicación 15, en la que el líquido de vehículo de células también contiene un agente de mejora de imágenes.

22. La suspensión de la reivindicación 15, en la que el líquido de vehículo de células también es un agente de mejora de imágenes.

23. La suspensión de la reivindicación 15, en la que el líquido de vehículo de células también contiene un elemento radiactivo.

24. El uso de células para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de infartos de miocardio o fallo cardíaco congestivo, comprendiendo dicho uso las etapas de

35 a) proporcionar un líquido de vehículo para suministrar una concentración exacta de células, teniendo el líquido de vehículo una densidad que coincide sustancialmente con la densidad de las células a suministrar al paciente cuando se mezclan en solución, y teniendo la solución un pH en el intervalo de 6,0 a 8,0, y siendo sustancialmente isotónica; y

40 b) en el que el suministro de la solución coincidente en densidad de líquido de vehículo y células se tiene que combinar con otro procedimiento médico seleccionado de la lista de colocación de marcapasos cardíacos, estimulación cardíaca, terapia cardíaca eléctrica, terapia cardíaca farmacológica, control cardíaco, formación de imágenes cardíacas, detección cardíaca, mapeo cardíaco y procedimientos relacionados con el sistema cardiovascular.

45 25. El uso de la reivindicación 24, en el que el suministro de células se tiene que conseguir con una bomba.

26. El uso de la reivindicación 24, en el que el suministro de células se tiene que conseguir con un catéter.

27. El uso de la reivindicación 24, en el que el suministro de células se tiene que conseguir con una jeringa.

50 28. El uso de la reivindicación 24, en el que el suministro de células se tiene que conseguir en combinación con un mecanismo de infusión de fármacos.

29. El uso de la reivindicación 24, en el que el líquido de vehículo de células también es un agente de mejora de imágenes.

30. El uso de la reivindicación 24, en el que el líquido de vehículo de células también contiene un elemento radiactivo.

60 31. El uso de la reivindicación 24, en el que las células se seleccionan de la lista de células de islotes, células madre pluripotenciales, células madre mesenquimáticas, células madre endodérmicas, células madre ectodérmicas, hepatocitos, condrocitos, osteoblastos, células neuronales, células de glía, células de músculo liso, células endoteliales, mioblastos esqueléticos, células de núcleo pulposo, células epiteliales, mioblastos, células de islotes alfa, células de islotes beta, macrófagos, cardiomiocitos, células de Purkinje, eritrocitos, plaquetas y fibroblastos.

65 32. El uso de la reivindicación 24, en el que las células se han marcado o etiquetado con un marcador de identificación celular.

ES 2 271 612 T3

33. El uso de la reivindicación 24, en el que el líquido de vehículo de células también contiene un agente de mejora de imágenes.

34. Un nuevo uso para un líquido que tiene ciertas características adecuadas para su uso o ajuste y uso como un medio de vehículo de suministro de células, en el que el nuevo uso comprende:

a. configurar el líquido como líquido de vehículo que tenga una densidad que coincida sustancialmente con la densidad de las células a suministrar al sitio de crecimiento tisular de un mamífero, configurándose el líquido de forma que cuando se mezcle como una solución con las células, entonces la solución tenga un pH en el intervalo de 6,0 a 8,0, y sea sustancialmente isotónico;

b. en el que las células permanecen sustancialmente dispersas en la solución de líquido de vehículo para proporcionar una concentración celular de suministro uniforme al sitio de destino.

35. El uso para el líquido de la reivindicación 34, en el que el líquido comprende una formulación seleccionada entre grupo de agentes de mejora de imágenes no iónicos.

36. El uso para el líquido de la reivindicación 34, en el que el líquido comprende una formulación seleccionada entre grupo de yopamidol y bromuro de perfluorooctilo.

37. El uso para el líquido de la reivindicación 34, en el que las células se han marcado o etiquetado con un marcador de identificación celular.

38. El uso para el líquido de la reivindicación 34, en el que el líquido de vehículo de células también es un agente de mejora de imágenes.

39. El uso para el líquido de la reivindicación 34, en el que el líquido de vehículo de células también contiene un elemento radiactivo.

40. El líquido de vehículo de suministro de células de cualquiera de las reivindicaciones 1, 15, 24 ó 34, en el que la etapa de selección de líquido de vehículo comprende seleccionar un líquido que tiene una densidad relativa que está en el grupo seleccionado entre 5%, 2%, 1%, 0.1% y 0,01% de una densidad relativa de células de 1,063 a 1,10.

