

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 916**

51 Int. Cl.:

C12N 5/074 (2010.01)

C12N 5/077 (2010.01)

A61K 35/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2006 E 06772099 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2013 EP 1888123**

54 Título: **Una terapia celular para degeneración ocular**

30 Prioridad:

08.06.2005 US 688637 P

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

15.04.2013

73 Titular/es:

**JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044 , US**

72 Inventor/es:

MISTRY, SANJAY

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 400 916 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

Una terapia celular para degeneración ocular

Antecedentes

5 Como un órgano complejo y sensible del cuerpo que es, el ojo puede experimentar numerosas enfermedades y otras
afecciones deletéreas que afectan su capacidad para funcionar normalmente. Muchas de estas afecciones están
asociadas con daño o degeneración de células oculares específicas y de tejidos elaborados de esas células. Como un
ejemplo, las enfermedades y las afecciones degenerativas del nervio óptico y la retina son las principales causas de
ceguera en todo el mundo. Daño o degeneración de la córnea, el cristalino y tejidos oculares asociados representan
10 otra causa significativa de pérdida de visión. La retina contiene siete capas de células alternantes y de procedimientos
que convierten una señal de luz en una señal neuronal. Los fotorreceptores retinales y el epitelio de pigmento retinal
(RPE) forman una unidad funcional que, en muchos trastornos, llega a estar desequilibrada debido a mutaciones
genéticas o a condiciones ambientales (incluyendo la edad). Esto resulta en pérdida de fotorreceptores: por apoptosis
o degeneración secundaria, que conduce a deterioro progresivo de visión y en algunos casos, a ceguera (para una
15 revisión, véase, por ejemplo, Lund, R.D. y cols., 2001, *Progress in Retinal and Eye Research* 20: 415-449). Dos fases
de trastornos oculares que tienen dentro este patrón son degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y
retinitis pigmentosa (RP).

AMD es la causa más común de pérdida de visión en los Estados Unidos en aquellos de 50 años o mayores; y su
prevalencia se incrementa con la edad. El trastorno principal en AMD parece deberse a disfunción de RPE y a cambios
20 en membranas de Bruch, por ejemplo, deposición de lípidos, reticulación proteica y permeabilidad a nutrientes (Lund y
cols., 2001). Diversos elementos pueden contribuir a degeneración macular, incluyendo conformación genética, edad,
nutrición, fumar y exposición a luz solar.

RP se considera principalmente una enfermedad hereditaria: más de 100 mutaciones se han asociados con pérdida de
fotorreceptores (Lund y cols., 2001). Aunque la mayoría de las mutaciones van dirigidas a los fotorreceptores, algunas
afectan directamente a las células de RPE. Conjuntamente, estas mutaciones afectan a procesos tales como tráfico
25 molecular entre fotorreceptores y células de RPE y fototransducción, por ejemplo.

Otras retinopatías menos comunes, pero no obstante debilitantes pueden implicar también degeneración celular
progresiva que conduce a pérdida de visión y a ceguera. Estas incluyen, por ejemplo, retinopatía diabética y
membrana neovascular coroidea (CNVM). La retinopatía diabética se puede clasificar como (1) retinopatía no
proliferativa o retinopatía de fondo, caracterizada por permeabilidad capilarmente incrementada, edema, hemorragia,
30 microaneurismas y exudados, o 2) retinopatía proliferativa, caracterizada por neovascularización que se extiende a
partir de la retina hasta la formación de tejido fibroso, de cicatrización, vítreo y potencial para el desprendimiento de
retina. En CNVM, vasos sanguíneos anormales que se derivan del corioide crecen a través de las capas retinales. Los
vasos nuevos frágiles se rompen fácilmente, causando que sangre y fluido se almacenen dentro de las capas de la
retina.

35 El daño o la degeneración progresiva del nervio óptico y los nervios relacionados del ojo constituye otra causa principal
de pérdida de visión y ceguera. Un ejemplo excelente es glaucoma, una afección ocular que está formada por una
colección de enfermedades oculares que causan pérdida de visión con daño al nervio óptico. La presión intraocular
elevada (IOP) debida al drenaje ocular inadecuado es una causa principal de glaucoma, pero puede también
desarrollarse en la ausencia de IOP elevada.

40 El glaucoma puede desarrollarse según el ojo envejece, o puede tener lugar como resultado de una lesión ocular,
inflamación ocular, tumor ocular, o en casos avanzados de cataratas o diabetes, o pueden causarse por ciertos
fármacos, tales como, por ejemplo esteroides. Las características primarias de la neuropatía óptica en el glaucoma
incluyen cambios característicos en la cabeza del nervio óptico, un decrecimiento en número de células de ganglios
retinales supervivientes y pérdida de visión. Se ha propuesto que una cascada de eventos une la degeneración del
45 nervio óptico con la muerte lenta de células glanglionares retinales observada en la enfermedad y esta cascada de
eventos puede ralentizarse o evitarse por el uso de agentes neuroprotectores (Osborne y cols., 2003, *Eur. J.*
Ophthalmol, 13 (Supl. 3): S19-S26).

