

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 008**

51 Int. Cl.:

A61K 35/32 (2006.01)

C12N 5/077 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08864978 .5**

96 Fecha de presentación: **19.12.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2224934**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.09.2010**

54 Título: **Uso de osteoblastos en el tratamiento de enfermedades reumáticas inflamatorias**

30 Prioridad:

21.12.2007 EP 07150368

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

03.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

03.12.2012

73 Titular/es:

**BONE THERAPEUTICS S.A. (100.0%)
RUE ADRIENNE BOLLAND 8
6041 GOSSELIES, BE**

72 Inventor/es:

**BASTIANELLI, ENRICO;
BADOER, CINDY;
BIZIMUNGU, CHRISTELLE y
PESESSE, XAVIER**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 392 008 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

Uso de osteoblastos en el tratamiento de enfermedades reumáticas inflamatorias

Campo de la invención

5 La invención se refiere a aplicaciones terapéuticas de células formadoras de hueso en el tratamiento de enfermedades reumáticas inflamatorias (ERI), y en particular en el tratamiento de la inflamación en (componente inflamatorio de) ERI.

Antecedentes de la invención

10 Las enfermedades reumáticas abarcan una variedad de trastornos dolorosos que afectan al sistema locomotor, incluyendo particularmente articulaciones, músculos, tejidos conjuntivos, tejidos blandos alrededor de las articulaciones y huesos.

La inflamación y/o reacciones autoinmunitarias contribuyen a la etiología de muchas enfermedades reumáticas. Tales estados, denominados comúnmente enfermedades reumáticas inflamatorias o ERI, incluyen sin limitación artritis de diversos orígenes, osteoartritis y así sucesivamente.

15 Los tratamientos disponibles actualmente para ERI incluyen principalmente fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME), glucocorticoides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y analgésicos.

Por consiguiente, existe una necesidad de modalidades de tratamiento adicionales en ERI, y en particular de modalidades de tratamiento que se dirijan al componente inflamatorio de ERI.

20 El documento WO 2005/089127 incluye células osteogénicas en un aparato de soporte para regenerar interfases osteocartilaginosas en la osteoartritis. El documento WO 2007/093431 sugiere usar osteoblastos para el tratamiento de artritis reumatoide y osteonecrosis. Estos documentos no dan a conocer la acción antiinflamatoria de células formadoras de hueso, y no dan a conocer el uso de células formadoras de hueso para suprimir el componente inflamatorio de enfermedades reumáticas.

25 Liu *et al.* 2006 (J Inmunol 176(5): 2864-71) da a conocer propiedades inmunoprivilegiadas e inmunomoduladoras de células osteogénicas diferenciadas de células madre mesenquimatosas en el contexto de trasplante de tejido alogénico. Sin embargo, los mecanismos de rechazo de tejido en el trasplante alogénico son evidentemente diferentes de los mecanismos que subyacen a la inflamación en enfermedades reumáticas. Esto se refleja, entre otros, en los distintos grupos de fármacos que se usan en la actualidad para tratar estos estados. En consecuencia, Liu *et al.* 2006 no dan a conocer ninguna acción antiinflamatoria de células formadoras de hueso, y no dan a conocer el uso de células formadoras de hueso para suprimir el componente inflamatorio de enfermedades reumáticas.

30 **Descripción de la invención**

35 Los presentes inventores se dieron cuenta sorprendentemente de que las células formadoras de hueso, en particular osteoblastos presentan potentes acciones inmunosupresoras y específicamente antiinflamatorias, además de las acciones osteorregenerativas esperadas, y son por tanto particularmente útiles en el tratamiento de enfermedades reumáticas inflamatorias (ERI) en sujetos, y más específicamente para el tratamiento de la inflamación en, es decir, el componente inflamatorio de, ERI en sujetos.

La presente invención proporciona la materia tal como se expone en todos y cada uno de los puntos (i) a (x) a continuación:

(i) Osteoblastos aislados para su uso en el tratamiento del componente inflamatorio de enfermedades reumáticas inflamatorias (ERI).

40 (ii) Osteoblastos aislados para su uso tal como se expone anteriormente en (i), derivándose dichos osteoblastos mediante diferenciación de células madre de médula ósea aisladas o células madre mesenquimatosas.

(iii) Osteoblastos aislados para su uso tal como se expone anteriormente en (i) o (ii), siendo los osteoblastos de origen humano y empleándose el medicamento para la administración autóloga o alogénica a sujetos humanos.

45 (iv) Osteoblastos aislados para su uso tal como se expone anteriormente en (iii), siendo dicha administración sistémica, tópica, intraarticular o periarticular.

50 (v) Osteoblastos aislados para su uso tal como se expone anteriormente en uno cualquiera de (i) a (iv), eligiéndose la ERI de osteoartritis (OA), artropatía psoriásica, gota, pseudogota y artritis de diversos orígenes que comprende artritis reumatoide (AR), artritis enteropática, artritis reactiva y síndrome de Reiter, osteonecrosis, artritis reumatoide juvenil pauciarticular, enfermedad de Still, enfermedad de Behçet, lupus eritematoso sistémico, artritis séptica y espondiloartropatías que comprenden espondilitis anquilosante, espondilitis enteropática y espondiloartropatía no diferenciada.

(vi) Osteoblastos aislados para su uso tal como se expone anteriormente en uno cualquiera de (i) a (iv), siendo la ERI distinta de osteoartritis (OA), artritis reumatoide (AR) y osteonecrosis.

(vii) Osteoblastos aislados tal como se expone anteriormente en uno cualquiera de (i) a (vi), comprendiendo la ERI tanto una inflamación como lesión/lesiones ósea(s).

5 (viii) Osteoblastos aislados tal como se expone anteriormente en uno cualquiera de (i) a (vi), comprendiendo la ERI una inflamación y no comprendiendo lesión/lesiones ósea(s).

(ix) Una composición farmacéutica que comprende osteoblastos y un agente elegido de fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME) y glucocorticoides, para su uso simultáneo, secuencial o separado en el tratamiento del componente inflamatorio de ERI.

10 (x) Una composición farmacéutica que comprende osteoblastos para su uso en el tratamiento del componente inflamatorio de ERI, particularmente para su uso tal como se expone anteriormente en uno cualquiera de (ii) a (viii).

Por tanto, la materia proporcionada por la invención pertenece específicamente a la divulgación, descripción y enseñanza de la presente memoria descriptiva.

15 La memoria descriptiva describe adicionalmente células formadoras de hueso aisladas, en particular osteoblastos aislados para su uso en el tratamiento de ERI, así como el uso de células formadoras de hueso aisladas, en particular osteoblastos aislados para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de ERI. Se dan a conocer adicionalmente células formadoras de hueso aisladas, en particular osteoblastos aislados para su uso en el tratamiento de la inflamación en (el componente inflamatorio de) ERI, así como el uso de células formadoras de hueso aisladas, en particular osteoblastos aislados para la fabricación de un medicamento para tratar la inflamación en (el componente inflamatorio de) ERI.

20 La memoria descriptiva también se refiere a un método para prevenir y/o tratar ERI en un sujeto que necesita tal tratamiento, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de células formadoras de hueso aisladas, en particular osteoblastos aislados. También se da a conocer un método para prevenir y/o tratar la inflamación en (el componente inflamatorio de) ERI en un sujeto que necesita tal tratamiento, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de células formadoras de hueso aisladas, en particular osteoblastos aislados. Además, la memoria descriptiva describe una composición farmacéutica que comprende células formadoras de hueso aisladas, en particular osteoblastos aislados para su uso en el tratamiento de ERI. También se da a conocer una composición farmacéutica que comprende células formadoras de hueso aisladas, en particular osteoblastos aislados para su uso en el tratamiento de la inflamación en (el componente inflamatorio de) ERI.