Figura 1

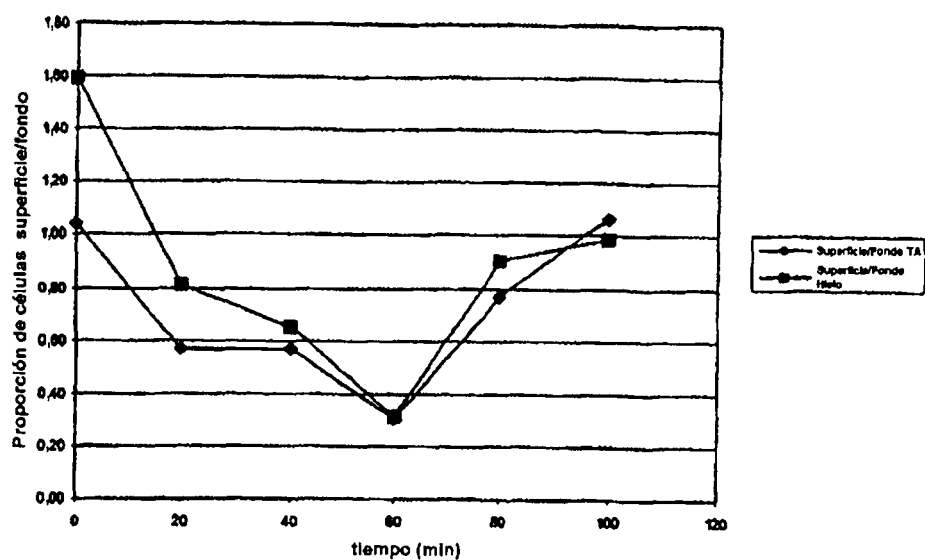


Figura 2

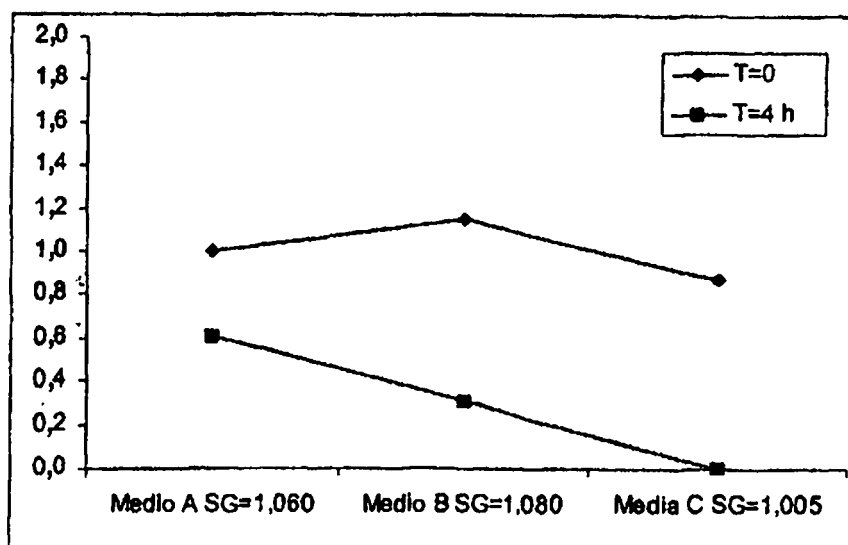


Figura 3

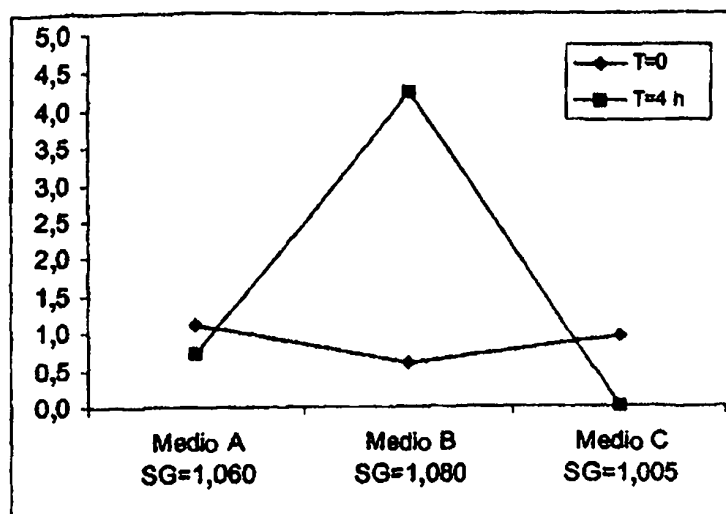


Figura 4

ID Muestra	Material	Vol administrado (μ l)	DI Catéter (cm)	Longitud Catéter (cm)	Presión (kPa)	tiempo (s)	Caudal (μ l/s)	Velocidad (cm/s)	Tensión tangencial (N/m ²)	Tiempo de rotura (ms)
1A	PEEK	206	0,030	152,4	551,43	2,8	74	101,60	3,31	1511
1B	PEEK	202	0,030	152,4	551,43	2,8	72	99,06	3,24	1541
1C	PEEK	206	0,030	152,4	551,43	2,8	74	101,60	3,31	1511
2A	PEEK	206	0,030	152,4	551,43	2,8	74	101,60	3,31	1511
2B	PEEK	203	0,030	152,4	551,43	2,8	73	99,06	3,26	1534
2C	PEEK	204	0,030	152,4	551,43	2,8	73	99,06	3,28	1526
2A	PEEK	210	0,030	152,4	551,43	3,6	58	78,74	2,62	1906
2B	PEEK	203	0,030	152,4	551,43	3,6	56	76,20	2,54	1972
2C	PEEK	207	0,030	152,4	551,43	3,6	58	78,74	2,59	1934
1D	PEEK	195	0,030	152,4	551,43	2,8	70	96,52	3,13	1597
1E	PEEK	198	0,030	152,4	551,43	2,8	71	96,52	3,18	1572
1F	PEEK	209	0,030	152,4	551,43	2,8	75	101,60	3,36	1490
2D	PEEK	207	0,030	152,4	551,43	2,8	74	101,60	3,32	1504
2E	PEEK	209	0,030	152,4	551,43	2,8	75	101,60	3,36	1490
2F	PEEK	205	0,030	152,4	551,43	2,8	73	101,60	3,29	1519
2D	PEEK	207	0,030	152,4	551,43	3,6	58	78,74	2,59	1934
2E	PEEK	209	0,030	152,4	551,43	3,6	58	78,74	2,61	1915
2F	PEEK	207	0,030	152,4	551,43	3,6	58	78,74	2,29	1934



FIG. 5

Material de Catéter	Longitud de Catéter (cm)	Di de Catéter (cm)	Presión de Suministro (MPa)	Tiempo de Suministro (s)	Tasa Rotura (1/s)	Tensión Tangencial (N/m ²)	Tiempo Rotura (s)	Tipo Celular	Células Iniciales/μl	Fluido Suministrado	% células vivas	Ref (Nº Exp)
PEEK	25,40	0,030	137,86	3	4242	4,24	196	fibroblastos	1710000	HBSS	100	1
