



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 890**

51 Int. Cl.:
A61K 35/28 (2006.01)
A61P 19/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07014066 .0**
96 Fecha de presentación : **08.09.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1872789**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2008**

54 Título: **Composiciones que comprenden células madre mesenquimales.**

30 Prioridad: **07.09.2002 GB 0220841**
12.11.2002 GB 0226275

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.05.2011

73 Titular/es: **QUY BIOSCIENCES LIMITED**
15 Palace Street Norwich
Norfolk NR3 1RT, GB

72 Inventor/es: **Smith, Roger Kenneth Whealands;**
McGarrell, Kenneth Gregory;
Goodship, Allen Edward y
Blunn, Gordon William

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 359 890 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 que comprenden células madre mesenquimales.

5 La presente invención se refiere a una composición de MSC (células madre mesenquimales) o MSC y tenocitos derivados de las mismas en una suspensión líquida de sobrenadante de médula ósea en donde la composición de MSC está enriquecida en comparación con una fuente natural de células, y al uso de la misma.

10 Las lesiones del tendón flexor digital superficial son una causa común de desgaste entre caballos de competición, y van asociadas a un escaso éxito de retorno al nivel previo de rendimiento y a una elevada incidencia de que se vuelva a producir la lesión. Los regímenes de tratamiento actuales (revisados por Dowling y col., 2000) tienen sólo efectos marginales en la evolución de la tendinopatía, siendo la principal influencia en el pronóstico la gravedad de la lesión inicial. Estudios recientes que han investigado la eficacia del inhibidor de la lisil-oxidasa, el fumarato de beta-aminopropionitrilo, han puesto de manifiesto mejoras importantes en la evolución de la tendinopatía, de moderada a grave, de flexor digital superficial (Genovese, 1992), aunque esta evolución no ha sido tan favorable en ensayos clínicos posteriores (Reef y col., 1996, 1997), y un trabajo experimental reciente ha demostrado posibles efectos adversos de este tratamiento (Dahlgren y col., 2002). Además, aunque este tratamiento previene las reticulaciones de colágeno que se forman demasiado pronto, permitiendo así que un régimen de ejercicio controlado mejore la funcionalidad del tejido cicatricial, no regenera el tejido tendinoso. Ya que el tejido cicatricial nunca será tan funcional como el tejido tendinoso, un objetivo de un futuro tratamiento eficaz es el desarrollo de métodos para regenerar tejido tendinoso.

20 Recientemente ha habido un interés considerable en los beneficios terapéuticos potenciales de las células madre mesenquimales (MSC) para la curación de tendones y ligamentos (Woo y col., 1999; Caplan y Bruder, 2001; Hildebrand y col., 2002). Estas células residen en pequeñas cantidades en todos los tejidos y poseen capacidades multipotenciales para diferenciarse en diversos tejidos diferentes. Informes recientes han demostrado que las MSC se pueden implantar en tejido de tendones y ligamentos mediante el uso de armazones en animales experimentales (Young y col., 1998). Una de las fuentes de MSC ha sido la médula ósea, e informes recientes (Herthel, 2001) han descrito un éxito considerable con el uso de médula ósea aspirada de las esternebras e inyectada directamente en el tendón o ligamento dañado. En este informe, el pronóstico global para un retorno a trabajar a pleno rendimiento en 100 caballos con lesiones de ligamento suspensor, tratados con médula ósea, fue del 84%, mientras que un grupo comparativo de 66 caballos tratados de manera conservadora tuvo un pronóstico del 15%. Sin embargo, no existe documentación sobre el número de lesiones de extremidades anteriores y extremidades posteriores, ni sobre la región del ligamento suspensor dañado, todos los cuales se sabe que presentan pronósticos muy diferentes (Dyson, 1995, 2000). Además, esta técnica tiene muchas limitaciones. La inyección de volúmenes grandes de médula ósea (30 ml-50 ml) causaría potencialmente una alteración considerable en el tejido tendinoso intacto restante, incluiría otros componentes de la médula ósea tales como espículas de hueso, células de grasa, etc., deletéreos para la curación del tendón, y únicamente se esperaría que estuvieran presentes pequeñas cantidades de MSC. No se ha descrito ni validado ni la presencia ni el número de células madre mesenquimales en este método de tratamiento. Algunos especialistas han dudado por ello de la eficacia de esta técnica ya que los frotis de médula ósea aspirada se asemejan a los frotis de sangre periférica. Los autores de la invención han encontrado también una mineralización no conveniente usando esta técnica.

45 En una realización preferida de la presente invención, se ha desarrollado una técnica para el aislamiento, caracterización y expansión *in vitro* de MSC equinas, con la reimplantación de un número grande de MSC autólogas en un tendón flexor digital superficial dañado en un caballo. Las MSC poseen el potencial de diferenciarse en tenocitos y de regenerar la matriz del tendón después de ocurrida la lesión.

50 La invención no se limita al tratamiento de caballos ni, por supuesto, al tratamiento del tendón flexor digital superficial, ni al uso de células autólogas, aunque este uso se prefiriere. Más bien, la invención tiene aplicaciones más amplias según se describe aquí con detalle.

55 Un primer aspecto de la invención proporciona una composición de MSC ó MSC y tenocitos derivados de las mismas en una suspensión líquida de sobrenadante de médula ósea en donde la composición de MSC está enriquecida en comparación con una fuente natural de células.

60 Un segundo aspecto de la invención proporciona un uso de una composición de MSC o MSC y tenocitos derivados de las mismas en una suspensión líquida de sobrenadante de médula ósea para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una lesión del tejido esquelético blando en un paciente.

65 El tejido esquelético blando incluye tendones, ligamentos, discos intervertebrales, que están asociados con el dolor o una lesión de columna vertebral, y los meniscos.

El tejido esquelético blando se puede lesionar de diferentes maneras, tales como mediante laceración quirúrgica, que es un tipo de lesión percutánea traumática. Esas lesiones quirúrgicas pueden ser consideradas “no naturales”. Las lesiones adecuadas para ser tratadas por medio de la presente invención son lesiones “naturales”, término que significa que la lesión típicamente se produce subcutáneamente, por ejemplo, por ser inducida por una distensión, que frecuentemente es una acumulación de daños a lo largo de un período de tiempo. Por lo tanto, las lesiones naturales son lesiones clínicas e incluyen lesiones traumáticas que se presentan al especialista, e incluyen laceraciones accidentales.

ES 2 359 890 T3

Esas lesiones naturales son comunes en animales de competición o de carreras, incluyendo a seres humanos. Las lesiones naturales de tejido esquelético blando son fácilmente diagnosticadas por el médico o el veterinario usando técnicas muy conocidas, tales como el estudio del historial clínico del paciente, exploración física, palpación, ecografía, barrido de MRI y técnicas similares.

Se prefiere que la lesión a tratar sea una lesión por distensión.

Se prefiere que el tejido esquelético blando que se trata sea un tendón o un ligamento. Los tendones o ligamentos particularmente preferidos para tratar mediante las composiciones de la invención son los que comúnmente se lesionan en animales de competición o de carreras o animales que participan en competiciones deportivas, debido a distensiones o por una acumulación de daños, tal como daños producidos por distensión.

El paciente puede ser cualquier paciente adecuado. Típicamente, el paciente es un mamífero (que incluye seres humanos). Típicamente, el animal no humano, tal como un mamífero no humano, es un animal de importancia económica, tal como un animal de carreras o un animal de trabajo o un animal de compañía (tales como perros o gatos). Aún más típicamente, el animal es un mamífero que recibe entrenamiento para competiciones (es decir, para competiciones deportivas), tales como seres humanos, caballos, perros (tales como lebreles, galgos, perros de caza, sabuesos y perros esquimales) o camellos.

Se prefiere particularmente que el paciente sea un caballo que, debido a su uso en deportes (carreras, saltos, exhibiciones etc.), o como animales de trabajo, son particularmente susceptibles a una lesión natural en el tejido esquelético blando según se ha definido.

Aunque en estos mamíferos, toda lesión del tejido esquelético blando se puede tratar con las composiciones de la invención, algunas lesiones particulares se pueden tratar de manera más adecuada que otras. Así, cuando el paciente es un caballo o un camello, se prefiere si el tejido esquelético blando se selecciona entre el grupo que consiste en tendón flexor digital superficial (SDFT), ligamento suspensor y tendón flexor profundo (tanto de las extremidades anteriores como de las extremidades posteriores), ligamento accesorio del tendón flexor digital profundo (DDFT) (del inglés, "*Deep Digital Flexor Tendon*"), meniscos, y otros ligamentos tales como los ligamentos cruzados. Cuando el paciente es un perro, se prefiere si la lesión de tejido esquelético blando se selecciona entre el grupo que consiste en tendón de Aquiles, ligamento cruzado, menisco y tendón flexor. Cuando el paciente es un ser humano, se prefiere si el tejido esquelético blando se selecciona entre grupo que consiste en tendón de Aquiles, tendón del cuádriceps, manguito de los rotadores, epicondilitis lateral o media, ligamento cruzado, disco intervertebral y menisco.

Las composiciones son particularmente adecuadas para tratar tendones flexores más que tendones extensores. Los tendones flexores almacenan energía y el daño acumulado que precede a una rotura parcial o total. Los tendones flexores por lo general no curan bien y las lesiones en ellos presentan una elevada morbilidad.

Se prefiere de manera particular que las composiciones se usen para tratar tendones o ligamentos lesionados que almacenan energía mecánica. Así, el tratamiento de una tendinitis (tendonitis), tendinopatía (tendonopatía, es decir, lesión en un tendón), desmitis (lesión en un ligamento), tendón arqueado, pierna arqueada y lesiones por distensión, se contemplan específicamente.

La composición de células madre mesenquimales puede ser cualquier composición adecuada de esas células con la condición de que la composición esté enriquecida en comparación con una fuente natural de dichas células. Fuentes naturales de células madre mesenquimales incluyen médula ósea (p. ej., con y sin extracción previa de sangre), sangre periférica (p. ej., con y sin un incremento procedente de médula) y cordón umbilical, pero también incluyen grasa, músculo, vasos sanguíneos, periostio y pericondrio, y en pequeñas cantidades, células en las que se diferencian (p. ej., tendones, ligamentos, cartílagos, etc.). La composición de células para usar en la invención puede estar enriquecida en comparación con las fuentes naturales, por medio de cualquier método adecuado, que incluya típicamente métodos de fraccionamiento celular y concentración. Los métodos adecuados son muy conocidos en la técnica e incluyen la metodología que utiliza Ficoll-Paque descrita en los Ejemplos. Otros métodos adecuados incluyen la concentración de células madre mesenquimales usando anticuerpos dirigidos contra marcadores de células madre mesenquimales que están inmovilizados, por ejemplo, en una columna de cromatografía de afinidad o en un sustrato en un esquema de revestimiento de superficies (del inglés, "*panning*"). El enriquecimiento también se puede realizar cultivando las células y expandiendo las células en condiciones que conservan su carácter de células madre mesenquimales. Esos métodos son muy conocidos en la técnica y uno de ellos se describe con detalle en los Ejemplos. Las células madre mesenquimales se caracterizan por su pluripotencia, es decir, por su capacidad para diferenciarse en diferentes líneas celulares de tejido esquelético y conjuntivo cuando están presentes señales biológicas y/o mecánicas adecuadas. En particular, las células madre mesenquimales son capaces de diferenciarse en cartílago, hueso, músculo (tal como miotubos), células productoras de tendón (tenocitos), fibroblastos y adipocitos (células productoras de grasa). Convenientemente, en el procedimiento de enriquecimiento (que incluye la expansión de las células en cultivo), la presencia de (y el enriquecimiento de, que incluyen la expansión en el cultivo) las células madre mesenquimales se puede determinar antes de su uso en el método de la invención, haciendo que las células se diferencien en diferentes líneas celulares características de las células madre mesenquimales. De manera adicional o como alternativa, los marcadores (típicamente marcadores de superficie celular) pueden ser útiles en la identificación de células madre mesenquimales. En algunas especies, las células madre mesenquimales exhiben el marcador STRO1 (pero probablemente no en el caballo). Típicamente, los tenocitos producen colágeno de tipo I y COMP (véase más adelante). El gen de "scleraxis" puede ser un marcador para tenocitos.

ES 2 359 890 T3

Los tipos celulares derivados de células madre mesenquimales se pueden identificar usando los marcadores que vienen a continuación, en donde + indica la presencia del marcador en la célula y - indica la ausencia (o la presencia de trazas) del marcador en la célula.