25 También se describen células formadoras de hueso aisladas, en particular osteoblastos aislados para su uso en el tratamiento de la inflamación, así como el uso de células formadoras de hueso aisladas, en particular osteoblastos aislados para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la inflamación. También se describe un método para prevenir y/o tratar la inflamación en un sujeto que necesita tal tratamiento, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de células formadoras de hueso aisladas, en particular osteoblastos aislados. Se describe adicionalmente una composición farmacéutica que comprende células formadoras de hueso aisladas, en particular osteoblastos aislados para su uso en el tratamiento de la inflamación.

30 El término "aislado" tal como se usa en el presente documento en relación con células o poblaciones de células implica que tales células o poblaciones de células no forman parte de un cuerpo animal o humano, sino que se extraen o se separan a partir del mismo.

35 Dichas células formadoras de hueso, en particular osteoblastos pueden ser preferiblemente de origen mamífero incluyendo origen mamífero no humano y más preferiblemente son de origen humano. Las células formadoras de hueso, en particular osteoblastos pueden obtenerse habitualmente de o derivarse de una muestra biológica de un sujeto (es decir, una muestra extraída de un sujeto y que comprende células del mismo) tal como preferiblemente un sujeto mamífero humano o no humano.

40 Los sujetos abarcan preferiblemente animales de sangre caliente, más preferiblemente sujetos mamíferos, incluyendo sujetos mamíferos humanos o no humanos, incluso más preferiblemente sujetos primates, incluyendo sujetos primates humanos o no humanos, y aún más preferiblemente sujetos humanos. Las células formadoras de hueso, en particular osteoblastos también pueden ser por tanto de tales orígenes.

45 Dichas células formadoras de hueso, en particular osteoblastos pueden emplearse preferiblemente para la administración autóloga (es decir, administradas al mismo sujeto a partir del cual se obtuvieron o se derivaron las células) o administración alogénica (es decir, administradas a un sujeto distinto de, pero de la misma especie que, el sujeto a partir del cual se obtuvieron o se derivaron las células). También puede ser posible la administración xenogénica de dichas células formadoras de hueso, en particular osteoblastos (es decir, en la que las células obtenidas o derivadas de un sujeto de una especie se administran a un sujeto de una especie diferente).

Preferiblemente en el presente documento, las células formadoras de hueso humanas, en particular osteoblastos van a emplearse para la administración autóloga o alogénica a sujetos humanos que tienen ERI. La administración autóloga puede preferirse particularmente.

5 El término “células formadoras de hueso” tal como se usa en el presente documento se refiere generalmente a células que pueden contribuir a, o que pueden desarrollarse en células que pueden contribuir a, la formación de material óseo y/o matriz ósea, e indica particularmente células aisladas o poblaciones de células que a) pueden experimentar diferenciación osteogénica, o b) se destinan a diferenciación osteogénica, o c) han progresado al menos parcialmente a lo largo de la diferenciación osteogénica, más preferiblemente indica células aisladas o poblaciones de células enumeradas en cualquiera de b) o c). Sin limitación, las células formadoras de hueso abarcan particularmente osteoprogenitores, osteoblastos, osteocitos y otros tipos de células del linaje osteogénico tal como se conoce en la técnica.

Por tanto, un experto en la técnica aprecia generalmente los límites del término “células formadoras de hueso” tal como se pretende en el presente documento. No obstante, a modo de orientación adicional y no de limitación las presentes células formadoras de hueso pueden presentar una cualquiera, más o todas las siguientes características:

15 a) las células comprenden la expresión de fosfatasa alcalina (ALP), más específicamente ALP del tipo óseo-hepático-renal, o expresión de osteocalcina o ambas;

b) opcionalmente, las células comprenden la expresión de una cualquiera o más de propéptido amino terminal de procolágeno tipo 1 (P1 NP), osteonectina (ON), osteopontina (OP) y sialoproteína ósea (BSP);

20 c) opcionalmente, las células comprenden la expresión de uno cualquiera o más de marcadores mesenquimatosos CD105, CD73 y CD90;

d) las células muestran pruebas de capacidad para mineralizar los entornos externos, o sintetizar matriz extracelular que contiene calcio (por ejemplo, cuando se expone a medio osteogénico; véase Jaiswal *et al.* 1997. *J Cell Biochem* 64: 295-312). La acumulación de calcio dentro de las células y la deposición en proteínas de la matriz pueden medirse de manera convencional por ejemplo cultivando en $^{45}\text{Ca}^{2+}$, lavando y cultivando nuevamente, y luego determinando cualquier radiactividad presente dentro de la célula o depositada en la matriz extracelular (patente estadounidense n.º 5.972.703), o sometiendo a ensayo el sustrato de cultivo para detectar mineralización usando un kit de ensayo de Ca^{2+} (kit de Sigma n.º 587), o tal como se describe en los ejemplos;

30 e) las células no se diferencian sustancialmente hacia una cualquiera de, y preferiblemente hacia ninguna de las células de linaje adipocítico (por ejemplo, adipocitos) o linaje condrocítico (por ejemplo, condrocitos). La ausencia de diferenciación hacia tales linajes celulares puede someterse a prueba usando estados que inducen diferenciación convencional establecidos en la técnica (por ejemplo, véase Pittenger *et al.* 1999. *Science* 284: 143-7), y métodos de ensayo (por ejemplo, cuando se inducen, los adipocitos se tiñen normalmente con aceite rojo O que muestra acumulación de lípidos; los condrocitos se tiñen normalmente con azul alciano o safranina O). La falta sustancial de propensión hacia diferenciación adipogénica y/o condrogénica puede significar normalmente que menos del 50%, o menos del 30%, o menos del 5%, o menos del 1% de las células sometidas a una prueba mostrará signos de diferenciación adipogénica o condrogénica cuando se aplican a la prueba respectiva.

En una opción, las células formadoras de hueso, en particular los osteoblastos pueden presentar todas las características enumeradas en a), d) y e) anteriormente.

40 Cuando se dice que una célula es positiva para un componente particular (por ejemplo, marcador o enzima), esto significa que un experto llegará a la conclusión de la presencia o evidencia de una señal distinta, por ejemplo, detectable por anticuerpos o detección mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa, para ese componente cuando se lleva a cabo la medición apropiada, en comparación con controles adecuados. Cuando el método permite la evaluación cuantitativa del componente, las células positivas pueden generar en promedio una señal que es significativamente diferente del control, por ejemplo, pero sin limitación, al menos 1,5 veces superior a tal señal generada por células control, por ejemplo, al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces superior o incluso superior.