PEEK	25,40	0,030	137,86	3	4137	4,14	201	fibroblastos	1710000	HBSS	94,1	1
PI	25,40	0,034	103,39	3	2874	2,87	258	fibroblastos	480000	HBSS	100	2
PI	25,40	0,034	241,25	3	7369	7,37	101	fibroblastos	480000	HBSS	88,5	2
PEEK	76,20	0,023	482,50	9	3565	3,56	935	fibroblastos	500000	HBSS	90,9	3
PEEK	76,20	0,030	206,79	5	1934	1,93	1293	fibroblastos	500000	HBSS	88,9	3
PEEK	76,20	0,030	413,57	3	4272	4,27	585	fibroblastos	500000	HBSS	95,7	3
PEEK	76,20	0,036	137,86	4	1586	1,59	1351	fibroblastos	500000	HBSS	100	3
PEEK	76,20	0,036	275,71	2	3200	3,2	670	fibroblastos	500000	HBSS	100	3
PEEK	76,20	0,043	137,86	3	1740	1,74	1014	fibroblastos	500000	HBSS	94,7	3
PI	76,20	0,034	275,71	3	3453	3,45	644	fibroblastos	500000	HBSS	88,5	3
ninguno	sin catéter		jeringa (manual)					fibroblastos	500000	HBSS	100	3
ninguno	sin catéter		sin jeringa					fibroblastos	500000	HBSS	95	3
PEEK	152,40	0,030	551,43	3	3073	3,07	1827	fibroblastos	6800000	HBSS	95	10
PEEK	152,40	0,043	551,43	0,8	3895	3,89	906	fibroblastos	6800000	HBSS	97,1	10
PEEK	152,40	0,030	551,43	3	3478	3,48	1438	fibroblastos	2700000	HBSS	89,2	11
PEEK	152,40	0,043	551,43	0,8	4231	4,23	834	fibroblastos	2700000	HBSS	89	11
SS	121,92	0,043	551,43	0,8	3915	3,91	721	fibroblastos	5900000	HBSS	97	14
PEEK	121,92	0,040	551,43	0,7	5420	5,42	553	fibroblastos	5900000	HBSS	88	14
PEEK	152,40	0,030	551,43	2,8	3244	3,24	1541	fibroblastos	3950000	HBSS	94	15
PEEK	152,40	0,030	551,43	2,8	3308	3,31	1511	fibroblastos	3950000	HBSS	93	15
PEEK	152,40	0,030	551,43	3,6	2623	2,62	1906	fibroblastos	4470000	isovue/HBSS	97	15
PEEK	152,40	0,030	551,43	3,6	2586	2,59	1934	fibroblastos	4470000	isovue/HBSS	96	15