Tipo de célula	Colágeno de Tipo I	Colágeno de tipo II	Colágeno de Tipo III	COMP	Miosina
Condrocito (cartílago)	-	+	-	+	-
Osteoblasto (hueso)	+	-	-	-	-
Tenocito (tendón, ligamento)	+	-	(+)	+	-
Fibroblasto (tejido fibroso, cicatriz)	+	-	+	-	-
Miofibroblasto (músculo)	+	-	?	-	+
Adipocito (grasa)	+	-	?	-	-

Típicamente, el enriquecimiento de células madre mesenquimales en la composición es de al menos 2 veces más sobre el contenido de dichas células en la fuente natural que se enriquece de ellas. Preferiblemente, el enriquecimiento es de al menos de 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, o más preferiblemente, de al menos 30 ó 40 ó 50 ó 100 veces.

Preferiblemente es de al menos 1.000 veces o 10^4 veces o 10^5 veces.

Típicamente, la composición enriquecida contiene al menos el 10% de sus células en forma de células madre mesenquimales y preferiblemente al menos el 50% o el 60% o el 70%, o un porcentaje mayor. Puede ser ventajoso que al menos el 90%, o al menos el 95%, o al menos el 99%, de las células presentes en la composición sean células madre mesenquimales.

Es particularmente preferido que las células madre mesenquimales deriven de médula ósea o de sangre de cordón umbilical. Es particularmente preferido si las células están enriquecidas en comparación con la médula ósea, por ejemplo, usando los métodos descritos en los Ejemplos o variantes del método basado en los principios generales de enriquecimiento, expansión (en caso necesario) y escrutinio de células. Cuando la sangre de cordón umbilical es la fuente de células madre mesenquimales, se valora que la sangre de cordón haya sido almacenada para la eventualidad de que se necesitara para usar en los métodos de la invención. Así, se contempla que la sangre de cordón umbilical se conserve en el momento del nacimiento y sea usada, en caso necesario, en el futuro por el paciente.

Aunque se contempla que cualquier composición de células madre mesenquimales enriquecida en comparación con su fuente natural sería útil, se prefiere si las células son alogenas (es decir, procedan de la misma especie que el paciente), en contraposición a que sean células xenógenas (es decir, procedentes de una especie diferente). Si las células son alogenas, pero no autólogas, se prefiere si las células son de un tipo de tejido similar (p. ej., tienen haplotipos de MHC/HLA similares). Es particularmente preferido si las células son autólogas (es decir, derivan del paciente al que van a ser administradas). Esas células autólogas tienen la ventaja de ser mucho menos susceptibles al rechazo en comparación con otras células alogenas (o xenógenas). Asimismo, el uso de células autólogas evita cualquier problema de "dopaje" (p. ej., con un DNA "extraño"), lo que puede representar una preocupación. Así, un método particularmente preferido de la invención comprende obtener células madre mesenquimales procedentes del paciente (por ejemplo, procedentes de la médula ósea), enriquecer las células y, en caso necesario, expandirlas en el cultivo e introducir las células así enriquecidas en el paciente. Se valorará que parte de las células se puedan reservar para usar en una fecha posterior, y típicamente estas células se congelan en condiciones que conservan su viabilidad. Se valorará que las células se pueden obtener y enriquecer (expandir si es necesario) antes de que tenga lugar alguna lesión en el paciente, y que se puedan guardar para su administración inmediata en caso de que, y cuando, el paciente padece una lesión en un tejido esquelético blando. Este procedimiento significa que no se perdería tiempo en el comienzo del tratamiento una vez ocurrida la lesión.

Por suspensión líquida de células se incluye toda suspensión líquida adecuada. Por ejemplo, la suspensión líquida puede ser una suspensión de células en un medio que contienen señales biológicas apropiadas para estimular la diferenciación de las células madre mesenquimales en tipos celulares que son útiles para la regeneración de lesiones de tejido esquelético blando (p. ej., en tenocitos en el caso de la regeneración de tendones), y para desestimular la diferenciación de las células en tipos celulares que no son útiles (p. ej., en tejido óseo). Una suspensión líquida adecuada es aquella en la que las células madre mesenquimales están suspendidas en un plasma rico en plaquetas tal como se describe los Ejemplos. Medios de suspensión líquidos adecuados incluyen suero, plasma, plasma enriquecido con plaquetas, sobrenadante de médula ósea, o medio enriquecido o acondicionado. Para evitar cualquier duda, la suspensión líquida puede ser una suspensión que gelifica *in situ*, por ejemplo, debido a la temperatura del sitio de la lesión en el paciente o debido a que se mezcla con otro agente que causa gelificación.

ES 2 359 890 T3

Las señales biológicas adecuadas incluyen moléculas que estimulan a las células a diferenciarse de la manera adecuada. Esas moléculas pueden incluir factores de crecimiento, citoquinas que, debido al altísimo grado de similitud entre las especies, no necesitan ser autólogas o alógenas (p. ej., los factores de crecimiento o las citoquinas de seres humanos se pueden usar en el caballo). Los factores de crecimiento adecuados pueden incluir TGF β (preferiblemente la isoforma 3), IGF 1, IGF 2, PDGF y FGF. También puede ser útil que en la suspensión líquida de células estén presentes otros factores que estimulan a las células a regenerarse como tejido esquelético blando, tales como una proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP), que puede ayudar en la formación de tejido esquelético blando, pero que no suelen estar presente en animales de edad en algunas especies tales como en el caballo. Se valorará que aunque se prefiere que las señales biológicas estén presentes en la suspensión líquida, estas señales pueden como alternativa o de manera adicional, administrarse al paciente por separado, por ejemplo, en el sitio de la lesión. Es particularmente preferido que las señales biológicas usadas, o sus combinaciones, sean unas señales que disminuyen la posibilidad de formación de cicatrices.

Se apreciará que la composición de células madre mesenquimales se puede estimular para que se diferencien en tenocitos antes de la administración y por tanto las composiciones discutidas anteriormente también contendrán tenocitos. Así, en una realización particular, se administran al paciente tenocitos derivados de células madre mesenquimales. Los tenocitos pueden estar combinados con las células madre mesenquimales y, típicamente, se usa una composición en la que las células madre mesenquimales son obligadas a diferenciarse en tenocitos.

Los tenocitos se pueden estimular para que se formen a partir de células madre mesenquimales aplicando una fuerza de alargamiento a las células. Típicamente, esto se puede hacer sembrando las células en un armazón de colágeno y estirando (alargando) la estructura, aunque las células se puede hacer crecer en una placa de cultivo de tejidos que lleva una superficie inferior flexible la cual se puede alargar a medida que las células crecen.

Las células se pueden eluir del armazón de colágeno o de la superficie de la placa de cultivo y se pueden usar en suspensión líquida.

Las células madre mesenquimales no producen colágeno I, mientras que los tenocitos sí producen colágeno I, de manera que la presencia de colágeno I es indicativa de una diferenciación de las células madre mesenquimales en tenocitos.

La composición de células madre mesenquimales se administra al paciente de alguna de las maneras adecuadas. Preferiblemente, la composición se administra directamente en el sitio de la lesión (o en un sitio adyacente a él), y típicamente de manera que las células madre mesenquimales o tenocitos permanezcan en el sitio de la lesión. Determinados sitios de una lesión natural de tejido blando comprenden cavidades cerradas y es particularmente preferidos que el sitio de la lesión natural de tejido blando que se está tratando sea un sitio con esa cavidad o sea una lesión que se pueda cerrar con facilidad para formar una cavidad. Cuando se tratan ese tipo de lesiones, la posibilidad de un escape hacia el exterior desde el sitio lesionado se reduce. Se prefiere que la lesión tratada sea una rotura parcial intratendinosa. En el SDFT en caballos, la lesión a lo largo del tendón está comúnmente en la región metacarpiana media. En el DDFT la lesión suele estar dentro de la vaina digital. En algunos casos, la lesión es tal que el daño (p. ej., un desgarró) abre una cavidad, o la lesión está situada en un sitio en el que no hay una cavidad natural, y puede ser necesario introducir un empaquetamiento (por ejemplo, en forma de una matriz de un gel), cerca de la cavidad o retener las células de alguna otra manera en el sitio de la lesión. Los tendones o ligamentos rescatados se pueden cerrar quirúrgicamente para que formen una cavidad dentro de la que la suspensión líquida de células se puede administrar. Como alternativa, la composición de células madre mesenquimales se puede introducir en el tejido desgarrado y se puede suturar sin crear una cavidad específica.

Se valorará que las células madre mesenquimales se puedan suministrar por vía intravenosa o, por ejemplo, en el suministro de sangre local al sitio de la lesión.

Se prefiere que la composición de células madre mesenquimales en suspensión líquida se inyecte en el sitio de la lesión. Típicamente, esto se hace mediante inyección percutánea, con o sin ultrasonidos para guiar la inyección hacia el sitio de la lesión (p. ej., dentro de la cavidad de un tendón que se ha lesionado). Así, la aguja de una jeringuilla puede pasar a través de la piel, directa hacia el tejido esquelético blando, tal como un tendón. De manera adecuada, puede haber una “parada” de la aguja, que significa que su extremo está en la posición deseada dentro del sitio de la lesión, para la liberación de la composición que contienen las células. Como alternativa, la aguja de inyección se puede guiar mediante técnicas de artroscopia, lo cual puede constituir una manera mínimamente invasiva de llegar al tejido esquelético blando, tal como un tendón. La dirección mediante artroscopia puede ser particularmente útil en los casos en los que el sitio de la lesión es una estructura intra-articular o intratecal (es decir, dentro de una vaina tendinosa) o una estructura intra-articular colagínosa, un ligamento cruzado o un menisco.

En una de las realizaciones de la invención, el sitio de la herida se limpia de tejido dañado y de tejido cicatricial de reparación incipiente que puede estar empezando a formarse en el sitio, antes de la administración de la composición de células madre mesenquimales o tenocitos. De esta manera, puede ser posible prevenir o reducir las posibilidades de formación de tejido cicatricial, o de otro tejido no deseado. Esto se puede realizar usando un desbridamiento quirúrgico mínimamente invasivo, o usando métodos enzimáticos o biofísicos.

ES 2 359 890 T3

La dosis de células que se administra al paciente puede variar en relación con el tipo y la gravedad de la lesión y pueden ser determinados por el médico o el veterinario. Típicamente, la suspensión líquida se administra en partes alícuotas de aproximadamente 0,1 ml (o 0,2 ml o 0,3 ml o 0,4 ml, pero típicamente en partes alícuotas de no más de 0,5 ml) en el sitio de la lesión. Típicamente, una parte alícuota, tal como una parte alícuota de 0,1 ml, contiene desde 50.000 hasta aproximadamente 500.000 células madre mesenquimales o tenocitos.

El tamaño y/o el número de partes alícuotas puede variar dependiendo de la naturaleza y de la extensión de la lesión. El volumen de la lesión (sitio lesionado) se puede determinar con precisión mediante ultrasonografía. El volumen de la lesión se puede determinar por lo general a partir de imágenes ultrasónicas solamente. Típicamente, cuando la lesión está en un sitio que tiene una cavidad (o que se puede hacer que forme una cavidad por compactación, según se ha descrito anteriormente), la cavidad si rellena con la suspensión líquida de células.

Se prefiere que los regímenes de tratamiento de la invención comiencen lo antes posible después de producida la lesión; sin embargo, puede ser ventajoso dejar que la sangre se coagule y se comience a formar un tejido de granulación de aparición temprana, que induzca o estimule el suministro de sangre. Convenientemente, el tratamiento comienza en el plazo de 24 horas a 4 semanas, típicamente en el plazo de 48 horas a 7 días.

En una realización preferida de la invención, la regeneración del tejido esquelético blando en el sitio de la lesión se vigila mediante ultrasonografía, incluyendo la medida de las superficies transversales (p. ej., mediante ultrasonografía). También es particularmente preferido que después del tratamiento, el paciente se someta a una procedimiento de rehabilitación que incluye ejercicio del sitio lesionado. Típicamente, si la superficie transversal del tejido dañado (tal como un tendón o un ligamento) aumenta en más del 10% en cualquiera de los niveles, el ejercicio se reduce, mientras que si permanece constante o disminuye, el ejercicio se incrementa gradualmente. El médico o el veterinario pueden diseñar fácilmente regímenes de rehabilitación adecuados (p. ej., ejercicio) teniendo en cuenta la naturaleza de la lesión, su tratamiento y el progreso hecho por el paciente en cuanto regenerar tejido esquelético blando adecuado en el sitio de la lesión. Un régimen de rehabilitación adecuado se muestra para el caso del tratamiento de SDFT en el caballo.

La invención se describirá ahora con más detalle haciendo referencia a las siguientes Figuras y Ejemplos no limitativos.

La Figura 1 muestran células madre mesenquimales que se adhieren a plástico después de una semipurificación a partir de médula ósea mediante centrifugación en Ficoll.

La Figura 2 muestra ultrasonografías del tendón flexor digital superficial de un poni de polo de 11 años de edad, con una tendinitis de flexor digital superficial de 5 semanas de duración, antes de la implantación de las células madre y 10 días después de la implantación de células madre. La lesión ocupa el 45% central del tendón y está llena de tejido granuloso/tejido fibroso joven. No se ha producido ningún trastorno significativo en el tendón en curación, debido al procedimiento de implantación.