50 La expresión de los marcadores específicos de células anteriores puede detectarse usando cualquier técnica inmunológica adecuada conocida en la técnica, tal como inmunocitoquímica o adsorción por afinidad, análisis de inmunotransferencia de tipo Western, FACS, ELISA, etc., o mediante cualquier ensayo bioquímico adecuado de actividad enzimática (por ejemplo, para ALP), o mediante cualquier técnica de medición adecuada de la cantidad del ARNm del marcador, por ejemplo, transferencia de tipo Northern, RT-PCR semicuantitativa o cuantitativa, etc. Se conocen datos de secuencia para marcadores enumerados en esta descripción y pueden obtenerse a partir de bases de datos públicas tales como GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

55 Las células formadoras de hueso aisladas, en particular osteoblastos aislados o poblaciones de células para su uso en la invención y en la memoria descriptiva pueden obtenerse o derivarse de cualquier manera adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, células formadoras de hueso o célula derivada de cualquier manera adecuada conocida

5 en la técnica. Por ejemplo, las células formadoras de hueso o poblaciones de células tal como describe en el presente documento, o en una realización los osteoblastos pueden derivarse mediante diferenciación de células madre o progenitores adultos relativamente menos diferenciados, tales como, por ejemplo, de células madre mesenquimatosas, usando protocolos de diferenciación conocidos *per se*. Sin limitación, se ha dado a conocer un método adecuado para obtener osteoblastos formadores de hueso en el documento WO 2007/093431 e implica cultivar células madre de médula ósea aisladas (BMSC) o células madre mesenquimatosas (MSC) en presencia de plasma y factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF-2). En otro ejemplo, pueden obtenerse células de linaje osteogénico diferenciando MSC en medio osteogénico tal como se describe por Pittenger *et al.* 1999 (Science 284: 143-7) y Jaiswal *et al.* 1997 (citado anteriormente). En otro ejemplo, las células formadoras de hueso o poblaciones de células tal como se describe en el presente documento, o en una realización los osteoblastos pueden aislarse y cultivarse y/o expandirse opcionalmente a partir de muestras biológicas que comprenden tales células. Por ejemplo, los osteoblastos pueden aislarse y cultivarse directamente a partir de hueso trabecular tal como se describe por Skjodt *et al.* 1985 (J Endocrinol 105: 391-6).

15 El término “enfermedad reumática inflamatoria” o “ERI” tal como se usa en el presente documento incluye generalmente todas las enfermedades reumáticas que conllevan un componente inflamatorio y/o autoinmunitario, y particularmente que conllevan al menos un componente inflamatorio. A modo de ejemplo y no de limitación, la ERI comprende particularmente osteoartritis (OA), artropatía psoriásica, gota, pseudogota y artritis de diversos orígenes incluyendo entre otras artritis reumatoide (AR), artritis enteropática, artritis reactiva y síndrome de Reiter, osteonecrosis, artritis reumatoide juvenil pauciarticular, enfermedad de Still, enfermedad de Behçet, lupus eritematoso sistémico, artritis séptica y espondiloartropatías tales como, entre otras, espondilitis anquilosante y espondilitis enteropática y espondiloartropatía no diferenciada.

25 Por tanto, en una realización, la descripción puede referirse a cualquier ERI elegida de osteoartritis (OA), artropatía psoriásica, gota, pseudogota y artritis de diversos orígenes incluyendo entre otras artritis reumatoide (AR), artritis enteropática, artritis reactiva y síndrome de Reiter, osteonecrosis, artritis reumatoide juvenil pauciarticular, enfermedad de Still, enfermedad de Behçet, lupus eritematoso sistémico, artritis séptica y espondiloartropatías tales como entre otras espondilitis anquilosante y espondilitis enteropática y espondiloartropatía no diferenciada.

En otra realización, la descripción puede referirse a cualquier ERI distinta de osteoartritis (OA), osteonecrosis y artritis reumatoide (AR).

30 Aún en otra realización, la descripción puede referirse a cualquier ERI elegida de artropatía psoriásica, gota, pseudogota y artritis de diversos orígenes incluyendo entre otras artritis enteropática, artritis reactiva y síndrome de Reiter, artritis reumatoide juvenil pauciarticular, enfermedad de Still, enfermedad de Behçet, lupus eritematoso sistémico, artritis séptica y espondiloartropatías tales como entre otras espondilitis anquilosante y espondilitis enteropática y espondiloartropatía no diferenciada.

35 Las presentes células formadoras de hueso, en particular osteoblastos pueden ser particularmente útiles en el tratamiento de enfermedades ERI (o tratamiento de la inflamación en o el componente inflamatorio de dichas enfermedades), que comprenden tanto inflamación, con o sin un componente autoinmunitario, como lesión/lesiones ósea(s) tal(es) como, por ejemplo, erosión o lesiones subcartilaginosas. En el presente documento, las células formadoras de hueso, en particular en esta realización los osteoblastos pueden mejorar de manera sinérgica dichas ambas patologías, mediante lo cual puede lograrse una mejora terapéutica más pronunciada.

40 En otra opción, las células formadoras de hueso, en particular en una realización los osteoblastos pueden usarse en el tratamiento de enfermedades ERI (o tratamiento de la inflamación en o el componente inflamatorio de dichas enfermedades), en la que dichas enfermedades incluyen inflamación y no incluyen lesión/lesiones ósea(s). A modo de ejemplo, puede tratarse una enfermedad ERI en un paciente en la que el componente de inflamación está presente, y en la que la(s) lesión/lesiones ósea(s) no ha(n) surgido aún. El uso de células formadoras de hueso, en particular osteoblastos en tales enfermedades no se había indicado previamente, puesto que antes de la presente descripción de los efectos antiinflamatorios de las células formadoras de hueso, en particular osteoblastos, no había ninguna expectativa de ningún beneficio en tales enfermedades de la administración de células formadoras de hueso, en particular osteoblastos.

45 La profilaxis y/o el tratamiento de la inflamación en, es decir, del componente inflamatorio de, ERI, puede implicar en particular la supresión, reducción o disminución del nivel o grado de inflamación sistémica y/o local en dicha ERI, es decir, la supresión, reducción o disminución de la inflamación (componente inflamatorio). Dicho nivel o grado de inflamación puede evaluarse adecuadamente tal como se conoce *per se*, por ejemplo y sin limitación midiendo síntomas de inflamación (por ejemplo, fiebre, hinchamiento del tejido, dolor, pérdida de función, etc.) y/o midiendo marcadores celulares y/o moleculares de inflamación, tales como, por ejemplo, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 y TNF α , por ejemplo, niveles locales y/o sistémicos de dichos marcadores.

55 Las células formadoras de hueso aisladas que van a emplearse en la presente memoria descriptiva, en particular osteoblastos que van a emplearse en la presente invención pueden formularse adecuadamente en y administrarse como composiciones farmacéuticas.

Tales composiciones farmacéuticas pueden comprender, además de las células formadoras de hueso tal como se describe en el presente documento, en particular los osteoblastos tal como se define en el presente documento, un excipiente, vehículo, tampón, conservante, estabilizante, antioxidante u otro material farmacéuticamente aceptable bien conocido por los expertos en la técnica. Tales materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la actividad de las células. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable, que está libre de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Para principios generales en formulación de medicamentos, se remite al lector a *Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy*, por G. Morstyn & W. Sheridan eds., Cambridge University Press, 1996; y *Hematopoietic Stem Cell Therapy*, E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000.

Tales composiciones farmacéuticas pueden contener componentes adicionales que aseguren la viabilidad de las células en las mismas. Por ejemplo, las composiciones pueden comprender un sistema de tampón adecuado (por ejemplo, sistema de tampón carbonato o fosfato) para conseguir un pH deseado, más habitualmente cerca del pH neutro, y pueden comprender suficiente sal para garantizar condiciones isoosmóticas para las células para prevenir el estrés osmótico. Por ejemplo, la disolución adecuada para estos fines puede ser solución salina tamponada con fosfato (PBS), disolución de cloruro de sodio, inyección de Ringer o inyección de Ringer con lactato, tal como se conoce en la técnica. Adicionalmente, la composición puede comprender una proteína vehículo, por ejemplo, albúmina, que puede aumentar la viabilidad de las células.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender componentes adicionales útiles en la reparación de defectos y heridas óseas. Por ejemplo, tales componentes pueden incluir sin limitación partículas de fosfato tricálcico/hidroxiapatita (TCP/HA), gelatina, poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico), ácido hialurónico, quitosano, poli-L-lisina y colágeno. Por ejemplo, las células formadoras de hueso, en particular osteoblastos pueden combinarse con matriz ósea desmineralizada (DBM) u otras matrices para hacer que el material compuesto sea osteogénico (formador de hueso por sí mismo) así como osteoinductor. Métodos similares usando células autólogas de médula ósea con DBM alogénica han producido buenos resultados (Connolly *et al.* 1995. *Clin Orthop* 313: 8-18).