El daño celular y las afecciones degenerativas también afectan otras partes del ojo. Por ejemplo, las cataratas resultan
de la opacificación gradual del cristalino del ojo. Se cree que una vez que comienza, el desarrollo de cataratas continúa
50 a lo largo de una o más rutas comunes que culminan en daño a las fibras del cristalino. Esta afección se trata
actualmente por eliminación quirúrgica y reemplazo del cristalino afectado. Otro ejemplo se refiere a la córnea y a la
conjuntiva circundante que forma la superficie ocular. El epitelio límbico, localizado entre la córnea y la conjuntiva
bulbar, contiene células madre epiteliales corneales. La deficiencia celular del epitelio límbico (LECD) es una afección
que tiene lugar, por ejemplo, en el síndrome de Stevens-Johnson y en las quemaduras térmicas o químicas. LECD
55 conduce a menudo a un desequilibrio entre el epitelio córneo y el epitelio conjuntival en el que la córnea se reviste por
células epiteliales conjuntivales invasoras, lo que compromete gravemente la superficie córnea y afecta la agudeza
visual (Nakamura, T. y Kinoshita, S., 2003. *Cornea* 22 (Supl. 1): S75-S80).

- La reciente aparición de la terapia basada en células madre para reparación y regeneración tisular proporciona tratamientos prometedores para un número de patologías degenerativas celulares mencionadas anteriormente y para otros trastornos oculares. Las células madre son capaces de autorrenovación y diferenciación para generar diversos linajes de células maduras. El trasplante de tales células puede usarse como una herramienta clínica para reconstruir un tejido diana, restaurando de este modo funcionalidad fisiológica y anatómica. La aplicación de tecnología de células madre es de amplio intervalo, incluyendo ingeniería tisular, desarrollo de terapia génica y productos terapéuticos celulares, es decir, administración de agentes bioterapéuticos a una localización diana por medio de células vivas suministradas exógenamente o de componentes celulares que producen o contienen esos agentes (para una revisión, véase Tresco, P.A. y cols., 2000, *Advanced Drug Delivery Reviews* 42: 2-37).
- Un obstáculo para realización del potencial terapéutico de tecnología de células madre ha sido la dificultad en obtener cantidades suficientes de células madre. Una fuente de células madre es el tejido embrionario o fetal. Las células madre y progenitoras embrionarias se han aislado a partir de un número de especies de mamíferos, incluyendo seres humanos y varios de tales tipos celulares se han mostrado capaces de autorrenovación y expansión, así como de diferenciación en diversos linajes celulares. En sistemas de modelos animales, se ha comunicado que las células madre embrionarias se diferencian en un fenotipo celular RPE, así como que potencian la supervivencia de los fotorreceptores del huésped tras trasplante (Haruta M. y cols. 2004, *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.* 45: 1020-1025; Schraermeyer, U. y cols., 2001, *Cell Transplantation* 10: 673-680). Pero la derivación de células madre a partir de fuentes embrionarias o fetales ha planteado muchos problemas éticos que es deseable evitar identificando otras fuentes de células multipotentes o pluripotenciales.
- El tejido adulto también puede proporcionar células madre útiles para la terapia ocular basada en células. Por ejemplo, las células madre retinales y corneales por sí mismas pueden usarse para terapia de reemplazo celular en el ojo. Además, se ha comunicado que las células madre neuronales del hipocampo se integran con la retina del huésped, adoptando ciertas características neuronales y gliales (véase la revisión de Lund, R.L. y cols., 2003, *J. Leukocyte Biol.* 74: 151-160). Las células madre neuronales preparadas a partir del córtex de rata fetal estaban mostrando diferenciarse a lo largo de una ruta celular de RPE tras trasplante en el espacio subretinal del adulto (Enzmann, V. y cols., 2003, *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.*: 5417-5422).
- Se ha comunicado que las células madre de la médula ósea se diferencian en células neuronales retinales y fotorreceptores tras trasplante en retinas del huésped (Tomita, M. y cols., 2002, *Stem Cells* 20: 279-283; Kicic, A. y cols., 2003, *J. Neurosci.* 23: 7742-7749). Kicic, A. y cols. comunican que las células madre mesenquimales CD90+ fueron capaces de integración en la retina del huésped. Estas células sufrieron diferenciación, formando estructuras similares a la capa fotorreceptora y expresando un marcador específico de fotorreceptor.
- Friedlander y cols. (Solicitud de Patente de los Estados Unidos US2005/0063961 publicada, asignada a The Scripps Research Institute, CA) comunican el rescate de vasos sanguíneos y redes neuronales en el ojo por la inyección de células madre hematopoyéticas Lin⁻/CD31⁺ dentro del ojo.
- Zhang y cols. (2004) describen un procedimiento de tratamiento de ratas que tienen ojos dañados por láser inyectando células madre mesenquimales CD44⁺, CD45⁻ subretinalmente. Zubaty y cols. (2005) describen un procedimiento de tratamiento de ratas que tienen una distrofia retinal acuosa inyectando células madre mesenquimales. Sakaguchi y cols. (2002) describen inyectar células madre mesenquimales CD105⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD14⁻, CD34⁻ y CD45⁻ dentro de la cámara vítrea de los ojos de un ratón de un día de edad.
- Se ha comunicado también una reconstrucción de superficie ocular en un sistema de modelo de conejo, que usa células madre epiteliales mucosales cultivadas (Nakamura, T. & Kinoshita, S., 2003, *supra*). Mientras que estas comunicaciones muestran promesa para el uso de células progenitoras y de células madre adultas en terapia basada en células para el ojo, debe destacarse que las poblaciones de células madre adultas son comparativamente raras y son a menudo obtenibles solamente por procedimientos invasivos.
- Adicionalmente, las células madre adultas pueden tener una capacidad más limitada para expandirse en cultivo de lo que lo hacen las células madre embrionarias. Así, existe una necesidad de fuentes alternativas de suministros adecuados de células que tengan la capacidad de respaldar, aumentar o reemplazar la función celular perdida en el ojo. Un suministro fiable, bien caracterizado y abundante de poblaciones sustancialmente homogéneas de tales células sería una ventaja en diversas aplicaciones diagnósticas y terapéuticas en reparación y regeneración ocular, incluyendo ensayos de rastreo de fármacos, soporte trófico *ex vivo* o *in vitro* de células oculares y de otros tipos de células útiles y terapia *in vivo* basada en células.
- Para este fin, la presente invención está dirigida al uso de líneas celulares como una terapia para enfermedad ocular. Se probaron varias líneas celulares en un modelo de roedor de retinitis pigmentosa, de acuerdo con procedimientos divulgados en la Solicitud de Patente de los EE.UU. US2005/0037491 publicada. La presente invención describe el uso de células madre mesenquimales humanas como que es útil como una terapia para enfermedad ocular.