(a) Imagen transversal del nivel 4 (20 cm distal al hueso carpiano accesorio).

(i) Antes de la implantación.

(ii) 10 días después de la implantación.

(b) Imagen longitudinal: 20 cm-24 cm distal al hueso carpiano accesorio.

(i) Antes de la implantación

(ii) 10 días después de la implantación.

La Figura 3 muestra barridos realizados después del tratamiento, según se describe en el Ejemplo 4.

Ejemplo 1

Aislamiento de células madre mesenquimales equinas procedentes de médula ósea y su implantación en el tendón flexor digital superficial como nuevo tratamiento potencial para la tendinopatía de flexor digital superficial

Materiales y métodos

Detalles del caso

Células MSC autólogas se reimplantaron después de su expansión *in vitro*, en un tendón flexor digital superficial dañado de un poni de polo de 11 años de edad será que había sufrido una lesión inducida por distensión de su tendón flexor digital superficial cinco semanas antes.

Aspiración de médula ósea

Tras la sedación (con hidrocloreuro de detomidina¹, 10 µg/kg (Domosedan, Pfizer Animal Health, Ramsgate, Kent) y butorfanol, 20 µg/kg (Torbugesic, Fort Dodge Animal Health, Southampton, UK)), se preparó una superficie de 5 cm x 20 cm a lo largo del esternón mediante rasurado y fregado. Después de la preparación aséptica, los espacios interesternales, fácilmente identificados mediante ultrasonografía diagnóstica, se marcaron sobre la piel usando un rotulador esterilizado. Una disolución para anestesia local (2 ml; mepivacaína (Intra-Epicaine, Arnolds, Shrewsbury, UK)) se infiltró por vía subcutánea sobre el punto medio del plano sagital de dos esternos adyacentes. Se hizo una incisión punzante con un escalpelo del número 11 a través de la piel. Una aguja Jamshidi para biopsias (11G, 10,16 cm (4 pulgadas)) se introdujo unos 4 cm-6 cm aproximadamente hasta que entró en contacto con la esternebra. Entonces se empujó otros 3 cm-4 cm hacia el interior de la esternebra y a continuación se aspiraron partes alícuotas de 1,8 ml de médula ósea de cada una de las dos esternos, con jeringuillas de 2 ml, precargadas con 1.000 UI de heparina (Heparin (Multiparin, CP Pharmaceuticals, Wrexham, UK); 5.000 UI/ml). Se extrajeron 5 partes alícuotas en la primera serie de aspirados, para cuantificar el número de células MSC y a continuación se extrajeron 2 partes alícuotas para realizar la preparación de las MSC para su reimplantación. Los 1,8 ml de los aspirados de médula se hicieron oscilar cuidadosamente y se transfirieron luego a tubos estériles de 5 ml y se colocaron sobre hielo para su inmediata transferencia al laboratorio.

20 *Aislamiento de células madre mesenquimales y su cultivo y expansión in vitro*

Las MSC se separaron usando una técnica similar a la descrita para el aislamiento de MSC en otras especies (Rickard y col., 1996). Brevemente expuesto, los 2 ml iniciales de un aspirado de médula ósea se extendieron con cuidado sobre 4 ml de Ficoll (Ficoll Paque PLUS, Amersham Pharmacia Biotech. UK Ltd., Little Chalfont, UK). Esta mezcla extendida se centrifugó luego a 1.510 rpm (400 g) durante 30 minutos de manera que se formó una capa leuco-plaquetaria (del inglés, "buffy coat"), de color pajizo, entre el plasma y el residuo de eritrocitos en el Ficoll. Esta capa leuco-plaquetaria se recuperó y se lavó añadiendo 10 ml de Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma Aldrich, Poole, UK; glucosa 4.500 mg/l, L-glutamina y piruvato sódico, con suero de ternera fetal al 10%, penicilina 50 UI/ml y estreptomycinina 50 µg/ml). La muestra se centrifugó a 2.000 rpm (702 g) durante 10 minutos para retirar la heparina y el Ficoll. El sobrenadante se desechó y el sedimento celular se resuspendió en 12 ml de DMEM. Esta suspensión celular se añadió luego a matraces T75.

Se dejó que las células primarias sembradas se adhirieran al matraz durante dos días antes de cambiar el medio, y después de ello el medio se cambió cada dos días durante 14-16 días, momento en el que las unidades formadoras de colonias se hicieron visibles. Estas células se traspasaron antes de alcanzar la confluencia, por medio de una tripsinización, a matraces T175, y después se expandieron durante otros 5-9 días hasta que fueron confluentes.

Las células se extrajeron de los matraces usando una digestión con tripsina y se centrifugaron a 2.000 rpm (702 g) durante 10 minutos para sedimentar las células. El sobrenadante de medio se desechó y el sedimento de células se resuspendió en 1 ml de DMEM recién preparado sin suero. Se aspiró una parte alícuota de 20 µl y sometió a recuento en un hemocitómetro para obtener el recuento de células por mililitro.

45 *Cuantificación de las MSCs en partes alícuotas sucesivas de médula ósea*

Para cuantificar el rendimiento de las MSC obtenidas de médula ósea equina, partes alícuotas sucesivas de 1,8 ml de médula ósea procedente de tres caballos diferentes (que incluían el caballo en el que se realizó la reimplantación) se cultivaron por separado. El número de células se determinó después de que las unidades formadoras de colonias se hubieron establecido, y al alcanzar la confluencia después del primer pase.

50 *Reimplantación de las MSC en una tendinopatía de flexor digital superficial*

Se sedimentaron de nuevo $6,4 \times 10^5$ células (para obtener 40.000 células-50.000 células/0,1 ml inyectados) mediante centrifugación y a continuación se resuspendieron en 1,5 ml de plasma rico en plaquetas (PRP). El PRP se preparó a partir de sangre recién obtenida, procedente del mismo caballo, recogiendo 10 ml de sangre en tubos esterilizados para recogida de sangre que contenían heparina, 500 UI/ml, y centrifugándolos a 1.620 g durante 12 minutos. Los 2,5 ml de plasma de la parte superior se desecharon y seguidamente se aspiraron 2,5 ml de PRP. Se ha encontrado que esta técnica produce un PRP con más de tres veces el número de plaquetas encontrado en el plasma normal.

Los 1,5 ml de suspensión celular se inyectaron luego dentro del tendón flexor digital superficial dañado del mismo caballo del que las células procedían originariamente. La inyección se realizó de manera estéril, bajo sedación y analgesia perineural, en el sitio metacarpiano proximal, en 15 inyecciones de 0,1 ml (aproximadamente 43.000 células/0,1 ml) administradas usando una aguja de 23G, de 2,54 cm (1 pulgada), a lo largo de la extensión de la lesión, desde las caras palmar y medial del tendón, al tiempo que se realizaba una vigilancia ultrasonográfica. La extremidad después se vendó con un vendaje estándar de Robert Jones modificado, de tres capas.

ES 2 359 890 T3

Resultados

Este protocolo dio como resultado la generación de unidades formadoras de colonias, características de las MSC de otras especies (Figura 1).

Cuantificación de las MSC en partes alícuotas sucesivas de médula ósea

El número de células recuperadas antes y después de efectuado el pase se muestra en la Tabla 1.

TABLA 1

Cuantificación de las MSC en partes alícuotas sucesivas de médula ósea después de su cultivo in vitro

Muestra	Número de células en las unidades formadoras de colonias (en subconfluencia)(x 10 ⁵)			Pase 1 (en confluencia)(x 10 ⁵)		
	1	2	3*	1	2	3*
Caballo núm.	1	2	3*	1	2	3*
Días de cultivo	19	16	14	5	5	9
Sangre periférica (control)	-	0	-	-	-	-
Parte alícuota 1	31	9,0	-	78	61,4	-
Parte alícuota 2	(alícuotas 1 + 2 reunidas)	21,4	-		58,7	-
Parte alícuota 3	-	2,2	-	-	44,6	45,2 ⁺
Parte alícuota 4	7,2	16,8	-	44,8	73	-
Parte alícuota 5	(alícuotas 4 + 5 reunidas)	21,8	-		66	-
MEDIA	12,2 (n=9)			47,1 (n=10)		

* = Caballo usado para la implantación

+ = Muestra usada para la implantación

Estos números de células reflejan el número relativo de las MSC aisladas en partes alícuotas procedentes del mismo caballo, ya que todas las muestras se traspasaron al mismo tiempo. Se obtuvieron aproximadamente un millón de células después del cultivo inicial durante 14-16 días. Además, esto muestra que el pase expande el número de células en un factor de entre 2 y 20 veces. No crecieron MSC en el cultivo de una muestra de control de sangre periférica.

Características de las lesiones

Había una región central hipoecoica en el tendón flexor digital superficial, que ocupaba el 45% de la superficie transversal del tendón en la zona en la que la lesión era máxima y se extendía desde la región metacarpiana media hasta la distal (niveles 3-5 (Smith y col., 1994); 16 cm-26 cm distal al hueso carpiano accesorio). La superficie transversal del tendón en la zona en la que la lesión era máxima fue el 64% más grande que la del tendón contralateral. La lesión central se había empezado ya a rellenar con tejido de granulación/fibroso ecogénico (Figura 2).

Reimplantación de las MSC

La colocación precisa de las MSC dentro de la lesión central del tendón se identificó claramente por las burbujas de aire introducidas en el momento de la inyección. Se observó que la mezcla de células/plasma inyectada se extendía en dirección próximo-distal a los límites de la lesión.

No hubo hinchazón observable de la extremidad después del procedimiento. En un nuevo examen, 10 días después de la implantación, no hubo cojera al andar y no hubo un aumento de engrosamiento en la región del tendón flexor digital superficial, aunque hubo dolor ligero a la presión digital. Una repetición de la ultrasonografía no mostró ningún cambio en la sustancia del tendón (Figura 2). Las medidas de la superficie transversal en los siete niveles mostraron un cambio mínimo por la reimplantación (porcentaje medio del cambio para todos los niveles, 0,46% (descenso); cambio máximo en uno cualquiera de los niveles, 9% (descenso)). No hubo por lo tanto ninguna alteración de la sustancia tendinosa.

Discusión

Esta nueva técnica proporciona un método para la reimplantación de un número grande de MSC autólogas, que han sido expandidas en cantidad *in vitro*, dentro del tendón dañado del mismo caballo. Estas células tienen el potencial de producir una auténtica matriz tendinosa en vez de un tejido cicatricial poco funcional, como sucede con la tendinopatía de flexor digital superficial tratada de modo convencional. La tendinopatía equina de flexor digital superficial, con su frecuente daño situado en posición central y rodeado de tejido tendinoso relativamente intacto o de un paratendón grueso (que invariablemente permanece intacto incluso después de las lesiones tendinosas más graves inducidas por una distensión), en un tendón del tamaño suficiente para hacer una práctica precisa una inyección intra-tendinosa, se presta perfectamente como vaso cerrado en el que implantar las MSC. Aunque la implantación de las MSC dentro de otras formas de tendones y ligamentos dañados (p. ej., lesiones excéntricas) puede también resultar beneficiosa, la colocación exacta, la retención de las células y la minimización del trauma iatrogénico causado por el procedimiento de la inyección son más problemáticos, pero aún así se pueden realizar, por ejemplo, usando suspensiones que gelifican *in situ*.

Hubo una mayor variación del número células antes del pase que después del pase porque el número de células medido antes del pase estaba en subconfluencia y estaba en relación con el número de unidades formadoras de colonias presentes en la placa, derivadas de las MSC individuales. El número de células en la confluencia después del pase se esperaba que fuera más constante debido a que las células se expanden hasta que cubren la totalidad de la superficie del matraz. Por lo tanto, el pase será con frecuencia necesario para expandir suficientemente el número de células.

Se hizo un intento para introducir aproximadamente 50.000 células/0,1 ml (aproximadamente 500.000 células en total). En vista de la rápida expansión de las células *in vitro* después del pase, se esperaba que este número de células fuera suficiente para poblar la lesión central del tendón. Ciertamente, la expansión de las MCS *in vitro* permite la implantación autóloga de un número considerablemente mayor de MSC del que se puede disponer de manera endógena o del que se puede suministrar mediante la inyección directa de médula ósea, y evita los potenciales efectos adversos de otros componentes de un aspirado de médula ósea. Además, el almacenamiento de un exceso de células congeladas proporciona una fuente adicional de MSC en el caso de que se requirieran con posterioridad.

En este caballo, se dejó tiempo suficiente para que tuviera lugar una angiogénesis adecuada y para que se formara tejido de granulación el cual sería más probable que soportara a las MCS que una lesión hemorrágica anterior. En un tejido tendinoso en las primeras fase de la cicatrización están presentes abundantes factores de crecimiento (Cauvin, 2001) y las MCS expandidas se suministraron en un plasma rico en plaquetas para aumentar este medio rico en factores de crecimiento.