La composición farmacéutica puede incluir adicionalmente o coadministrarse con un factor bioactivo complementario tal como una proteína morfogenética ósea, tal como BMP-2 o BMP-4, BMP-7 o cualquier otro factor de crecimiento. Otros componentes potenciales acompañantes incluyen fuentes inorgánicas de fosfato o calcio adecuadas para ayudar a la regeneración ósea (documento WO 00/07639). Si se desea, la preparación de células puede administrarse en un material o matriz vehículo para proporcionar una regeneración tisular mejorada. Por ejemplo, el material puede ser una cerámica granulada, o un biopolímero tal como gelatina, colágeno, osteonectina, fibrinógeno u osteocalcina. Pueden sintetizarse matrices porosas según técnicas convencionales (por ejemplo, Mikos *et al.*, *Biomaterials* 14:323, 1993; Mikos *et al.*, *Polymer* 35:1068, 1994; Cook *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 35:513, 1997).

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir adicionalmente o coadministrarse en combinación con cualquier terapia conocida en la técnica útil en ERI, tal como sin limitación con fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME), glucocorticoides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) o analgésicos. Por tanto, la memoria descriptiva también proporciona una composición farmacéutica que comprende las células formadoras de hueso, en particular osteoblastos y un agente elegido de FARME, glucocorticoides, AINE y analgésicos para su uso simultáneo, secuencial o separado en el tratamiento de ERI.

Las células formadoras de hueso, en particular osteoblastos van a administrarse en una "cantidad profilácticamente eficaz" (es decir, una cantidad que inhibe o retrasa en un sujeto el comienzo de un trastorno tal como se busca por un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro médico) o en una "cantidad terapéuticamente eficaz" (es decir, una cantidad que produce la respuesta médica o biológica en un sujeto que se busca por un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro médico, que puede incluir entre otros el alivio de los síntomas de la enfermedad o el trastorno que está tratándose). La dosificación o cantidad de células formadoras de hueso usada, en particular osteoblastos opcionalmente en combinación con uno o más agentes activos, depende del caso individual y, como es habitual, ha de adaptarse a las circunstancias individuales para conseguir un efecto óptimo. Por tanto, depende de la naturaleza y la gravedad del trastorno que va a tratarse, y también del sexo, edad, peso corporal, salud general, dieta, modo y tiempo de administración, y receptividad individual del sujeto que va a tratarse, de la vía de administración, eficacia, estabilidad y duración de la acción, de si la terapia es aguda o crónica o profiláctica, o de si se administran otros compuestos activos además de las células formadoras de hueso tal como se enseña en el presente documento, en particular los osteoblastos de la invención.

A modo de ejemplo y no de limitación, puede administrarse una dosis de entre aproximadamente 1×10^3 y aproximadamente 1×10^9 células formadoras de hueso, en particular osteoblastos, o entre aproximadamente 1×10^4 y aproximadamente 1×10^8 células formadoras de hueso, en particular osteoblastos, o entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^7 células formadoras de hueso, en particular osteoblastos, o entre aproximadamente 1×10^6 y 1×10^8 células formadoras de hueso, en particular osteoblastos, de manera local y/o sistémica, a un sujeto, preferiblemente un mamífero no humano o un sujeto humano. Tal administración puede ser única o repetida, o puede hacerse por unidad de volumen. A modo de ejemplo y no de limitación, la frecuencia de la administración repetida puede ser una o dos veces al día; una vez, dos veces o más veces a la semana; o una vez, dos veces o

más veces al mes.

La memoria descriptiva también abarca adicionalmente métodos de producción de dicho producto farmacéutico. Lo siguiente también abarca métodos de producción de dichas composiciones farmacéuticas, en la que dicha composición farmacéutica está destinada para su uso en el tratamiento de ERI, mezclando células formadoras de hueso tal como se da a conocer en el presente documento, en particular osteoblastos tal como se define en el presente documento con uno o más componentes adicionales como anteriormente.

Las células formadoras de hueso, en particular osteoblastos o las formulaciones farmacéuticas que los comprenden pueden administrarse de una manera que les permite injertarse o migrar al sitio tisular previsto y reconstituir o regenerar la zona funcionalmente deficiente. La administración de la composición dependerá del sitio musculoesquelético que está reparándose. Por ejemplo, la administración puede producirse mediante inyección o implantación directamente en la cavidad intraauricular en el caso de trastornos de articulaciones. En otras circunstancias, las células formadoras de hueso, en particular osteoblastos o las formulaciones farmacéuticas que los comprenden pueden administrarse de manera sistémica, mediante lo cual sus acciones antiinflamatorias pueden producirse de manera sistémica o pueden migrar a zonas de enfermedad. Por tanto, en ejemplos generales, la administración puede ser entre otras sistémica, tópica, intraarticular o periarticular.

Por tanto, en una opción la preparación farmacéutica de células tal como se define anteriormente puede administrarse en forma de composición líquida.

En otra opción, las células formadoras de hueso, en particular osteoblastos o poblaciones de células pueden transferirse a y/o cultivarse en un sustrato adecuado para proporcionar implantes. El sustrato sobre el que las células pueden aplicarse y cultivarse puede ser un metal, tal como titanio, aleación de cromo/cobalto o acero inoxidable, una superficie bioactiva tal como fosfato de calcio, superficies de polímeros tales como polietileno, y similares. Aunque menos preferido, también puede usarse como sustrato material silíceo tal como vidrio cerámico. Lo más preferido son metales, tales como titanio, y fosfatos de calcio, aún cuando el fosfato de calcio no es un componente indispensable del sustrato. El sustrato puede ser poroso o no poroso.

Por ejemplo, las células que han proliferado, o que están diferenciándose en placas de cultivo, pueden transferirse sobre soportes sólidos tridimensionales con el fin de hacer que se multipliquen y/o continúen el proceso de diferenciación incubando el soporte sólido en un medio nutriente líquido de la invención, si es necesario. Las células pueden transferirse sobre un soporte sólido tridimensional, por ejemplo impregnando dicho soporte con una suspensión líquida que contiene dichas células. Los soportes impregnados obtenidos de este modo pueden implantarse en un sujeto humano. Tales soportes impregnados también pueden volverse a cultivar sumergiéndolos en un medio de cultivo líquido, antes de implantarse finalmente.

El soporte sólido tridimensional necesita ser biocompatible para permitir que se implante en un ser humano. Puede ser de cualquier forma adecuada tal como un cilindro, una esfera, una placa o una parte de forma arbitraria. De los materiales adecuados para el soporte sólido tridimensional biocompatible, puede hacerse mención particular de carbonato de calcio, y en particular aragonita, específicamente en forma de esqueleto de coral, cerámica porosa a base de alúmina, de zirconia, de trifosfato de calcio y/o hidroxiapatita, esqueleto de coral de imitación obtenido mediante intercambio hidrotérmico que permite que el carbonato de calcio se transforme en hidroxiapatita, o también vidrios cerámicos de apatita-wollastonita, vidrios cerámicos bioactivos tales como vidrios Bioglass(TM).

Definiciones generales

A menos que se defina lo contrario, todos los términos usados en la invención descrita, incluyendo términos científicos y técnicos, tienen el significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención.