Sumario

Esta invención proporciona composición aplicable a terapia basada en células o regenerativa para enfermedades y

5 trastornos oftálmicos. En particular, la invención pone de relieve las células madre mesenquimales, opcionalmente con composiciones farmacéuticas o dispositivos para la reparación o regeneración de células o tejidos en el ojo. Una vez trasplantadas en una localización diana en el ojo, las células madre mesenquimales de la invención pueden proporcionar soporte trófico para las células oculares *in situ*, o pueden diferenciarse por sí mismas en uno o más fenotipos, o pueden ejercer un efecto benéfico en ambas de esas maneras, pero las células no forman estructuras similares a la capa fotorreceptora y no expresan un marcador específico de fotorreceptor, tal como rodopsina.

10 Un aspecto de la invención pone de relieve células madre mesenquimales humanas para usar en un procedimiento de tratamiento de un paciente que tenga una afección ocular degenerativa, que comprende administrar al paciente dichas células madre mesenquimales multipotentes o pluripotenciales, en una cantidad efectiva para tratar la afección ocular degenerativa. En ciertas realizaciones, la afección ocular degenerativa es una afección ocular degenerativa tal como traumatismo cerebral, traumatismo nervioso óptico o lesión ocular. En otras realizaciones, es una afección degenerativa crónica o progresiva, tal como una degeneración macular, retinitis pigmentosa, retinopatía diabética, glaucoma, una deficiencia celular epitelial límbica, o una deficiencia celular epitelial de pigmentos retinales. En ciertas realizaciones, las células se inducen *in vitro* para diferenciarse en células de linaje neuronal o epitelial antes de administración.

15 En una realización, las células madre mesenquimales promueven la supervivencia o proliferación de fotorreceptores endógenos en el ojo. En una realización alternativa, las células madre mesenquimales promueven la diferenciación de células madre endógenas o de células precursoras a fotorreceptores.

20 Las células madre mesenquimales son positivas para la expresión de los siguientes marcadores: CD29, CD44, CD105 o CD166 y negativas para la expresión de los siguientes marcadores: CD14, CD34 o CD45.

25 En ciertas realizaciones, las células se pueden administrar con al menos un tipo celular, tal como, por ejemplo, un astrocito, un oligodendrocito, una neurona, una célula progenitora epitelial retinal, una célula madre epitelial corneal, o una célula multipotente o pluripotente distinta. En estas realizaciones, el otro tipo celular puede administrarse simultáneamente con, o antes de, o después de, las células madre mesenquimales. Además, en estas y otras realizaciones, las células se pueden administrar con al menos otro agente, tal como un fármaco para terapia ocular, u otro agente farmacéutico benéfico tal como, por ejemplo, un agente antiinflamatorio, un agente antiapoptótico, un antioxidante o un factor de crecimiento. En estas realizaciones, el otro agente puede administrarse simultáneamente con, o antes de, o después de, las células madre mesenquimales.

30 La célula mesenquimal adecuada para usar en la presente invención puede derivarse de tejidos tales como, por ejemplo, médula ósea, sangre de cordón umbilical, saco y fluido amniótico, placenta, piel, grasa, músculo, vasculatura, hígado, páncreas, o sangre periférica. Las células pueden ser xenogénicas, alogénicas o autólogas en origen. Las células pueden aislarse del donante y pueden trasplantarse inmediatamente. Alternativamente, las células pueden expandirse *in vitro* antes del trasplante.

35 Las células de la presente invención pueden almacenarse criogénicamente. Antes del trasplante, las células pueden descongelarse y trasplantarse inmediatamente. Alternativamente, las células descongeladas pueden cultivarse y/o expandirse *in vitro* antes del trasplante. Alternativamente, las células pueden trasplantarse como un sedimento congelado.

40 En diversas realizaciones, las células pueden administrarse a la superficie de un ojo, o pueden administrarse al interior de un ojo o a una localización en la proximidad del ojo, tal como, por ejemplo, detrás del ojo, o al espacio subretinal.