Este estudio ha demostrado que los primeros mililitros de un aspirado de médula ósea procedentes del esternón pueden producir un número sustancial de MSC después de la expansión en cultivo (del orden de 10^6 células a partir de 1,8 ml de médula ósea). La técnica de recuperación de las MSC equinas a partir de médula ósea, de su cultivo y expansión *ex vivo*, y de su reimplantación es tanto racional como factible.

Desde el comienzo de este estudio, los autores han tratado 6 casos que se han resuelto bien. Dos caballos como defectos hipoecoicos obvios (“agujeros negros”) en el tendón, en el momento de la implantación mostraron un relleno rápido de los efectos. Los otros casos, que eran más crónicos, y por lo tanto ya rellenos largamente en el momento de implantación, mostraron un cambio menor.

Ejemplo 2

Protocolo más detallado para tratar una lesión en el tendón flexor digital superficial o en el ligamento suspensor

Criterios para la inclusión de casos

Lesión en el tendón flexor digital superficial o en el ligamento suspensor de la cara palmar del metacarpo, en la que no está implicada una vaina tendinosa. Solamente se incluirán las lesiones que tengan un núcleo central definido y la lesión actual debe tener una duración de más de 3 semanas y menos de 3 meses.

Protocolo

1) Reconocimiento médico de referencia que incluye un examen ultrasonográfico completo y obtención de una muestra de sangre (para la preparación de plasma enriquecido en plaquetas y del estudio de marcadores).

2) Superficies transversales del tendón dañado que han de ser calculadas, que incluyen la superficie transversal del tendón y de la lesión para los siete niveles transversales de la región metacarpiana, para obtener un porcentaje de implicación de la lesión (gravedad).

3) Después de la sedación (con un agonista alfa-2 y butorfanolphanol), de rasurado y fregado a lo largo del esternón, se identificarán las esternebras individuales usando ultrasonido diagnóstico y el espacio inter-esternal marcará en la piel con un rotulador esterilizado.

ES 2 359 890 T3

- 4) La infiltración local de un anestésico local se pondrá sobre el sitio de la aspiración de médula (en el centro de dos esterneas adyacentes). Se hace una incisión punzante a través de la piel usando un escalpelo del núm. 11. Una aguja de Jamshidi para biopsia se introduce hasta que choca con la esternebra. Se empuja unos 3 cm-4 cm más hacia el interior de la esternebra y a continuación se aspiran 2 partes alícuotas de 2 ml de cada una de las dos esterneas, en jeringuillas de 2 ml, precargadas con 500 UI de heparina (0,2 ml de una concentración de 5.000 UI/ml, en cada una de las jeringuillas).
- 5) Después de haberse obtenido las partes alícuotas, se extraen otros 20 ml de una de las esterneas con una jeringuilla precargada con la misma concentración de heparina (2 ml en una jeringuilla de 20 ml). El aspirado de médula ósea se centrifuga luego a 2.000 rpm durante 20 min y el sobrenadante se recoge, se transfiere a tubos esterilizados de 20 ml y se congela a -20°C.
- 6) Partes alícuotas de 2 ml se transfieren a tubos esterilizados de 5 ml.
- 7) Se transfieren de inmediato a Stanmore sobre hielo.
- 8) Las partes alícuotas se usan para recuperar y cultivar las MSC (véase el protocolo que se adjunta en la página 4).
- 9) Expansión de las MSC durante un período de aproximadamente 1-2 semanas hasta que se forman colonias de MSC sobre el plástico. Las células se someten a un pase y se expanden de nuevo (durante ~5 días hasta que se hacen confluentes), momento en el que hay aproximadamente 7×10^6 células/ml.
- 10) Se retiran las células de los matraces y se dividen en 3 partes alícuotas.
- 11) Se centrifugan en tubos esterilizados (1.000 rpm durante 10 minutos) para sedimentar las células.
- 12) Parte alícuota 1, se usa para caracterizar las células (es decir, para garantizar que son MSC).
- Parte alícuota 2, las células se congelan en DMSO (para su futuro uso potencial).
- Parte alícuota 3, se preparan para ser inyectadas.
- 13) Se retira el sobrenadante.
- 14) Se sedimentan las células (aproximadamente 7×10^6 células) se lavan con DMEM recién preparado sin suero.
- 15) Se centrifugan en tubos esterilizados (1.000 rpm durante 10 minutos) para sedimentar las células.
- 16) Se resuspenden las células en 2 ml de plasma rico en plaquetas (PRP) (o en sobrenadante de médula), previamente descongelado, derivado del mismo caballo.
- 17) Se inyectan las células en el tendón dañado y de manera estéril, bajo sedación y analgesia perineural, usando múltiples pinchazos de la aguja (23G, aguja de 2,54 cm (una pulgada)), 10 inyecciones de 0,1 ml a todo lo largo de la lesión.
- 18) Se venda la extremidad con un vendaje estándar de Robert Jones modificado.
- 19) Se escanean los tendones a los 3 días de la inyección y después el caballo es dado de alta en el hospital.
- 20) Se escanean los tendones a los 3 días de la inyección y después el caballo es dado de alta en el hospital.
- 21) El caballo descansa en el box durante 1 semana y después se le pasea con ejercicio controlado durante 3 semanas más antes de repetir el análisis ultrasónico.
- 22) Se repiten los exámenes ultrasónicos y la obtención de muestras de sangre mensualmente, al mismo tiempo que se sigue el programa de ejercicios controlados que se muestra a continuación:

ES 2 359 890 T3

Directrices para un programa de ejercicio controlado

Nivel	Mínimo de semanas transcurridas después de la lesión	Duración y naturaleza del ejercicio
1	0 - 8	30 minutos de paseo diario, aumentándolos progresivamente hasta 45 minutos
2	9 - 32	paseo + 5 minutos al trote aumentándolos progresivamente hasta 30 minutos
	9 - 12	40 minutos de paseo y 5 minutos al trote diariamente
	13 - 16	35 minutos de paseo y 10 minutos al trote diariamente
15	17 - 24	30 minutos de paseo y 15 minutos al trote diariamente
	25 - 28	25 minutos de paseo y 20 minutos al trote diariamente
	29 - 32	15 minutos de paseo y 30 minutos al trote diariamente
3	33 - 52	paseo y trote con trabajo limitado a medio galope
20	33 - 36	45 minutos de ejercicio diario con medio galope lento hasta 1.609,34 m (1 milla) como máximo dos veces a la semana
	37 - 40	45 minutos de ejercicio diario con medio galope lento hasta 2.414,01 m (1,5 millas) como máximo dos veces a la semana
25	41 - 44	45 minutos de ejercicio diario con un galope de 603,50 m (3 estadios) tres veces a la semana
	45 - 48	45 minutos de ejercicio diario con un galope de 1.207,00 m (6 estadios) tres veces a la semana
30	49 - 52	Aumento gradual del nivel de ejercicio hasta llegar al entrenamiento completo para carrera/competición
4	A partir de las 52 semanas	Entrenamiento completo para carreras/competición

23) Se comparan los resultados con un grupo de caballos de edades parejas, con lesiones similares tratadas de una manera conservadora con solamente el anterior programa de ejercicios.

Medidas realizadas durante la evolución

Evolución ultrasonográfica

Niveles de marcadores

Evolución atlética

En caso de que el animal sea sacrificado mediante métodos de eutanasia, se recupera el tendón para someterlo a análisis mecánicos y de la matriz.

Protocolo para el aislamiento de células madre mesenquimales equinas procedentes de médula ósea

Materiales

Ficoll	Médula
Jeringuilla de 5 ml	3x Pipeta de 12 ml
Aguja hipodérmica verde	Pipeta automática
Universal	Cubo de desechos
2x Pipeta de transferencia	

ES 2 359 890 T3

Gradiente de Ficoll

1. Se invierte la botella de Ficoll para mezclar su contenido, se desprende el tapón de polipropileno, se inserta una jeringuilla a través del septo y se inyecta aire para igualar la presión. Se invierte la botella y se extraen 3 ml de líquido.
2. Se extienden con cuidado 4 ml de médula ósea sobre 30 ml de Ficoll. Se consigue una mejor disposición de las dos capas manteniendo el universal derecho y dispensando la médula lentamente, dejándola caer por el lateral del universal.
3. Se centrifuga a 1.510 rpm durante 30 minutos (el programa 5 de la centrífuga en la cámara 2 se detiene lentamente y no revuelve las capas) de manera que se forma una capa leuco-plaquetaria de color pajizo entre el plasma y el residuo de eritrocitos en el Ficoll.
4. Se traslada la capa leuco-plaquetaria a un universal recién preparado usando una pipeta de transferencia. Solamente deben quedar células mononucleares en la suspensión.

Siembra de los matraces

20 *Materiales*

DMEM: 500 ml; glucosa 4.500 mg/l, L-glutamina y piruvato sódico, 50 ml de suero de ternera fetal al 10%, Penicilina 50 U/ml y Estreptomocina 50 µg/ml

25 2x T75/2x T25

Cubo de desechos

aguja del 23

30 jeringuilla de 5 ml

3x pipetas de 12 ml

35 5. Se lava la capa leuco-plaquetaria resuspendiendo las células en 10 ml DMEM. Se centrifuga a 1.500 rpm durante 10 minutos para separar la heparina y el Ficoll.

6. Se retira el sobrenadante. Las células madre deben estar en el sedimento.

40 7. Se resuspende el sedimento en 2 ml de DMEM usando una aguja hipodérmica de calibre 23 para obtener una suspensión de un solo tipo de células aisladas.

8. Se reparten las células en los dos matraces T75. Los matraces T25 se pueden usar si solamente se hubiera recogido un volumen pequeño de aspirado.

45

Lavado de las células

50 9. Se deja que las células primarias sembradas se adhieran al matraz durante dos días antes de cambiar el medio. (Si las células se han instalado en un jueves, déjense durante el fin de semana).

10. Se cambia el medio cada dos días.

55 *Observaciones*

- Los matraces pueden mostrar un aspecto turbio. Esto es debido a que en la suspensión hay eritrocitos que se retirarán mediante lavado en los lavados posteriores con DMEM.

60 - Las células madre se puede observar inicialmente como objetos redondos y brillantes que se han adherido al matraz al contrario que las células de alrededor que permanecen en suspensión.

- Las CFU-F se deben observar después de dos semanas en cultivo.

65 NB Se producen 100-500 MSC humanas a partir de 50 millones-100 millones de células introducidas en el cultivo (Hayensworth S.E. y col.).

Células madre de caballo

ES 2 359 890 T3

Objetivo

Aislamiento y expansión de MSC de caballo con el fin de reinyectar las células en el tendón.

5

Hipótesis

El número de células presentes en los 4 ml iniciales de aspirado extraído de la médula del caballo producirán un número de células mayor en comparación con los 4 ml finales.

10

1. Se extrajo un aspirado de médula del esternón del caballo en las siguientes partes alícuotas (se usó heparina en una concentración 500 U/ml):

15

1) Muestra 1: 1 ml-2 ml

2) Muestra 2: 3 ml-4 ml

3) Muestra: 5 ml-6 ml (administrada al caballo)

20

4) Muestra 3: 7 ml-8 ml

5) Muestra 4: 9 ml-10 ml

25

2. Las muestras 1 y 2 se reunieron para obtener los primeros 4 ml de una muestra de 10 ml. Las muestras 3 y 4 se reunieron para obtener los 4 ml finales de la muestra de 10 ml. Se les dio las denominaciones de:

- HS1 A: Muestra 1 + 2

- HS1 B: Muestra 3 + 4

30

3. Se continuó con la técnica para aislar células madre a partir de médula ósea anteriormente descrita. Las células se traspasaron a 2 matraces T75 y se dejaron en cultivo durante 19 días.

35

4. Se efectuó el recuento de las células y se traspasaron a 2 matraces T175.

Recuento celular:

HSA1 P0 T75 $3,1 \times 10^6$ células/ml

HSB1 P0 T75 $7,2 \times 10^5$ células/ml

40

5. Las células se cultivaron durante 5 días hasta que alcanzaron la confluencia. El recuento de las células se efectuó en P1 y se congelaron en DMSO.

45

Recuento celular:

HSA 1 P1 T175 $7,8 \times 10^6$ células/ml

HSB 1 P1 T175 $4,48 \times 10^6$ células/ml

50

Resultados

Recuento celular efectuado en P0:

55

HSA 1 P0 T75 $3,1 \times 10^6$ células/ml

HSB 1 P0 T75 $7,2 \times 10^5$ células/ml

Recuento celular efectuado en P1:

HSA 1 P1 T 175 $7,8 \times 10^6$ células/ml

60

HSA 1 P1 T175 $4,48 \times 10^6$ células/ml

Conclusión

65

Hay una mayor producción de células en los 4 ml iniciales de aspirado en comparación con los últimos 4 ml de la médula extraída.