Tal como se usa en el presente documento, las formas singulares “un”, “una”, y “el/la” incluyen referentes tanto singulares como plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. A modo de ejemplo, “una célula” se refiere a una o más de una célula.

Los términos “que comprende”, “comprende” y “compuesto por” tal como se usan en el presente documento son sinónimos de “que incluye”, “incluye” o “que contiene”, “contiene”, y son inclusivos o de extremos abiertos y no excluyen miembros, elementos o etapas de métodos no mencionados, adicionales.

La mención de intervalos numéricos mediante puntos finales incluye todos los números y fracciones incluidos dentro de ese intervalo, así como los puntos finales enumerados.

El término “aproximadamente” tal como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal y similares, se entiende que abarca variaciones de +/-10% o menos, preferiblemente +/-5% o menos, más preferiblemente +/-1% o menos, y todavía más preferiblemente +/-0,1% o menos de y desde el valor especificado, en la medida en que dichas variaciones sean apropiadas de llevar a cabo en la invención dada a conocer. Debe entenderse que el valor al que se refiere el modificador

“aproximadamente” también se da a conocer en sí mismo específica y preferiblemente.

Todos los documentos citados en la presente memoria descriptiva se incorporan por el presente documento en su totalidad como referencia. En particular, las enseñanzas de todos los documentos a los que se hace referencia específicamente en el presente documento se incorporan como referencia.

5 Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la expresión de marcadores óseos y mesenquimatosos por células formadoras de hueso.

La figura 2 muestra la mineralización (A) y la tinción de ALP (B) por células formadoras de hueso.

La figura 3 muestra la comparación entre los diámetros de los tobillos en animales tratados con CARRA (gris claro), animales tratados con CARRA+DEX (gris oscuro), animales tratados con CARRA+OB (negro) y animales tratados con CARRA+OB+DEX (línea discontinua). Los diámetros se notifican como % de aumento frente al nivel inicial.

La figura 4 muestra la comparación entre los diámetros de las patas en animales tratados con CARRA (rombos) animales tratados con CARRA+DEX (cuadrados) y animales tratados con CARRA+OB (triángulos). Los diámetros se notifican como % de aumento frente al nivel inicial.

La figura 5 muestra la comparación entre los diámetros de las patas en animales tratados con ADJ (rombos), animales tratados con ADJ+DEX (cuadrados) y animales tratados con ADJ+OB (triángulos). Los diámetros se notifican como % de aumento frente al nivel inicial.

Las abreviaturas usadas en las figuras son las siguientes: CARRA: Carragenanos al 0,7%; ADJ: Adyuvante completo de Freund 75 µg; DEX: dexametasona 1 mg/kg; OB: osteoblastos 1×10^6

Ejemplo 1

20 Procedimientos experimentales

A continuación, se describen procedimientos que conducen a la derivación de células formadoras de hueso o bien (A) a partir de células madre de médula ósea (BMSC) sustancialmente tal como se describe en el documento WO 2007/093431, o bien (B) diferenciando adicionalmente las células de (A) en medio osteogénico, o (C) expandiendo osteoblastos a partir de hueso trabecular.

25 A. Derivación de osteoblasto a partir de BMSC

Se obtuvieron de 20 a 60 ml de médula ósea (BM) heparinizada a partir de la cresta ilíaca de pacientes que padecen enfermedades óseas. Se mezcló la BM con solución salina tamponada con fosfato (PBS, 2v:v) y se estratificó sobre una disolución de Ficoll en gradiente de densidad. Tras la centrifugación, se recogieron células mononucleares de la interfase y se lavaron dos veces en PBS. En paralelo, se obtuvo suero de pacientes o donantes sanos tras la centrifugación de 160 ml de sangre drenada en tubos secos. Se resuspendieron las células en medio alfa MEM complementado con plasma alogénico al 20% y FGF2 10 ng/ml (o con otro factor de crecimiento conocido en la técnica para inducir fenotipo de osteoblastos, tal como, por ejemplo, BMP). Se sembraron en placa las células a 1×10^7 células/frasco de 175 cm² y se mantuvieron en una atmósfera humidificada a 37°C que contenía un 5% de CO₂. Se dejó que las células se adhirieran durante 4 días antes de un cambio de medio inicial. Se hicieron otros dos cambios de medio parciales (se cambió la mitad del volumen) en los días 7 y 11. Se desprendieron las células en el día 14 usando disolución de tripsina-EDTA durante 1-5 min. a 37°C. Se contaron las células y se sembraron en placa a 1×10^6 células/175 cm² durante otra semana de cultivo.

B. Diferenciación de células mesenquimatosas de médula ósea en medio osteogénico

Se recuperan células madre mesenquimatosas de médula ósea del cultivo en expansión de MSC convencional mediante incubación con tripsina-EDTA y se siembran en placa a de 60 a 120.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos en el medio de expansión (12500 células/cm²). Al día siguiente, se reemplaza el medio por 2,5 ml de medio osteogénico. Se cultivan las células durante 2, 3 ó 4 semanas. Se reemplaza el medio cada 3-4 días.

Medios

Dilución de dexametasona:

45 Dex1 ($5 \cdot 10^{-4}$ M): 2 µl de disolución madre de dexametasona ($5 \cdot 10^{-2}$ M) + 198 µl de alfa-MEM

Dex2 (10^{-6} M): 2 μ l de Dex1 ($5 \cdot 10^{-4}$ M) + 998 μ l de alfa-MEM

Medio osteogénico (40 ml)

	Volumen	Concentración final
alfa MEM	31 ml	/
FCS	6 ml	15%
PenStrepGlu (100x)	400 μ l	1x
Dexametasona (Dex2)	400 μ l	10^{-8} M
Ácido ascórbico	200 μ l	50 μ g/ml
Beta-glicerofosfato	2 ml	10 mM

C. Expansión de osteoblastos trabeculares

5 De la muestra de hueso humano, se extrajeron cuidadosamente el hueso cortical y conjuntivo blando, y se trituró el hueso trabecular restante en pequeños fragmentos (1 mm^2). Se lavaron extensamente los fragmentos de hueso en PBS para separar las células de médula adherentes y se sembraron en frascos de cultivo tisular de 25 cm^2 en un medio de cultivo complementado con suero autólogo con o sin factor de crecimiento (véase anteriormente). Se cambió el medio dos veces a la semana. Tras 4 semanas, se liberaron las células usando disolución de tripsina-EDTA, se contaron y finalmente se volvieron a sembrar en placa a una densidad de $5000 \text{ células/cm}^2$.

Citometría de flujo

10 Se analizaron marcadores inmunobiológicos de superficie celular de las células mediante citometría de flujo. Se incubaron células formadoras de hueso con los siguientes anticuerpos monoclonales marcados: HLA-I, HLA-DR, CD80, CD86, CTLA-4, CD40L y CD28 durante 15 min. y entonces se lavaron con PBS antes de centrifugarse y resuspenderse en 0,3 ml de PBS.

15 Se inmunodetectó OCN con un anticuerpo específico tras la fijación y permeabilización de las células y se analizó la tinción mediante citometría de flujo.

Ensayo de mineralización

20 Se evaluó la inducción de potencial de mineralización añadiendo medio osteogénico sobre las células. Se sembraron en placa -6 000 células formadoras de hueso (véase anteriormente)/ cm^2 en placas de 6 pocillos en presencia de plasma autólogo al 5% complementado con dexametasona $0,1 \mu\text{M}$, ácido ascórbico $0,05 \text{ mM}$ y glicerofosfato 3 mM . Tras 2, 3 ó 4 semanas de cultivo, se fijaron las células en formaldehído al 3,7%/PBS y se tiñeron mediante rojo de alizarina.