Las células pueden administrarse a través de una cánula o a partir de un dispositivo implantado en el cuerpo del paciente dentro del ojo o en proximidad al ojo, o pueden administrarse por implantación de una matriz o soporte que contenga las células.

45 Se divulga en el presente documento una composición farmacéutica para tratar un paciente que tenga una afección ocular, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y células madre mesenquimales de la presente invención en una cantidad efectiva para tratar la afección degenerativa ocular. La afección degenerativa ocular puede ser una afección aguda, crónica o progresiva. En ciertas realizaciones, la composición comprende las células mesenquimales de la presente invención que se han inducido *in vitro* a diferenciarse en células de linaje neuronal o epitelial antes de formulación de la composición. Alternativamente, la composición comprende las células madre mesenquimales de la presente invención que se diferencian en células de linaje neuronal o epitelial *in situ*, tras el trasplante.

50 En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica puede comprender al menos un tipo celular, tal como un astrocito, un oligodendrocito, una neurona, una célula progenitora neuronal, una célula madre neuronal, una célula madre epitelial retinal, una célula madre epitelial corneal, o una célula madre multipotente o pluripotente distinta. En estas u otras realizaciones, la composición farmacéutica puede comprender al menos un agente distinto, tal como un fármaco para tratar el trastorno degenerativo ocular u otros agentes farmacéuticos beneficiosos, tales como, por ejemplo, agentes antiinflamatorios, agentes antiapoptóticos, antioxidantes o factores de crecimiento.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden formularse para administración a la superficie de un ojo. Alternativamente, pueden formularse para administración al interior de un ojo o en sus proximidades (por ejemplo, detrás del ojo). Las composiciones pueden formularse también como una matriz o soporte que contiene las células.

- 5 Se divulga en el presente documento que se proporciona un kit para tratar un paciente que tiene una afección degenerativa ocular. El kit puede comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable, una población de células madre mesenquimales e instrucciones para usar el kit en un procedimiento de tratamiento del paciente. El kit puede contener también uno o más componentes adicionales, tales como reactivos e instrucciones para cultivar las células, o una población de al menos un tipo celular distinto, o uno o más agentes útiles en el tratamiento de una afección degenerativa ocular.
- 10 Se divulga en el presente documento un procedimiento para incrementar el crecimiento de supervivencia o la actividad de células para trasplante para tratar un trastorno degenerativo ocular. El procedimiento comprende poner en contacto células madre mesenquimales con al menos un agente farmacéutico, tales como, por ejemplo, factores de crecimiento, factores tróficos, medio condicionado, agentes antiinflamatorios, agentes antiapoptóticos, antioxidantes, factores neurotróficos o fármacos neurodegenerativos o neuroprotectores. Alternativamente, el procedimiento puede comprender co-cultivar células madre mesenquimales con al menos un tipo celular, tal como un astrocito, un oligodendrocito, una neurona, una célula progenitora neuronal, una célula madre neuronal, una célula madre epitelial retinal, una célula madre epitelial corneal, o célula madre multipotente o pluripotente distinta, antes del trasplante. Se pueden añadir agentes tales como, por ejemplo, factores de crecimiento, factores tróficos, medio condicionado, agentes antiinflamatorios, agentes antiapoptóticos, antioxidantes, factores neurotróficos o neuroregenerativos o fármacos neuroprotectores. Se divulga asimismo un kit para poner en práctica el procedimiento. El kit comprende células madre mesenquimales e instrucciones para tratar las células con al menos un agente efectivo para incrementar la supervivencia, crecimiento o actividad de las células para trasplante. El kit puede incluir al menos un tipo celular e instrucciones sobre el co-cultivo de el al menos un tipo celular distinto con células madre mesenquimales.

Breve descripción de los dibujos

- 25 **Figura 1: Sumario de registros de ERG a partir de ratas RCS que reciben trasplantes celulares.** Los datos mostrados son la amplitud media de los registros de ERG (mV) obtenidos a partir de ratas a 60 (panel A) y 90 (panel B) días tras el trasplante (n = 5 animales por afección). Se tomaron registros de los ojos de ratas que reciben células derivadas del cordón umbilical (barras negras) y del ojo operado de forma simulada contralateral (barras moteadas de negro). Se tomaron registros de los ojos de ratas que reciben MSC de Cambrex (POIETICS™, N.º de catálogo PT-2501) (barras grises) y del ojo operado de forma simulada contralateral (barras moteadas de gris). Se tomaron registros de los ojos de ratas que reciben células derivadas de la placenta (barras blancas) y del ojo operado de forma simulada contralateral (barras rayadas horizontalmente de gris).

- 35 **Figura 2: Agudeza visual de las ratas RCS que recibieron MSC de la presente invención** Los datos mostrados son la agudeza visual de animales a 4 meses de edad (n = 7), a partir de ratas operadas de forma simulada (barras blancas), o MSC de la presente invención (barras negras).

- 40 **Figura 3: Umbrales visuales de las ratas RCS que recibieron MSC de la presente invención** Los datos mostrados son la agudeza visual de animales a 4 meses de edad (n = 7) que recibieron injertos de MSC en el ojo izquierdo (Δ) o derecho (◆). Se incluyeron datos de los ojos operados de forma simulada contralaterales (izquierda ▲: derecha ■) como controles.