ES 2 359 890 T3

Ejemplo 3

Cuidados postoperatorios y programa de ejercicio controlado después del tratamiento con células madre

5 Lesión: Tendinitis de flexor digital superficial

Nivel	Número mínimo de semanas transcurrido después de la lesión	Duración y naturaleza del ejercicio
10	0 - 2	Descanso en el box con vendaje
	Entre 1 y 2 semanas	Se repite la ecografía en el RVC
1	3 - 4	10 minutos de paseo controlado; se mantiene el vendaje permanente
15	5 - 6	20 minutos de paseo controlado; se mantiene el vendaje permanente
	7 - 8	30 minutos de paseo controlado; se mantiene el vendaje permanente
20	Entre 7 y 8 semanas	Se repite la ecografía en el RVC
2	9 - 10	40 minutos de paseo y 5 minutos al trote diariamente; puede ser montado
	13 - 16	35 minutos de paseo y 10 minutos al trote diariamente
25	17 - 24	30 minutos de paseo y 15 minutos al trote diariamente
	25 - 28	25 minutos de paseo y 20 minutos al trote diariamente
	29 - 32	15 minutos de paseo y 30 minutos al trote diariamente
	Entre 31 y 32 semanas	Se repite la ecografía en el RVC
30	33 - 36	45 minutos de ejercicio diario con medio galope lento hasta 1.609,34 m (1 milla) como máximo dos veces a la semana
	37 - 40	45 minutos de ejercicio diario con medio galope lento hasta 2.414,01 m (1,5 millas) como máximo dos veces a la semana
35	41 - 44	45 minutos de ejercicio diario con un galope de 603,50 m (3 estadios) tres veces a la semana
	45 - 48	45 minutos de ejercicio diario con un galope de 1.207,00 m (6 estadios) tres veces a la semana
40	49 - 52	Se aumenta gradualmente el nivel de ejercicio hasta llegar al entrenamiento completo para carrera/competición
	Entre 51 y 52 semanas	Se repite la ecografía en el RVC
45	4	A partir de las 52 semanas
		Entrenamiento completo para carreras/competición

La repetición de ecografías que se muestra corresponden al número mínimo. Se pueden realizar nuevos exámenes cuando sea necesario.

Este programa de ejercicios se puede modificar (acortar o alargar) dependiendo de la evolución del caso.

55 Ejemplo 4

El tratamiento que usa una inyección directa de médula ósea posteriormente produjo osificación

Informe veterinario: 1

60 Asunto: Caso núm. 333942, "Setta", una hembra TB de color gris y de 10 años de edad

Fecha del examen: 6-19 de junio de 2002

65 *Historial clínico:* El poni anteriormente mencionado fue remitido al *Royal Veterinary College* para una inyección de médula ósea de una lesión de su tendón flexor digital superficial en la extremidad anterior izquierda.

ES 2 359 890 T3

Reconocimiento físico: En el reconocimiento inicial había solamente un ligero engrosamiento en el tendón flexor digital superficial de su extremidad anterior izquierda, en la región metacarpiana media, aunque todavía había una moderada respuesta de dolor frente a la palpación. Además, se apreciaba que había un leve engrosamiento del tendón flexor superficial digital en la región metacarpiana media de la pata anterior derecha.

5 *Ultrasonografía:* La ultrasonografía reveló la presencia de una lesión central grande en el SDFT anterior izquierdo, que ocupaba aproximadamente el 55% de la superficie transversal del tendón en la zona de lesión máxima (entre los niveles 3 y 4). Esta lesión se extendía a través de la mayor parte de la longitud de la región metacarpiana. En la extremidad anterior derecha había también una lesión central, pero ésta era mucho más pequeña y se restringía a los niveles 3 y 4. No es inusual que una tendinitis bilateral esté presente. Los cambios ultrasonográficos fueron consecuentes con el historial clínico de una duración de la lesión de 4 semanas.

15 Este caso se resolvió bastante bien con un tratamiento conservador, aunque sin embargo, la extensión de la lesión indicaba que ciertamente no había un buen pronóstico para un retorno a un alto nivel de ejercicio. Se trataron los diferentes pros y contras de considerar una inyección de médula ósea, siendo la razón fundamental suministrar células madre mesenquimales, con o sin factores de crecimiento asociados, que puedan mejorar la curación total de las lesiones de tendones/ligamentos.

20 *Cirugía:* Después de tratar extensamente el caso con el dueño, se decidió que se probaría la inyección de médula ósea en este caso. Ésta se realizó el 7 de junio de 2002, y la médula ósea se obtuvo de las esterneras bajo anestesia general. Se modificó la técnica procedente de Estados Unidos, previamente descrita, en la que se obtienen volúmenes grandes de médula ósea procedentes de las esterneras y se inyectan en el tendón. Existen dos razones por las que la técnica se modificó. En primer lugar, volúmenes grandes de fluido causarían una considerable alteración en un tendón ya mínimamente dilatado, lo cual se pensó que sería contraproducente. Pero además, existe evidencia por un trabajo llevado a cabo en el *Institute of Orthopaedics* en Stanmore, que sugiere que la mayoría de las células madre mesenquimales están presentes en los primeros mililitros de un aspirado de médula ósea. Por lo tanto, se extrajeron distintos aspirados de médula ósea procedentes de esterneras distintas, en partes alícuotas de 2 ml, y se inyectaron tanto en el tendón flexor digital superficial derecho como en el izquierdo, a través de múltiples incisiones punzantes. En total se inyectaron 6 ml de aspirado de médula ósea dentro de la lesión central del SDFT de la extremidad anterior izquierda y 4 ml en el SDFT de la extremidad anterior derecha. El caballo se recuperó bien de la GA y las extremidades permanecieron vendadas para prevenir una hinchazón postoperatoria.

35 *Evolución clínica:* Dos escáneres postoperatorios mostraron que las inyecciones se habían puesto con precisión en el interior de la lesión central de ambas extremidades. Hubo un cierto aumento de heterogeneidad en las lesiones, pero éstas no aumentaron de tamaño, lo cual animaba y apoyaba la decisión de no usar volúmenes grandes. Hubo una cierta hinchazón peritendinosa, aunque fue mínima y el aspecto estético del tendón en esta etapa fue muy satisfactorio.

40 *Instrucciones para el alta:* El caballo fue dado de alta el 19 de junio y se le mandó que regresara para un escáner de seguimiento en los siguientes días:

Informe veterinario: 2

45 Fecha del reconocimiento: 1 de agosto de 2002

50 *Historial clínico:* El caballo había sufrido una tendinitis del tendón flexor digital superficial, que se había tratado con una inyección de médula ósea el 7 de junio de 2002. Este reconocimiento corresponde por lo tanto a 8 semanas después de tratamiento. El caballo recibe actualmente un paseo controlado en cantidad variable, entre de 10 a 30 minutos al día.

55 *Evaluación de la andadura:* Setta se mantuvo firme fue firme en el paseo, pero presentó una extensión ligeramente reducida de la articulación metacarpo falangeal. Exhibió una cojera de la extremidad anterior izquierda 1/10 en el trote en línea recta, con cierta molestia suave cuando giraba. Dada la ausencia de herraduras, esta molestia puede ser debida a dolor en las patas.

60 *Reconocimiento físico:* Había solamente una ligera hinchazón de la región metacarpiana de la extremidad anterior izquierda. Había una hinchazón mínima en la extremidad anterior derecha. No se evidenció enema y los bordes del tendón estaban perfectamente definidos y suaves a la palpación. Una respuesta moderada se inició por presión digital en los tendones flexores en ambas extremidades anteriores.

65 *Ultrasonografía:* La ecografía mostró que las lesiones centrales se estaban rellenando en ambas extremidades anteriores, aunque sin embargo este tejido no exhibió un fuerte patrón estriado en ese momento. No hubo incremento en la superficie mineralizada previamente observada en el SDFT delantero izquierdo aunque hubo una pequeña superficie proximal a ésta que puede estar desarrollando cierta mineralización. En la actualidad no hay ninguna zona de sombreado, y es una superficie localizada muy pequeña, pero esta superficie será vigilada cuidadosamente en el futuro.

Comentarios y recomendaciones: La evolución de este caballo es buena; sin duda alguna el tratamiento no parece haber empeorado la situación, y la lesión centra se está rellenando bien. Es difícil saber si esto es más rápido o de mejor calidad, solamente el tiempo dirá a medida que el tejido madure.

5 Informe veterinario: 3

Fecha del reconocimiento: 2 de junio de 2003

10 *Historial clínico:* Este poni había sufrido una tendinitis del tendón flexor digital superficial en la extremidad anterior izquierda en mayo de 2002. El *Royal Veterinary College Equine Referral Hospital* había admitido el 6 de junio de 2002 el tratamiento en el interior de la lesión con médula ósea aspirada del esternón e inyectada directamente en el tendón de ambas extremidades anteriores, derecha e izquierda. Esto se realizó mediante anestesia general. Desde
15 entonces el caballo ha vuelto a ser examinado el 1 de agosto de 2002, que fue unas seis semanas más o menos después del tratamiento. En esta etapa hubo una hinchazón mínima en la región metacarpiana del SDFT de la extremidad anterior izquierda. La superficie de mineralización en el SDFT que se había observado antes del tratamiento, no era mayor, aunque había una superficie extra que tenía un aspecto un poco sospechoso de haber desarrollado cierta mineralización. El caballo no volvió a tener nuevos reconocimientos hasta el 2 de junio de 2003. El poni actualmente ha
20 vuelto a jugar al polo sin problemas obvios.

Evaluación de la andadura: El poni se mantuvo firme al paso y al trote en línea recta.

25 *Reconocimiento físico:* Había un ligero alargamiento en el tendón flexor superficial en la región metacarpiana media de la extremidad anterior izquierda, pero no hubo dolor importante a la palpación. Sin embargo, sí pareció haber un incremento en la rigidez de los SDFT derecho e izquierdo, siendo más marcada en la extremidad anterior izquierda. El reconocimiento en el trabajo a la cuerda sobre una superficie dura reveló una cojera mínima. No obstante, las pruebas de flexión fueron positivas en ambas extremidades derecha e izquierda, exacerbándose la cojera en 3/10 y 2/10 respectivamente.

30 *Examen ultrasonográfico:* Este reconocimiento reveló la presencia de una mineralización extensa dentro de la región metacarpiana anterior derecha del tendón flexor digital superficial, con múltiples artefactos de sombreado. Es difícil afirmar la calidad del resto del tendón en proceso de curación debido a este sombreado creado por estos artefactos. Hubo un pequeño grado de mineralización también presente en la extremidad anterior derecha.

35 *Examen radiográfico:* Se obtuvieron radiografías lateromediales de ambas regiones metacarpianas. Esto reveló una mineralización intratendinosa en el interior del tendón flexor digital superficial, pero ninguna evidencia de una mineralización detectada radiográficamente en la extremidad anterior derecha.

40 *Sumario:* Parecería que la mineralización ha avanzado considerablemente en el SDFT anterior izquierdo, muy probablemente a consecuencia de la inyección de médula ósea. El aspecto de estos tendones es decepcionante, aunque esto obviamente no compromete la capacidad del animal para jugar polo en la actualidad.

45 La modificación para usar las células en cultivo como una manera alternativa para proporcionar las células necesarias para reparar en una tendinitis de SDFT, se considera que disminuye el riesgo de mineralización.

Referencias

50 **Caplan, A.I y Bruder, S.P. (2001)** Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med.* 7, 259-264.

55 **Carter, D.R., Beaupre, G.S., Giori, N.J., y Helms, J.A. (1998)** Mechanobiology of skeletal regeneration. 1: *Clin Orthop* 1998 Oct; (355 Suppl): S41-55.

Cauvin, E.R.J. (2001) An investigation into the roles of transforming growth factor-beta (TGF β) in the development, adaptation, and repair of equine tendons. PhD thesis, University of London.

60 **Dahlgren, L.A., Nixon, A.J. y Brower-Toland, B.D. (2002)** Effects of beta-aminopropionitrile on equine tendon metabolism *in vitro* and on effects of insulin-like growth factor-I on in vitro production by equine tenocytes. *Am. J. Vet. Res.* 62, 1557-1562.

65 **Dowling, B.A., Dart, A.J., Hodgson, D.R. y Smith, R.K. (2000)** Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine vet. J.* 32, 369-378.

Dyson, S.J., Arthur, R.M., Palmer, S.E. y Richardson, D. (1995) Suspensory ligament desmitis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 11, 177-215.

ES 2 359 890 T3

Dyson, S.J. (2000) Proximal suspensory desmitis in the forelimb and the hindlimb. *Proc. Am. Ass. Equine Practnrs.* **46**, 137-142.