FIG. 6

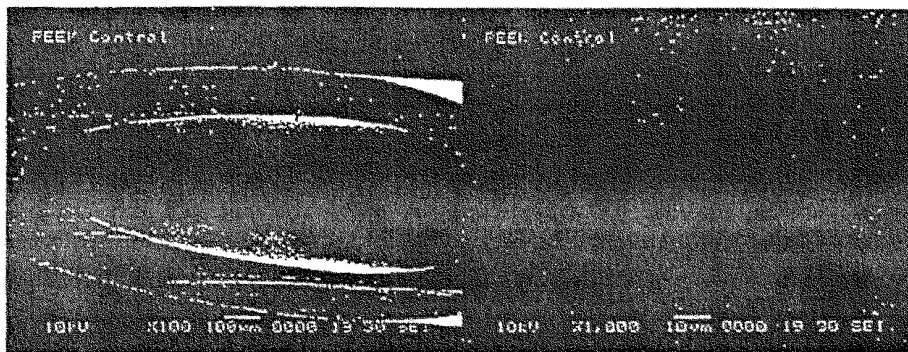
ABREVIATURAS:

PEEK= polietileno (calidad médica)

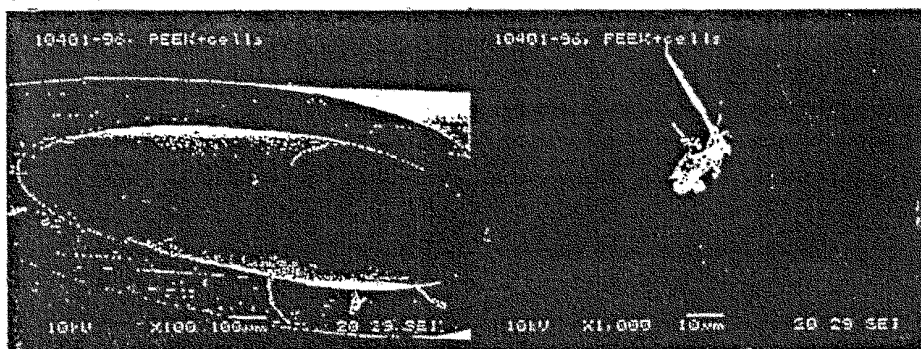
PI = políimida (calidad médica)

SS =acero inoxidable (calidad hipodérmica)

HBSS = solución salina equilibrada de Hank

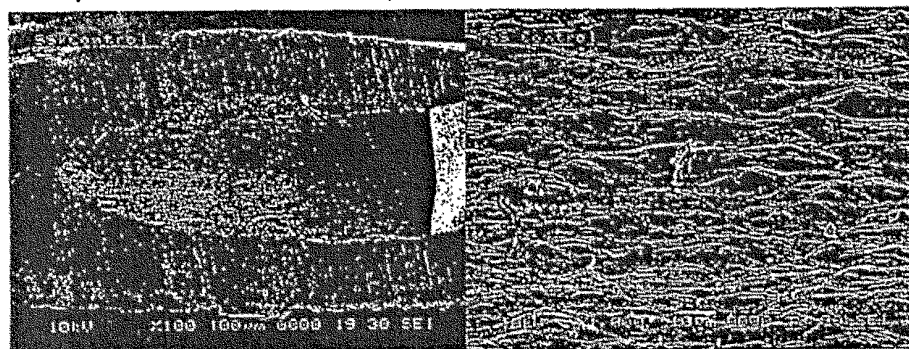


Figuras 7A y 7B. Luz de catéter de PEEK sin exposición a células

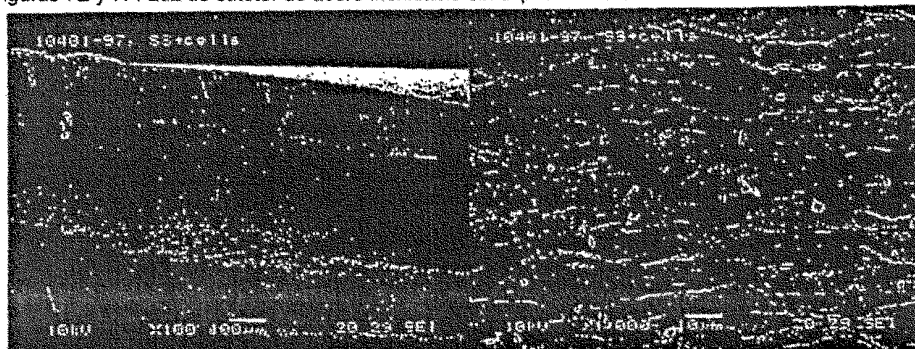


Figuras 7C y 7D. Luz de catéter de PEEK después del suministro de mioblastos.

C



Figuras 7E y 7F. Luz de catéter de acero inoxidable sin exposición a células



Figuras 7G y 7H. Luz de catéter de acero inoxidable después del suministro de mioblastos