- 40 **Figura 4: Una sección histológica de una retina de un animal que recibe MSC de la presente invención.** Se obtuvo sección tisular a partir de un animal injertado 100 días después del procedimiento.

Descripción detallada

- Los términos "ocular", "oftálmico" y "óptico" se usaron de manera indistinta en el presente documento para definir "del, o sobre el, o relativo al ojo". El término "afección ocular degenerativa" (o "trastorno") es un término inclusivo que comprende afecciones, trastornos o enfermedades crónicas o agudas del ojo, incluida la conexión neuronal entre el ojo y el cerebro, que implican daño, degeneración o pérdida celular. Una afección degenerativa ocular puede estar relacionada con la edad, o puede resultar de lesión o traumatismo, o puede estar relacionada con una enfermedad o trastorno específico. Las afecciones degenerativas oculares agudas incluyen, pero no se limitan a, afecciones asociadas con muerte celular o puesta en peligro de las células que afectan al ojo incluyendo afecciones que surgen de insuficiencia cerebrovascular, traumatismo cerebral focal o difuso, daño cerebral difuso, infección o afecciones inflamatorias del ojo, desgarro o desprendimiento de retina, lesiones intraoculares (penetración por contusión, compresión, laceración) u otro daño físico (por ejemplo, quemaduras físicas o químicas). Las afecciones degenerativas oculares crónicas (incluyendo afecciones progresivas) incluyen, pero no se limitan a, retinopatías y otros trastornos retinales/maculares tales como retinitis pigmentosa (RP), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), membrana neovascular coroidea (CN-VM); retinopatías tales como retinopatía diabética, retinopatía oclusiva, retinopatía drepanocítica y retinopatía hipertensiva, oclusión de vena retinal central, estenosis de la arteria carótida, neuropatías ópticas tales como glaucoma y síndromes relacionados; trastornos del cristalino y del ojo externo, por ejemplo, deficiencia de células madre límbicas (LSCD), también referida como deficiencia de células

5 epiteliales límbicas (LECD), tal como ocurre en daño químico o térmico, síndrome de Steven-Johnson, queratopatía inducida por lentes de contacto, penfigoide cicatricial ocular, enfermedades congénitas de aniridia I o displasia ectodérmica y queratitis asociada con deficiencia endocrina múltiple. El término tratamiento (o tratamiento de) una afección degenerativa ocular hace referencia a mejorar los efectos de, o retardar, detener o revertir el progreso de, o retardar o evitar la aparición de, una afección degenerativa ocular según se define en el presente documento.

10 El término "cantidad efectiva" hace referencia a una concentración o cantidad de un reactivo o composición farmacéutica, tal como un factor de crecimiento, agente de diferenciación, factor trófico, población celular u otro agente, que es efectivo para producir un resultado deseado, incluyendo crecimiento y/o diferenciación celular *in vitro* o *in vivo*, o tratamiento de afecciones degenerativas oculares, como se describe en el presente documento. Con respecto a los factores de crecimiento, una cantidad efectiva puede variar de aproximadamente 1 nanogramo/mililitro a aproximadamente 1 microgramo/mililitro. Con respecto a MSC según se administran a un paciente *in vivo*, una cantidad efectiva puede variar desde tan pocas como varios miles o menos a tantas como varios millones o más. En realizaciones específicas, una cantidad efectiva puede variar desde 10^3 , más específicamente al menos aproximadamente 10^4 células. Se apreciará que el número de células a administrarse variará dependiendo de los aspectos específicos del trastorno a tratarse, incluyendo pero no limitados a un tamaño o volumen/área de superficie total a tratarse, así como a proximidad del sitio de administración a la localización de la región a tratarse, entre otros factores familiares al biólogo médico.

20 Los términos "periodo efectivo" (o "tiempo") y "condiciones efectivas" hacen referencia a un periodo de tiempo o a otras condiciones controlables (por ejemplo, temperatura, humedad para procedimientos *in vitro*), necesarias o preferidas para un agente o composición farmacéutica para lograr su resultado deseado.

El término "paciente" o "sujeto" hace referencia a animales, preferentemente seres humanos, quienes se tratan con las composiciones farmacéuticas o de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento.

25 Una "célula madre" como se usa en el presente documento hace referencia a células indiferenciadas definidas por la capacidad de una célula individual tanto para autorrenovarse, como para diferenciarse para producir células de progenie, incluyendo progenitoras que se autorrenuevan, progenitoras que no se autorrenuevan y células diferenciadas de forma terminal. Las células madre se caracterizan también por su capacidad para diferenciarse *in vitro* en células funcionales de diversos linajes celulares a partir de capas germinales múltiples (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como para dar lugar a tejidos de capas germinales múltiples tras trasplante y para contribuir sustancialmente a la mayoría, si no a todos, los tejidos tras la inyección en blastocistos.