5 **Genovese, R.L.** (1992) Sonographic response to intralesional therapy with beta-aminopropionitrile fumarate for clinical tendon injuries in horses. *Proc. Am. Ass. Equine Practnrs.* **38**, 265-272.

Herthel, DJ. (2001) Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by stem cells and other bone marrow components, *Proc. Am. Ass. Equine Practnrs.* **47**, 319-321.

10 **Hildebrand, K.A., Jia, F. y Woo, S.L.** (2002) Response of donor and recipient cells after transplantation of cells to the ligament and tendon. *Microsc. Res. Tech.* **58**, 34-38.

Rickard, D.T., Kassem, M., Hefferan, T.E., Sarkar, G., Spelsberg, T.C. y Lawrence Riggs, B. (1996) Isolation and characterisation of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J. Bone Min. Res.* **11**, 312-324.

15 **Reef, V.B., Genovese, R.L. y Davis, W.M.** (1997) Initial long term results of horses with superficial digital flexor tendonitis treated with intralesional beta-aminopropionitrile fumarate. *Proc. Am. Ass. Equine Practnrs.* **43**, 301-305.

20 **Reef, V.B., Genovese, R.L., Byrd, J.W., Reed, K.P. y Davis, W.M.** (1996) Treatment of superficial digital flexor tendon injuries with beta-aminopropionitrile (BAPN-F): sonographic evaluation of early tendon healing and remodeling. In Proceedings of the First Dubai International Equine Symposium. The Equine Athlete: Tendon, Ligament, and Soft Tissue Injuries. Rantanen, N.W. and Hauser, ML, (Eds.), pp. 423-430. Dubai, M.R. Rantanen Design.

25 **Smith, R.K.W., Jones, R. y Webbon, P.M.** (1994). The cross-sectional areas of normal equine digital flexor tendons determined ultrasonographically. *Equine vet. J.* **26**, 460-465.

Young, R.G., Butler, D.L., Weber, W., Caplan, A.I., Gordons S.L. y Fink, D.J. (1998) Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J. Orthop. Res.* **16**, 406-413.

30 **Woo, S.L., Hildebrand, K., Watanabe, N., Fenwick, J.A., Papageorgiou, C.D. y Wang, J.H.** (1999) Tissue engineering of ligament and tendon healing, *Clin. Orthop.* **367** Suppl., S312-323.

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 359 890 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de MSC ó MSC y tenocitos derivados de las mismas en suspensión líquida de sobrenadante de médula ósea en donde la composición de MSC está enriquecida en comparación con una fuente natural de células.
2. Una composición según la reivindicación 1, en donde el enriquecimiento de MSC es al menos 2 veces superior al contenido de la fuente natural que se ha enriquecido.
- 10 3. Una composición según cualquier reivindicación precedente, en donde el enriquecimiento de MSC es al menos 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces o al menos 30 ó 40 ó 50 ó 100 veces, o al menos 1000 veces o 10^4 veces ó 10^5 veces.
- 15 4. Uso de un composición de MSC o MSC y/o tenocitos derivados de las mismas en una suspensión líquida de sobrenadante de médula ósea para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de lesiones en el tejido esquelético blando de un paciente.
- 20 5. Un uso según la reivindicación 4, en donde la lesión es en un tendón, ligamento, disco intervertebral o menisco de un ser humano, caballo, camello o perro.
- 25 6. Un uso según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde la lesión es subcutánea o una laceración accidental.
- 30 7. Un uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en donde el tejido esquelético blando se selecciona del grupo que consiste en: cuando el paciente es un caballo o un camello: tendón flexor digital superficial (SDFT), ligamento suspensor, tendón flexor profundo, ligamento accesorio del tendón flexor digital profundo (DDFT), menisco, ligamentos cruzados; cuando el paciente es un perro: tendón de Aquiles, ligamento cruzado, menisco y tendón flexor; y cuando el paciente es un ser humano: tendón de Aquiles, tendón del cuádriceps, manguito de los rotadores, epicondilitis lateral o media, disco intervertebral y menisco.
- 35 8. Una composición o uso según cualquier reivindicación precedente, en donde las células de la composición contienen al menos 10% de MSC, o al menos 50% de MSC, o al menos 60% de MSC, o al menos 70% de MSC, o al menos 90% de MSC, o al menos 95% de MSC, o al menos 99% de MSC.
- 40 9. Una composición o uso según cualquier reivindicación precedente, en donde la suspensión líquida es tal que gelifica *in situ*, o en donde la suspensión líquida comprende un agente gelificante.
- 45 10. Un uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-9, en donde el paciente es un ser humano.
- 50 11. Una composición o uso según cualquier reivindicación precedente, en donde la composición además comprende señales biológicas para estimular la diferenciación de MSC en tipos de células que son útiles para la regeneración de lesiones del tejido esquelético blando y no estimulan la diferenciación de MSC en tipos de células que no son útiles.
- 55 12. Una composición o uso según la reivindicación 11, en donde las señales biológicas comprenden uno o más factores de crecimiento, factores de diferenciación o factores de regeneración.
- 60 13. Una composición o uso según la reivindicación 12, en donde el o los factores de crecimiento, factores de diferenciación o factores de regeneración comprenden TGF beta, IGF 1, IGF 2, PDGF, FGF ó COMP.
- 65 14. Una composición o uso según cualquier reivindicación precedente, en donde las MSC y/o tenocitos son alogénicos o autólogos.
15. Una composición según cualquier reivindicación precedente, en donde las MSC se derivan o bien: i) de la médula ósea del individuo que se va tratar; o bien ii) de la sangre de cordón umbilical del individuo que se va a tratar, recuperada con anterioridad.

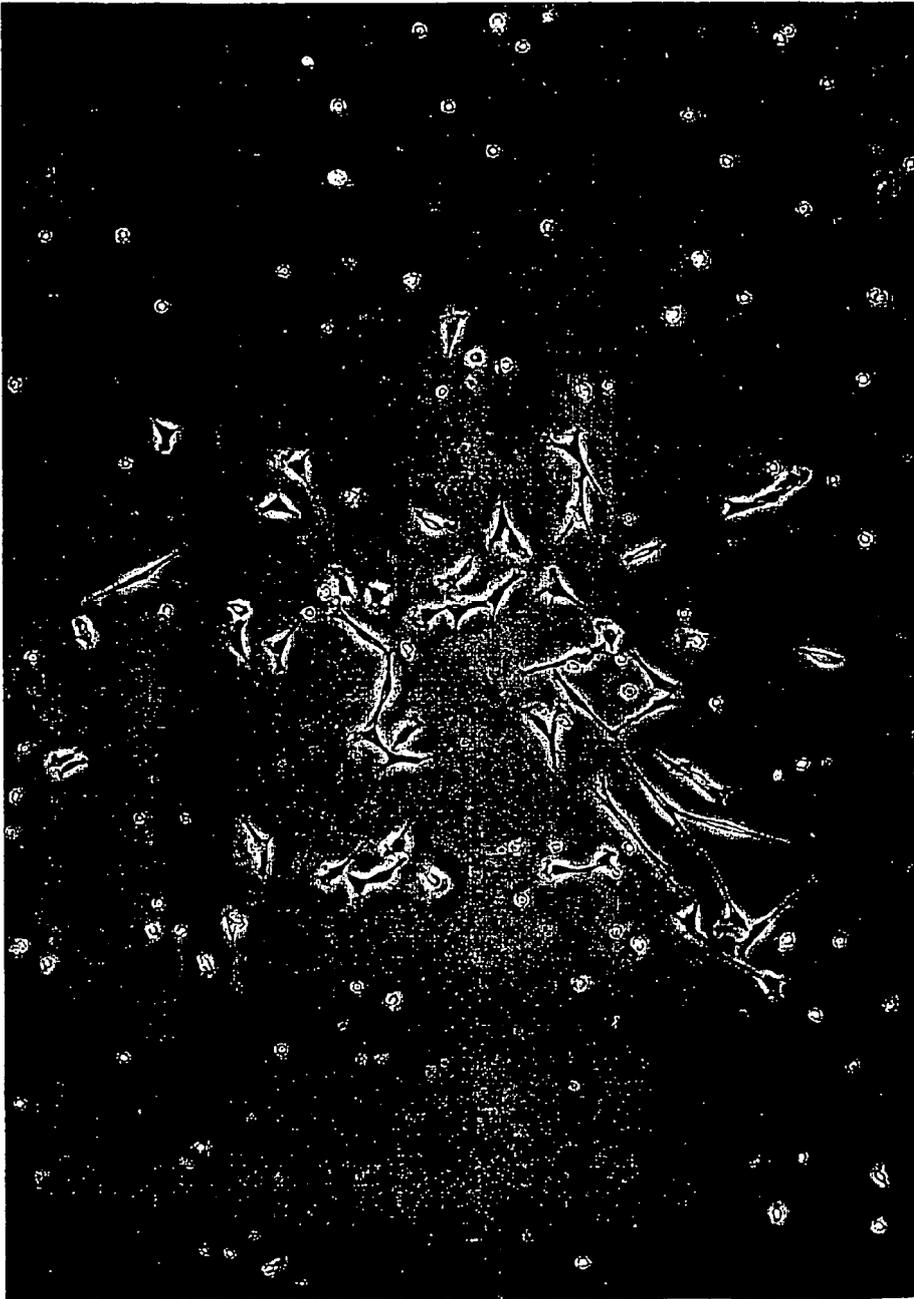


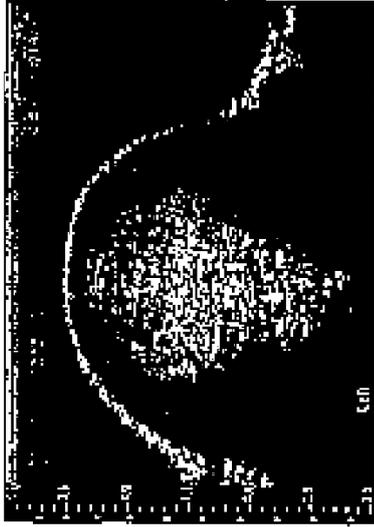
Fig. 1

(a) Imagen transversal del nivel 4 (20cm distal al hueso carpiano accesorio)