Tinción de ALP

25 Se tiñeron las células para la detección de ALP. Se lavaron células formadoras de hueso (véase anteriormente) dos veces con PBS, entonces se fijaron en acetona tamponada con citrato al 60% durante 30 segundos a temperatura ambiente, y luego se enjuagaron de nuevo con agua destilada durante 45 segundos. Entonces se tiñeron las células con una disolución de fosfato Fast Blue RR/Naphtol AS-MX durante 30 minutos a temperatura ambiente, y en la oscuridad. Se lavaron las células con agua destilada durante 2 minutos, y entonces se contratiñeron en disolución de hematoxilina de Mayer durante 10 minutos. Finalmente, se lavaron las células en agua destilada durante 3 minutos.

Ensayo de proliferación

30 Se sembraron en placa 200.000 células T humanas/ml del individuo A (células mononucleares de sangre periférica, PBMCa) en una placa de microtitulación de 96 pocillos con PBMC irradiadas o reducidas en CD3 del individuo B (APCb) y células formadoras de hueso humanas de un tercer individuo durante 10 días en un volumen total de $200 \mu\text{l}$, en presencia o no de PHA (un activador mitogénico de células T). Se sembraron las células formadoras de hueso humanas a 20.000, 100.000 y 200.000/ml. Cuando se coincubaron PBMCa y APCb (con o sin PHA), se produjo una reacción linfocitaria mixta en la que se activaron las células PBMCa por los antígenos de superficie en APCb. Se incubó el cultivo con ^3H -timidina $1 \mu\text{Ci/ml}$ durante 18 h del periodo de cultivo para medir la proliferación de células T. Se lavaron las células dos veces con PBS enfriado con hielo y dos veces con ácido tricloroacético (TCA) al 5% enfriado con hielo. Finalmente, se lisaron las células mediante una disolución que contenía NaOH $0,1 \text{ N}$ y Triton-X100 al 0,1%. Se recoge el sobrenadante y se mezcla con líquido de centelleo para analizarse en un contador de centelleo.

Resultados

Propiedades de reconstrucción ósea

Se evaluaron el nivel de marcadores celulares (marcadores óseos y mesenquimatosos) o marcadores de membrana

mediante citometría de flujo tras 3 semanas (figura 1). Se expresaron altamente los marcadores óseos (ALP, OCN) y mesenquimatosos (CD105, 73, 90), mientras que el marcador hematopoyético (CD45) era negativo.

Se realizó la correlación con la función biológica del hueso con la producción de ALP (tinción de ALP) y la deposición de calcio (mineralización): se expresaba ALP por la mayoría, si no todas, las células en el día 21 y se observó un importante depósito mineral (por encima del 65% del área total bajo examen microscópico) (figura 2).

Propiedades de inmunomodulación

Los resultados mostrados en las tablas 1 y 2 indican que las APC se reconocieron por las PBMC como células foráneas y por tanto las PBMC estaban en proliferación. Cuando se mezclaron PBMCa y APCb en presencia de osteoblastos derivados de BM autóloga (del individuo B, BMOBb), se suprimió la reacción linfocitaria mixta, en un 40-50%.

Se observaron los mismos efectos en presencia de PHA (10 µg/ml) que es un fuerte estimulador de la proliferación de células T (tabla 2). Los efectos inmunosupresores de los osteoblastos eran más importantes (a del 55 al 65%) sobre células T estimuladas.

De manera interesante, cuando se mezclaron en presencia de osteoblastos derivados de BM alogénica (del individuo C, BMOBc), también se suprimió significativamente la reacción linfocitaria mixta, al 30-40% en condiciones convencionales (tabla 1) y al 60-65% en condiciones estimuladas con PHA. Se cargaron osteoblastos derivados de BM del individuo C (BMOBc) en una placa de microtitulación de 96 pocillos y se coincubaron con PBMCa y APCb. Se incubó el cultivo con ³H-timidina durante 18 h del periodo de cultivo para medir la proliferación de células T. Estos resultados sugieren que no había especificidad de supresión con respecto al subtipo de HLA.

Tabla 1

N.º de MSC	PBMCa + APCb	PBMCa + APCb + BMOBb	PBMCa + APCb + BMOBc
1	15.000 +/-2.100	9.000 +/- 1.350	10.000 +/- 1.500
2	14.000 +/-1.750	7.000 +/- 350	9.000 +/-550
3	17.000 +/-200	12.000 +/- 1.500	12.000 +/- 750

Tabla 2. Efectos inhibidores de osteoblastos derivados de BM (BMOB) sobre la proliferación de células T activada por PHA (los valores se presentan en cpm de [³H]-timidina incorporada)

N.º de MSC	PBMCa + APCb + PHA	PBMCa + APCb + BMOBb + PHA	PBMCa + APCb + BMOBc + PHA
1	25.000 +/-2.800	12.000 +/- 1.700	13.000 +/- 1.300
2	22.000 +/-2.200	8.000 +/-1.300	10.000 +/- 950
3	35.000 +/-3.400	15.000 +/- 1.200	13.000 +/- 1.100

Conclusiones

Células formadoras de hueso tales como osteoprogenitores, pre-osteoblastos u osteoblastos pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedad reumática inflamatoria ya que muestran propiedades tanto reconstructoras de hueso como antiinflamatorias. Estas células se caracterizan por altos niveles de expresión de marcadores de superficie óseos y mesenquimatosos, correlacionados con actividad enzimática de ALP y capacidad de mineralización, lo que confirma su perfil biológico óseo. Las células pueden además regular por disminución la respuesta proliferativa de células T estimuladas en una base autóloga y alogénica. Esto demuestra que los productos de células formadoras de hueso derivadas de médula ósea autóloga o alogénica pueden ser particularmente útiles para el tratamiento de enfermedades reumáticas inflamatorias.

Ejemplo 2: Modelo de inflamación *in vivo* (ERI)

Modelo de inflamación de tobillo/pata inducida por carragenanos (1)

Se indujo inflamación mediante inyección de una disolución que contenía carragenanos al 1% (CARRA; Sigma, Suiza) en PBS en la pata trasera de ratones SWISS de 8 semanas de edad; recibiendo cada animal una única inyección en cada pata trasera (tabla 3). Los animales a los que se les inyectó carragenanos recibieron inmediatamente tras la inyección PBS sólo, o una disolución de dexametasona (DEX; Sigma, Suiza) a una concentración de 1 mg/kg, o 1*10⁶ células formadoras de hueso humanas (OB) (derivadas de células estromales mesenquimatosas de médula ósea tal como se describe en el ejemplo 1 A) o una combinación de DEX y OB.

Tabla 3: protocolo experimental

Grupos (n=4)	Pata trasera izquierda	Pata trasera derecha
N.º 1	CARRA 0,7%	CARRA 0,7%+ DEX (1 mg/kg)
N.º 2	CARRA 0,7%	CARRA 0,7% + OB 10 ⁶
N.º 3	CARRA 0,7%	CARRA 0,7% + DEX + OB
N.º 4	CARRA 0,7%	PBS

Bajo sedación con isoflurano, se midió la circunferencia de los tobillos y patas usando un calibre digital antes de la inyección a T0, y a T1, T4 y T24; respectivamente antes de la administración de CARRA, y 1 h, 4 h, 6 h y 24 horas tras la inyección.