30 Las células madre pueden ser totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes, o unipotentes. Las células totipotentes son capaces de dar lugar a todos los tipos celulares embrionarios y extraembrionarios. Las células pluripotentes son capaces de dar lugar a todos los tipos celulares embrionarios. Las células multipotentes incluyen aquellas capaces de dar lugar a un subgrupo de linajes celulares, pero todos dentro de un tejido, órgano, o sistema fisiológico particular (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir progenie que incluye HSC (auto-renovación), progenitores oligopotentes restringidos a células sanguíneas y todos los tipos y elementos celulares (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre). Las células que son oligopotentes pueden dar lugar a un subgrupo más restringido de linajes celulares que las células madre multipotentes; y las células que son unipotentes son capaces de dar lugar a un linaje celular individual (por ejemplo, células madre espermátogénicas). Las células madre se clasifican también sobre la base de la fuente a partir de la que se han obtenido. Una célula madre adulta es generalmente una célula indiferenciada multipotente encontrada en tejido que comprende múltiples tipos celulares diferenciados. La célula madre adulta puede renovarse a sí misma. En circunstancias normales, puede diferenciarse también proporcionando los tipos celulares especializados del tejido a partir del que se origina y posiblemente otros tipos celulares.

45 La "célula madre mesenquimal" ("MSC") hace referencia a una célula que se origina a partir del mesodermo de un mamífero que no está totalmente diferenciada y que tiene el potencial para diferenciarse en diversas células o tejidos, incluyendo: tejido conectivo, hueso y cartílago, músculo, sangre y vasos sanguíneos, órganos linfáticos y linfoides, notocordio, pleura, pericardio, riñón y gónadas.

50 Una "célula progenitora" hace referencia a una célula que se deriva de una célula madre por diferenciación y que es capaz de diferenciación adicional a más tipos celulares maduros. Las células progenitoras tienen normalmente una capacidad de proliferación más restringida comparadas con las células madre.

Por "medios acondicionados" se quiere decir aquella población de células en crecimiento en un medio y que aporta factores solubles al medio. En un uso tal, las células se retiraron del medio sin embargo los factores solubles producidos por estas células permanecen. Este medio se usa después para nutrir una población de células diferente en presencia de los factores solubles producidos por la población celular de las células.

55 Los "marcadores" como se usan en el presente documento, son moléculas de ácidos nucleicos o polipeptídicas que se expresan diferencialmente en una célula de interés. En este contexto, la expresión diferencial quiere decir un nivel incrementado del marcador para un marcador positivo y un nivel disminuido para un marcador negativo. El nivel detectable del ácido nucleico marcador o polipéptido marcador es suficientemente más alto o más bajo en las células

de interés, comparado con otras células, de tal forma que la célula de interés se puede identificar y distinguir de otras células, usando cualquiera de diversos procedimientos conocidos en la técnica.

Las moléculas del "grupo de diferenciación" (CD) son marcadores sobre la superficie celular, según se reconocen por grupos específicos de anticuerpos, usados para identificar el tipo celular, la fase de diferenciación y el estado de diferenciación de la célula. La función y la designación de marcadores CD está bien establecida en la técnica. Véase, por ejemplo, The Leukocyte Antigen Fact Book, 2ª edición, Barclay, A. N. y cols. Academic Press, Londres 1997.

"CD14" es un receptor de afinidad alta por el complejo de lipopolisacáridos (LPS) y proteína de unión a LPS (LBP). El antígeno CD14 es parte del complejo receptor de LPS heteromérico funcional compuesto de CD14, TLR4 y MD-2. CD14 se expresa fuertemente en la mayoría de los monocitos y macrófagos humanos en sangre periférica, otros fluidos corporales y diversos tejidos, tales como nódulos linfáticos y bazo. CD14 se expresa débilmente en subpoblaciones de neutrófilos humanos y células dendríticas humanas.

"CD29" se refiere también como "receptor de fibronectina, polipéptido beta".

"CD34" es una glucoproteína transmembranal expresada constitutivamente en células endoteliales y en células madre hematopoyéticas. Esta molécula altamente O-glucosilada, que contiene dominios similares a mucina ricos en serina y treonina, se une a L-selectina.

"CD44" se refiere también como "antígeno de Hermes" y es el receptor de superficie celular principal de hialuronano. Este CD se expresa principalmente en la mayoría de los tipos celulares, salvo en células/tejidos tales como hepatocitos, algunas células epiteliales y músculo cardíaco.

"CD45" hace referencia al antígeno común de leucocitos que tiene una secuencia descrita en el Número de Acceso de Genbank Y00638, o una secuencia variante que se da en la naturaleza de la misma (por ejemplo, variante alélica).

"CD105" se refiere también como "Endoglina" y se expresa principalmente en células endoteliales, monocitos, macrófagos, células estromales y células mesenquimales de la médula ósea.

"CD166" es una glucoproteína de tipo 1 expresada en células T activadas, células B y monocitos y parece ser el ligando para CD6 (1,2). El CD166 humano puede ser importante para la activación de células T.

El término "vehículo (o medio) farmacéuticamente aceptable" que puede usarse intercambiamente con el término "vehículo biológicamente compatible" o "medio", hace referencia a reactivos, células, compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que no solamente son compatibles con las células y otros agentes a administrarse terapéuticamente, sino que también son, dentro del alcance del juicio médico bien fundado, adecuado para usar en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otra complicación en consonancia con una proporción beneficio/riesgo razonable.