(i) Antes de la implantación

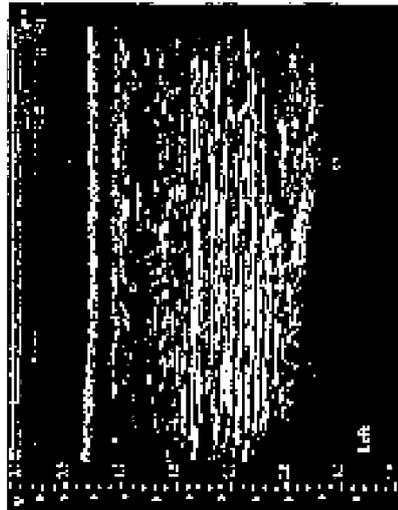


(ii) 10 días después de la implantación



(b) Imagen longitudinal -20-24cm distal al hueso carpiano accesorio

(i) Antes de la implantación



(ii) 10 días después de la implantación

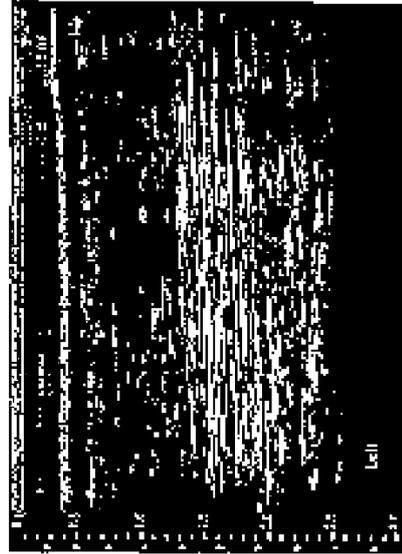


Fig. 2

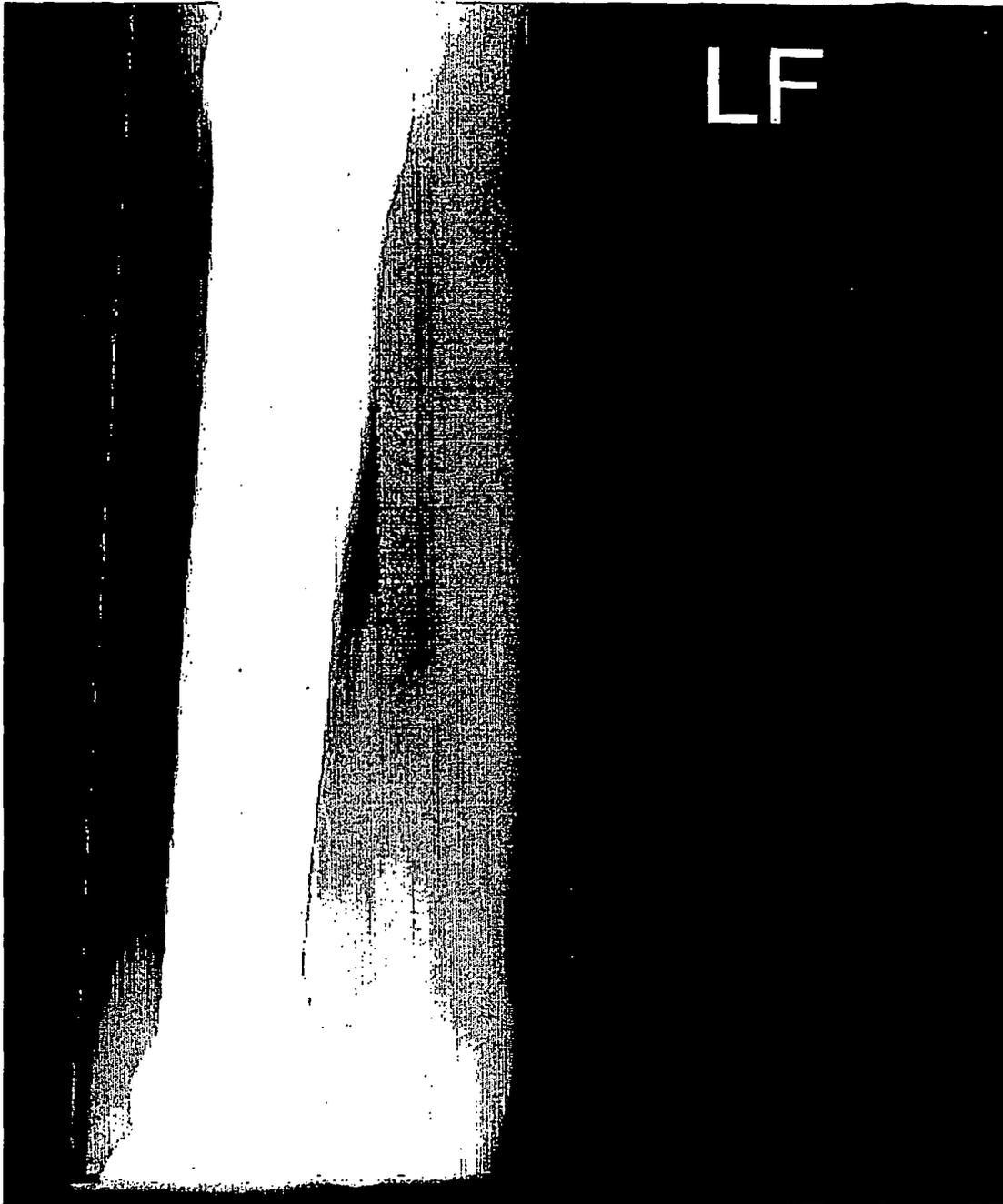