Modelo de inflamación de tobillo/pata inducida por carragenanos (2)

- 5 Se indujo inflamación mediante inyección de una disolución que contenía carragenanos lambda al 1% (CARRA; Sigma, Suiza) en PBS en la pata trasera de ratones SWISS de 8 semanas de edad; recibiendo cada animal una única inyección en cada pata trasera (tabla 4). Los animales a los que se les inyectó carragenanos recibieron inmediatamente tras la inyección PBS sólo, o una disolución de dexametasona (DEX; Sigma, Suiza) a una concentración de 1 mg/kg, o 1*10⁶ células formadoras de hueso humanas (OB) (derivadas de células estromales mesenquimatosas de médula ósea tal como se describe en el ejemplo 1 A).

10

Tabla 4: protocolo experimental

Grupos (n=4)	Pata trasera izquierda	Pata trasera derecha
N.º 1	CARRA 0,7%	CARRA 0,7% + DEX (1 mg/kg)
N.º 2	CARRA 0,7%	CARRA 0,7% + OB 10 ⁶
N.º 3	CARRA 0,7%	PBS

Bajo sedación con isoflurano, se midió la circunferencia de los tobillos y patas usando un calibre digital antes de la inyección a T0, y a T1, T4, T6 y T24; respectivamente antes de la administración de CARRA, y 1 h, 4 h, 6 h y 24 horas tras la inyección.

- 15 Modelo de inflamación de tobillo/pata inducida por adyuvante

Se indujo inflamación mediante inyección de una disolución que contenía adyuvante completo de Freund al 0,5% (ADJ; Sigma, Suiza) en PBS en la pata trasera de ratones SWISS de 8 semanas de edad; recibiendo cada animal una única inyección en cada pata trasera (tabla 5). Los animales a los que se les inyectó adyuvante recibieron inmediatamente tras la inyección PBS sólo, o una disolución de dexametasona (DEX) a una concentración de 1 mg/kg, o 1*10⁶ células formadoras de hueso humanas (OB) (derivadas de células estromales mesenquimatosas de médula ósea tal como se describe en el ejemplo 1 A).

20

Tabla 5: protocolo experimental

Grupos (n=4)	Pata trasera izquierda	Pata trasera derecha
N.º 1	ADJ 75 µg	ADJ 75 µg + DEX (1 mg/kg)
N.º 2	ADJ 75 µg	ADJ 75 µg + OB 10 ⁶
N.º 2	ADJ 75 µg	PBS

Bajo sedación con isoflurano, se midió la circunferencia de los tobillos y patas usando un calibre digital antes de la inyección a T0, y a T1, T4, T6 y T24; respectivamente antes de la administración de ADJ, y 1 h, 4 h, 6 h y 24 horas tras la inyección.

25

Resultados: Efectos sobre la inflamación inducida por carragenanos

La inyección de carragenanos induce una reacción inflamatoria inmediata medible mediante el aumento en los diámetros (pata o tobillo) en los animales sometidos a inyección. El aumento de diámetro, con respecto al nivel inicial, es de aproximadamente el 20% tras 1 hora, el 25% tras 4 horas y el 17% a las 24 h (figura 3).

- 30 En el tobillo, la dexametasona (1 mg/kg) induce una potente inhibición de la inflamación y el hinchamiento de la

pata/tobillo sometidos a inyección de carragenanos (figura 3). La inhibición de la inflamación inducida por dexametasona es del 100% a 1 h y 4 h pero comienza a escapar después de eso para perderse totalmente a las 24 h.

- 5 Mediante comparación en el tobillo, la administración de células formadoras de hueso induce una inhibición moderada, pero importante, de la inflamación a 1 h y 4 h, con una disminución del 30% y el 40% respectivamente, aunque esta inhibición parece ser de larga duración manteniéndose la inhibición al 40% a las 24 h.

De manera interesante, en la inflamación inducida por carragenanos, se observa un efecto sinérgico (y potente) de la combinación de células formadoras de hueso y dexametasona (figura 3). Los efectos antiinflamatorios son del 50%, el 80% y el 75% a respectivamente 1, 4 y 24 h.

- 10 Los efectos antiinflamatorios para células formadoras de hueso son más fuertes, y también de larga duración, en la pata. La dexametasona muestra una inhibición del 100%, el 70% y el 38% a 1 h, 6 h y 24 h respectivamente, frente al 80%, el 90% y el 95% para células formadoras de hueso (figura 4). Esto puede deberse a la mejor distribución y difusión de las células inyectadas en la pata.

Resultados: Efecto sobre la inflamación inducida por adyuvante

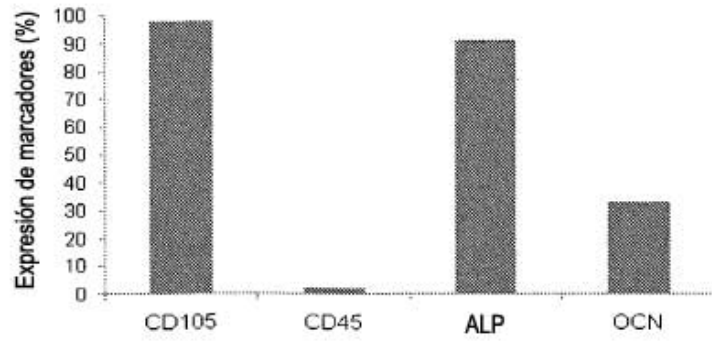
- 15 En la inflamación inducida por adyuvante, a pesar de una inflamación más grave de la pata/tobillos (es decir, un aumento del 40-50% en el diámetro frente al nivel inicial a de 4 h a 6 h), las células formadoras de hueso tienden a mostrar potentes efectos antiinflamatorios (efecto pico del 75-90%) similares a la inhibición por dexametasona (figura 5), que se mantienen a las 24 h.

REIVINDICACIONES

1. Osteoblastos aislados para su uso en el tratamiento del componente inflamatorio de enfermedades reumáticas inflamatorias (ERI).
- 5 2. Osteoblastos aislados para su uso en el tratamiento del componente inflamatorio de ERI según la reivindicación 1, derivándose dichos osteoblastos mediante diferenciación de células madre de médula ósea aisladas o células madre mesenquimatosas.
- 10 3. Osteoblastos aislados para su uso en el tratamiento del componente inflamatorio de ERI según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, siendo los osteoblastos de origen humano y empleándose el medicamento para la administración autóloga o alogénica a sujetos humanos.
- 15 4. Osteoblastos aislados para su uso en el tratamiento del componente inflamatorio de ERI según la reivindicación 3, siendo dicha administración sistémica, tópica, intraarticular o periarticular.
- 20 5. Osteoblastos aislados para su uso en el tratamiento del componente inflamatorio de ERI según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, eligiéndose la ERI de osteoartritis (OA), artropatía psoriásica, gota, pseudogota y artritis de diversos orígenes que comprende artritis reumatoide (AR), artritis enteropática, artritis reactiva y síndrome de Reiter, osteonecrosis, artritis reumatoide juvenil pauciarticular, enfermedad de Still, enfermedad de Behçet, lupus eritematoso sistémico, artritis séptica y espondiloartropatías que comprenden espondilitis anquilosante, espondilitis enteropática y espondiloartropatía no diferenciada.
- 25 6. Osteoblastos aislados para su uso en el tratamiento del componente inflamatorio de ERI según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, siendo la ERI distinta de osteoartritis (OA), artritis reumatoide (AR) y osteonecrosis.
- 30 7. Osteoblastos aislados para su uso en el tratamiento del compuesto inflamatorio de ERI según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo la ERI tanto una inflamación como lesión/lesiones ósea(s).
- 35 8. Osteoblastos aislados para su uso en el tratamiento del componente inflamatorio de ERI según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo la ERI una inflamación y no comprendiendo lesión/lesiones ósea(s).
9. Composición farmacéutica que comprende osteoblastos y un agente elegido de fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME) y glucocorticoides, para su uso simultáneo, secuencial o separado en el tratamiento del componente inflamatorio de ERI.
- 40 10. Composición farmacéutica que comprende osteoblastos para su uso en el tratamiento del componente inflamatorio de ERI, particularmente para su uso tal como se define según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8.