Se usan varios términos en el presente documento con respecto a la terapia de reemplazo celular. Los términos "transferencia autóloga", "trasplante autólogo", "autoinjerto" y similares, hacen referencia a tratamientos en los que el donante de las células es también el receptor de la terapia de reemplazo celular. Los términos "transferencia alogénica", "trasplante alogénico", "alotrasplante" y similares, se refieren a tratamientos en los que el donante celular es de la misma especie que el receptor de la terapia de reemplazo celular, pero no es el mismo individuo. Una transferencia celular en la que las células del donante han sido coincidentes en histocompatibilidad con un receptor se refiere algunas veces como una "transferencia singénica". Los términos "transferencia xenogénica", "trasplante xenogénico", "xenotrasplante" y similares, hacen referencia a tratamientos en los que el donante de las células es de una especie diferente que el receptor de la terapia de reemplazo celular.

Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales.

Las células madre mesenquimales adecuadas para usar en los procedimientos de la presente invención se pueden obtener de tejidos, por ejemplo, médula ósea, sangre del cordón umbilical, saco amniótico, fluido amniótico, placenta, piel, grasa, músculo, vasculatura, hígado, páncreas, o sangre periférica, usando procedimientos que son bien conocidos en la técnica. El aislamiento de una población de células madre mesenquimales se puede lograr usando proteínas específicas de anticuerpos monoclonales expresadas en la superficie de las MSC. Los anticuerpos monoclonales se pueden adherir a sustrato para facilitar la separación de las células unidas. Los procedimientos que se pueden usar para aislar MSC adecuadas para usar en la presente invención puede elegirse por alguien de habilidad ordinaria en la técnica. Ejemplos de tales procedimientos se enseñan en los documentos US6087113, US6261549, US5914262, US5908782 y US20040058412.

Las MSC pueden caracterizarse, por ejemplo, por características de crecimiento (por ejemplo, capacidad de duplicación de la población, tiempo de duplicación, pasos hasta senescencia), análisis del cariotipo (por ejemplo, cariotipo normal, linaje maternal o neonatal), citometría de flujo (por ejemplo, análisis de FACS), inmunohistoquímica y/o inmunocitoquímica (por ejemplo, para detección de epítomos), realización de perfiles de expresión génica (por ejemplo, disposiciones de chips genéticos; reacción en cadena de la polimerasa (por ejemplo, PCR de transcriptasa reversa, PCR en tiempo real y PCR convencional)), disposiciones de proteínas, proteína de secreción-19 (por ejemplo,

por ensayo de coagulación de plasma o por análisis de medio condicionado por PCR, por ejemplo, por Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA)), reacción de linfocitos mixta (por ejemplo, como medida de estimulación de PBMC), y/u otros procedimientos conocidos en la técnica.

5 Células madre mesenquimales adecuadas para usar en los procedimientos de la presente invención pueden incluir células obtenidas a partir de fuentes comerciales, tales como, por ejemplo células madre mesenquimales humanas vendidas con el nombre comercial POIETICS™ (Número de Cat.: PT-2501, Cambrex). Estas células madre mesenquimales son positivas para la expresión de los siguientes marcadores: CD29, CD44, CD105 y CD166. Las células son negativas para la expresión de los marcadores CD14, CD34 y CD45.

10 Las MSC aisladas, o el tejido del que se obtienen MSC se pueden usar para iniciar, o sembrar, cultivos celulares. Las células aisladas se pueden transferir a recipientes de cultivos de tejidos estériles bien no revestidos o bien revestidos con matriz extracelular o con ligandos tales como laminina, colágeno (nativo, desnaturalizado o reticulado), gelatina, fibronectina y otras proteínas de matriz extracelular. MSC se pueden cultivar en cualquier medio de cultivo capaz de mantener el crecimiento de las células tal como, por ejemplo, DMEM (glucosa alta o baja), DMEM avanzado, DMEM/MCDB 201, medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F12 de Ham (F12), medio de Dulbecco-17
15 modificado de Iscove, Medio de Crecimiento de Células Madre Mesenquimales (MSCGM), DMEM/F12, RPMI 1640 y CELL-GRO-FREE. El medio de cultivo puede suplementarse con uno o más componentes incluyendo, por ejemplo, suero fetal bovino (FBS); suero equino (ES); suero humano (HS); beta-mer-captoetanol (BME o 2-ME), preferentemente aproximadamente el 0,001 % (v/v); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor-1 de crecimiento similar a insulina (IGF-1),
20 factor inhibidor de leucocitos (LIF) y eritropoyetina; aminoácidos, incluyendo L-valina; y uno o más agentes antibióticos y/o antimicóticos para controlar contaminación microbiana, tales como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomycin, anfotericina B, genamicina y nistatina, bien solos o bien en combinación. Las células pueden sembrarse en recipientes de cultivo a una densidad para permitir crecimiento celular.

25 Se conocen bien en la técnica procedimientos para la selección del medio de cultivo más apropiado, de la preparación de medio más apropiada y de las técnicas de cultivo celular más apropiadas y se describen en diversas fuentes, incluyendo Doyle y cols., (eds.), 1995, CELL & TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES, John Wiley & Sons, Chichester; y Ho y Wang (eds.), 1991, ANIMAL CELL BIOREACTORS, Butterworth-Heinemann, Boston.

Uso de las células madre mesenquimales para tratar enfermedad oftálmica.