Fig. 3a

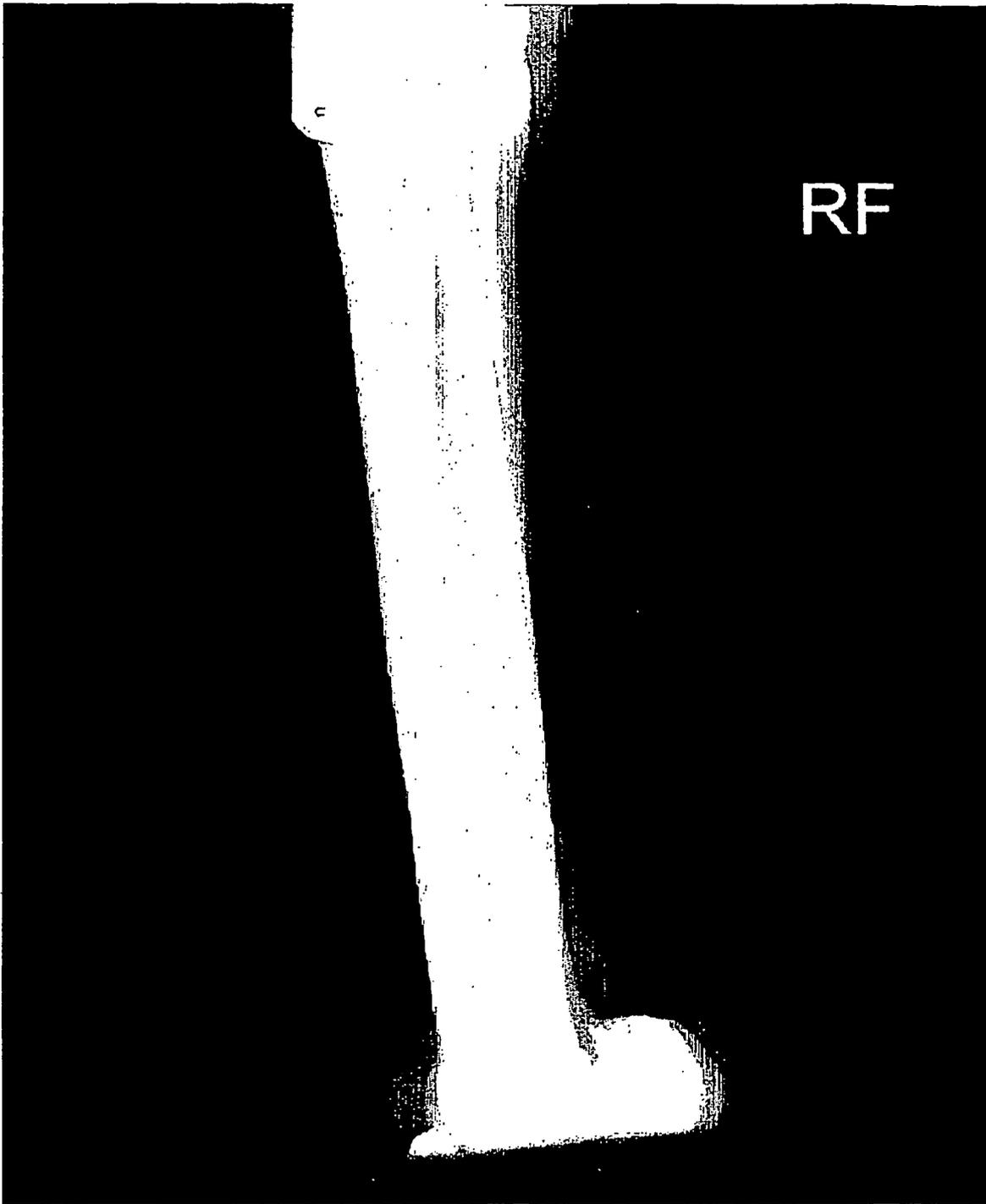


Fig. 3b

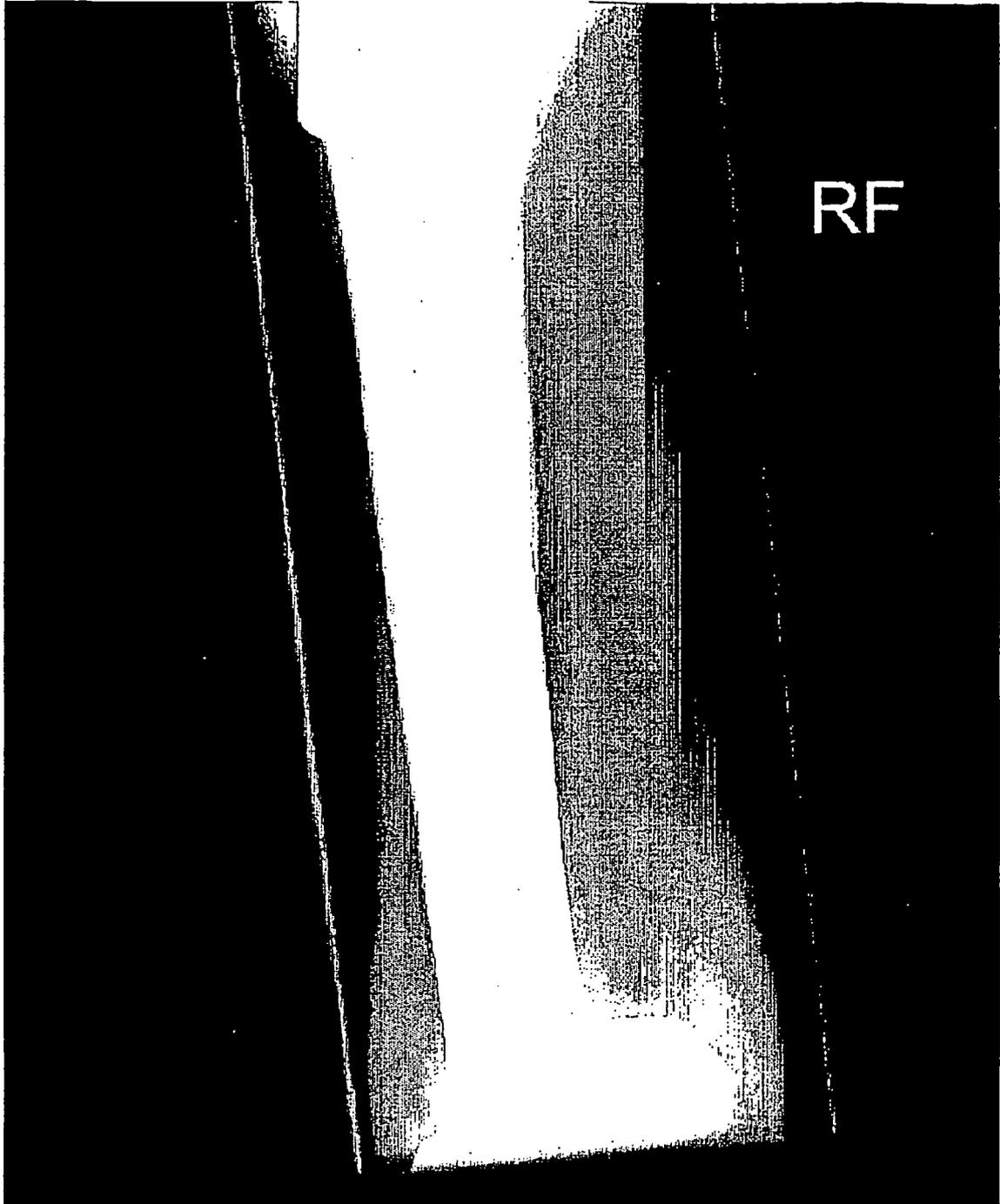


Fig. 3c

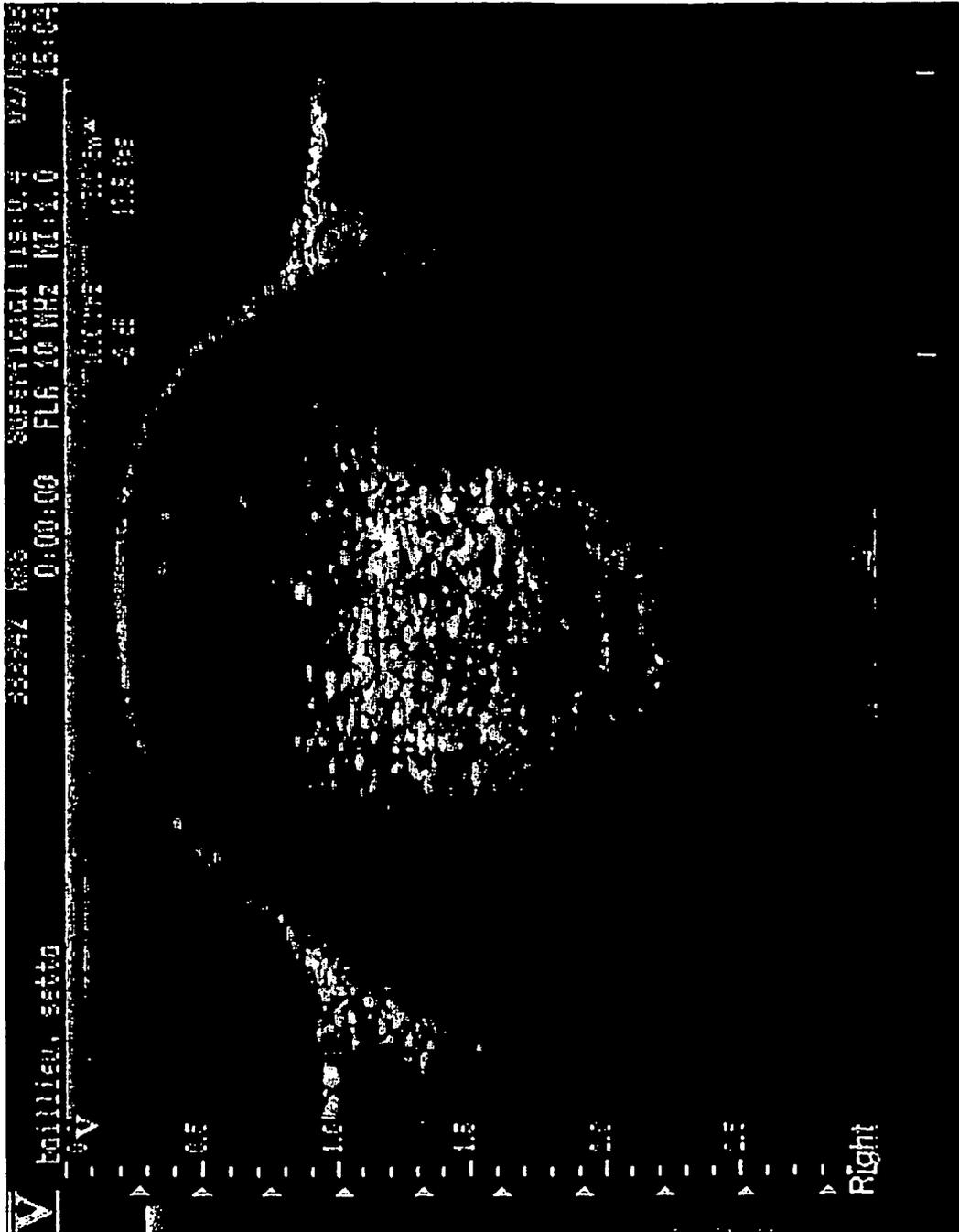


Fig. 3d

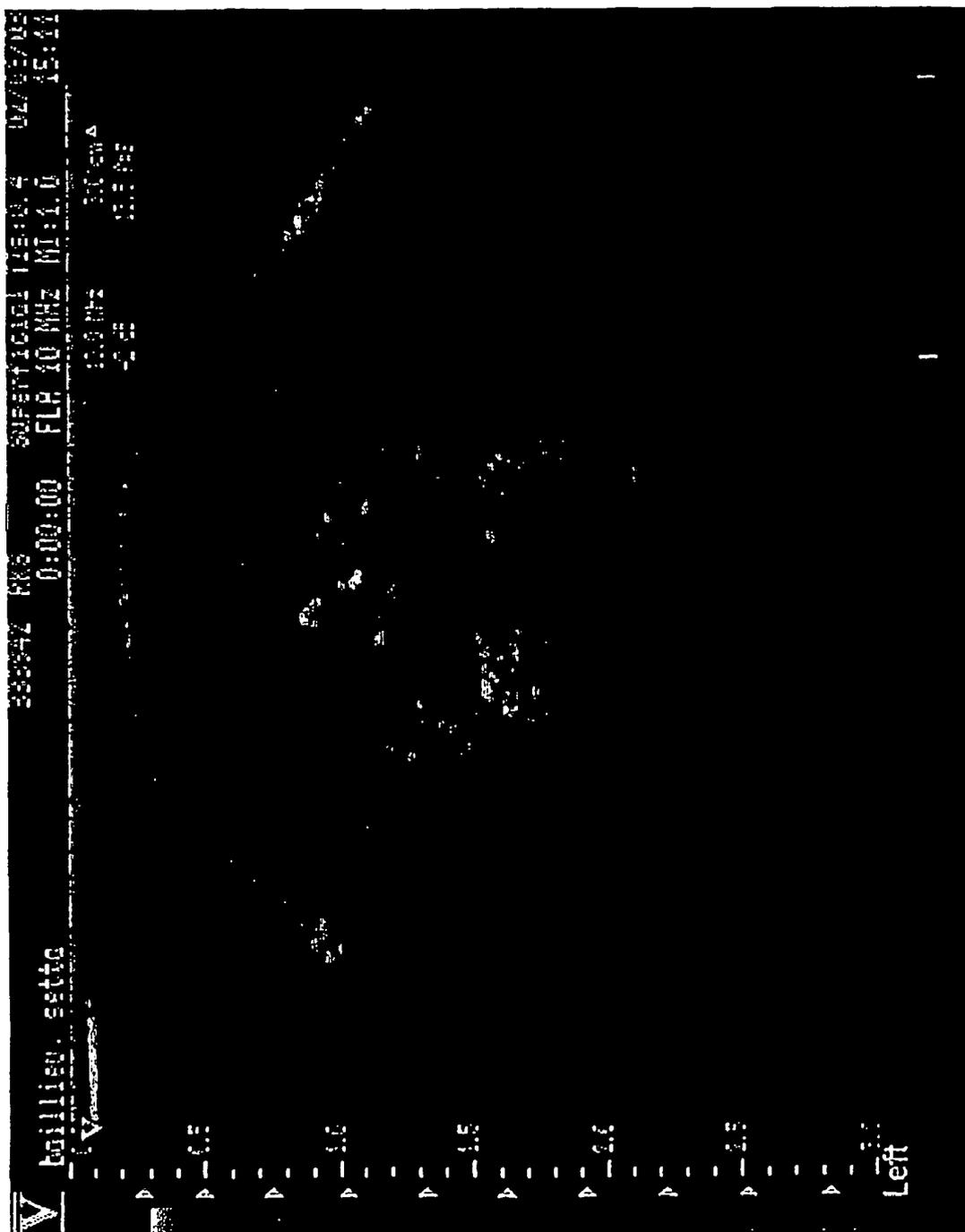


Fig. 3e

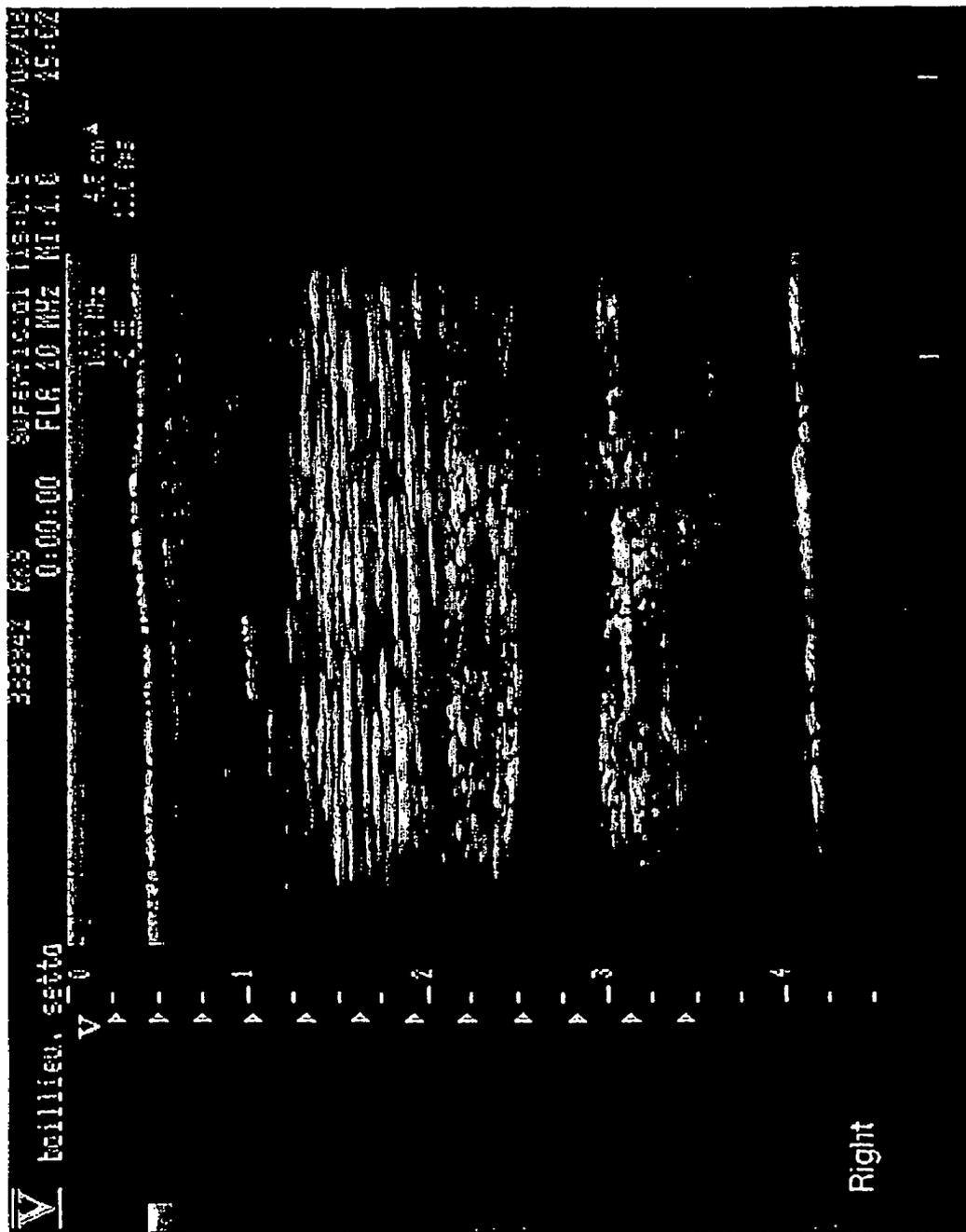


Fig. 3f

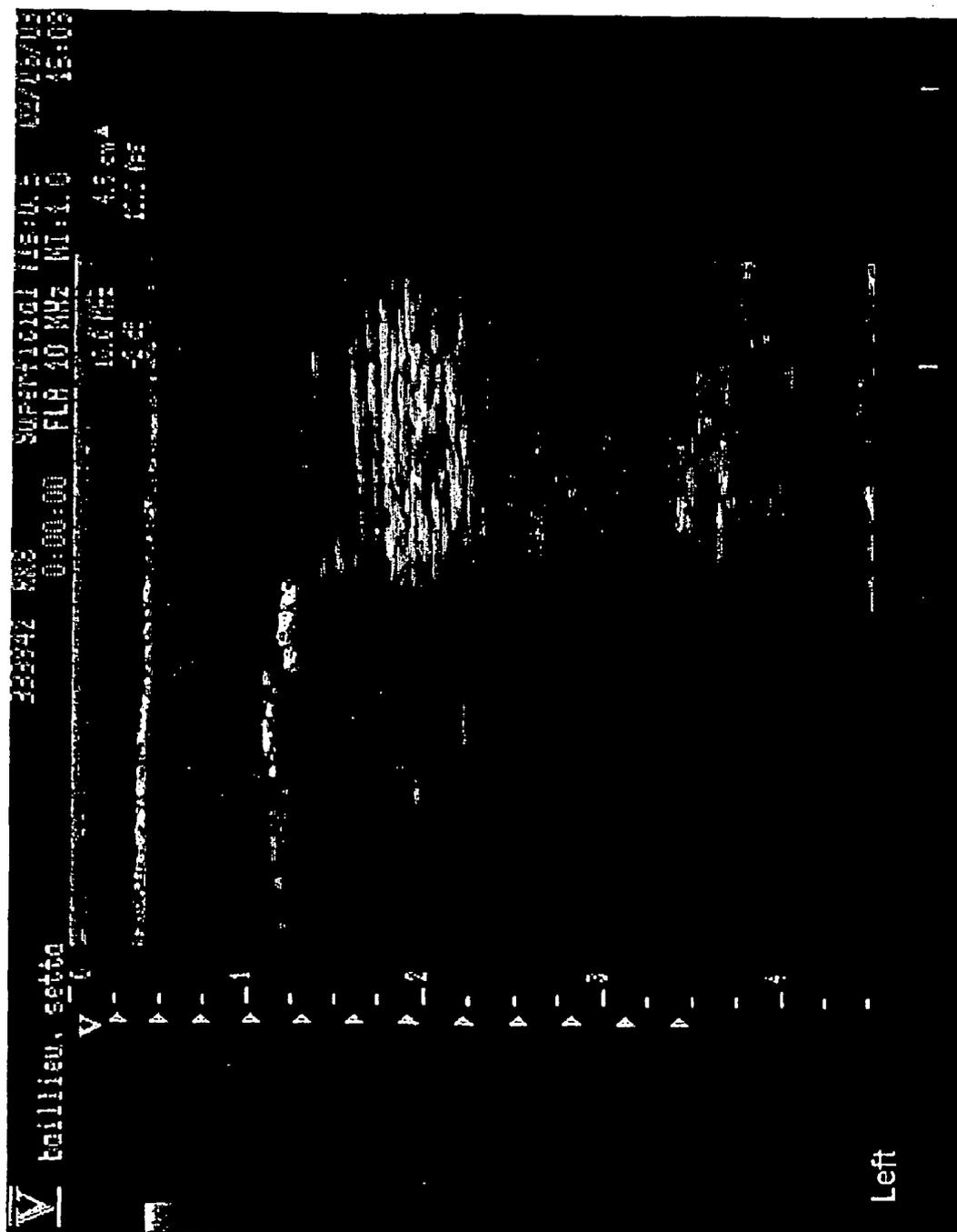


Fig. 3g