FIGURA 1

Ejemplo 1



Ejemplo 2

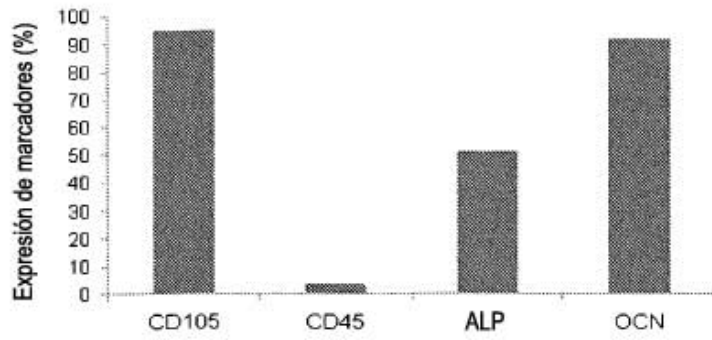


FIGURA 2

Figura 2

Mineralización

Tinción de ALP

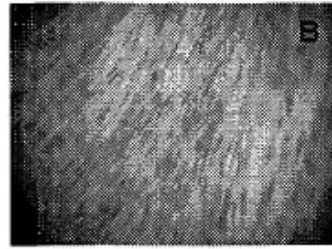
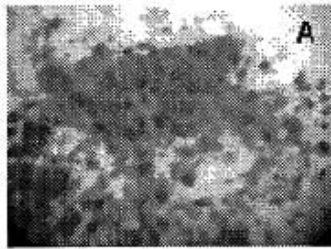


FIGURA 3

Evolución de los diámetros de los tobillos frente al nivel inicial

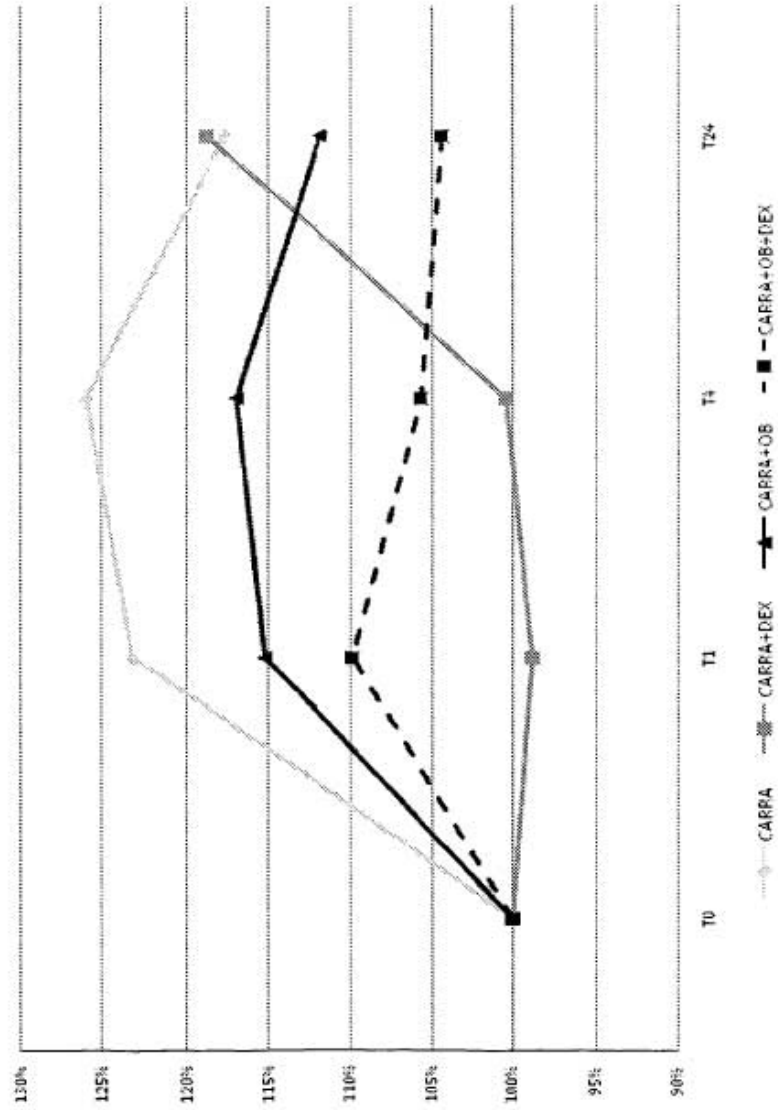


FIGURA 4

Evolución del diámetro de las patas frente al nivel inicial

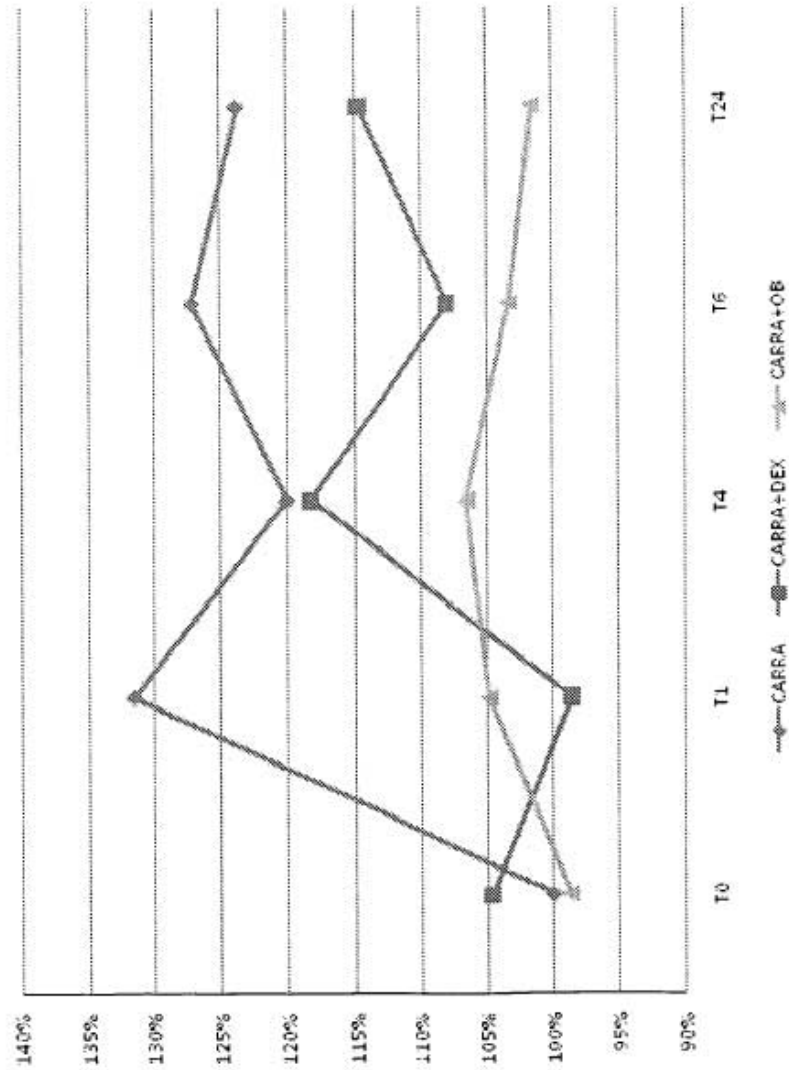


FIGURA 5

Evolución del diámetro de las patas frente al nivel inicial