30 En un aspecto de la presente invención, las MSC se usan como una terapia celular para tratar una afección degenerativa ocular. Una vez trasplantadas dentro de una localización diana en el ojo, las MSC pueden proporcionar soporte trófico para células oculares *in situ*, o pueden diferenciarse por sí mismas en uno o más fenotipos, o pueden ejercer un efecto benéfico en ambas de esas maneras, entre otras cosas.

35 Las MSC pueden administrarse solas (por ejemplo, como poblaciones sustancialmente homogéneas) o como mezclas con otras células. Las MSC pueden administrarse en una preparación farmacéutica, usando vehículos farmacéuticamente aceptables convencionales. Donde MSC se administran con otras células, se pueden administrar simultáneamente o secuencialmente con las otras células (bien antes o bien después de las otras células). Las células que se pueden administrar en conjunción con MSC incluyen, pero no se limitan a, neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, células progenitoras neuronales, células madre neuronales, células progenitoras oculares, células madre epiteliales retinales o corneales y/o células madre multipotentes o pluripotentes. Las células de diferentes tipos
40 se pueden mezclar con las MSC inmediatamente o poco después de la administración, o pueden cocultivarse conjuntamente durante un periodo de tiempo anterior a la administración.

45 Las MSC pueden administrarse con al menos un agente farmacéutico, tal como, por ejemplo, factores de crecimiento, factores tróficos, medio acondicionado, u otros agentes activos, tales como agentes antiinflamatorios, agentes antiapoptóticos, antioxidantes, factores neurotróficos o fármacos neurodegenerativos o neuroprotectores como se conoce en la técnica. Cuando se administran MSC con otros agentes, ellas pueden administrarse conjuntamente en una composición farmacéutica individual, o en composiciones farmacéuticas separadas, simultánea o secuencialmente con los otros agentes (bien antes o bien después de la administración de los otros agentes).

50 Los ejemplos de otros componentes que se pueden administrar con células mesenquimales incluyen, pero no se limitan a: (1) otros fármacos neuroprotectores o neurobenéficos; (2) componentes de matriz extracelular seleccionados, tales como uno o más tipos de colágeno conocidos en la técnica, y/o factores de crecimiento, plasma rico en plaquetas y fármacos (alternativamente, las células pueden estar manipuladas genéticamente para expresar y producir factores de crecimiento); (3) agentes antiapoptóticos (por ejemplo, eritropoyetina (EPO), compuesto mimético de EPO, trombopoyetina, factor de crecimiento similar a insulina (IGF)-I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos, inhibidores de caspasa); (4) compuestos antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de MAP Cinasa p38, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDS) (tales como - 36 TEPOXALINA, TOLMETINA y SUPROFENO); (5) agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, tales como inhibidores de calcineurina, inhibidores de mTOR, antiproliferativos, corticosteroides y diversos anticuerpos; (6) antioxidantes tales como probucol, vitaminas C y E,
55

co-enzima Q-10, glutatión, L-cisteína y N-acetilcisteína; y (6) anestésicos locales, para nombrar unos pocos.

En una realización, se puede administrar MSC como células indiferenciadas, es decir, según se cultivan en el Medio de Crecimiento. Alternativamente, se puede administrar MSC tras exposición en cultivo a condiciones que estimulan diferenciación a un fenotipo deseado. Las células pueden implantarse quirúrgicamente, inyectarse o administrarse de otra manera directa o indirectamente al sitio de daño o sufrimiento ocular. Cuando las células se administran en dispositivos sólidos o semisólidos, la implantación quirúrgica en una localización precisa en el cuerpo es normalmente un medio adecuado de administración. Las composiciones farmacéuticas líquidas o fluidas, sin embargo, se pueden administrar a una localización más general en el ojo (por ejemplo, tópicamente o intraocularmente).

Otras realizaciones comprenden procedimientos de tratamiento de afecciones degenerativas oculares administrando composiciones farmacéuticas que comprenden componentes celulares de MSC (por ejemplo, lisados celulares o componentes de los mismos) o productos celulares de MSC (por ejemplo factores biológicos tróficos y otros producidos de forma natural por MSC o por modificación genética, medio condicionado a partir de cultivo de MSC).

De nuevo, estos procedimientos pueden comprender administrar otros agentes activos, tales como factores de crecimiento, factores neurotróficos o fármacos neuroregenerativos o neuroprotectores como se conocen en la técnica.

Las formas de dosificación y los regímenes para administrar MSC o cualquiera de las otras composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se desarrolla de acuerdo con la buena práctica médica, tomando en cuenta la condición de cada paciente individual, por ejemplo, naturaleza y extensión de la afección degenerativa ocular, edad, sexo, peso corporal y condición médica general y otros factores conocidos por los practicantes de la medicina. Así, la cantidad efectiva de una composición farmacéutica a administrarse a un paciente se determina por estas consideraciones como se conoce en la técnica.

Puede ser deseable o apropiado inmunosuprimir a un paciente antes de iniciar la terapia celular. Esto puede llevarse a cabo mediante el uso de agentes inmunosupresores sistémicos o locales, o puede llevarse a cabo administrando las células en un dispositivo encapsulado. Se conocen en la técnica estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmune a las células trasplantadas. Como una alternativa, las MSC pueden estar modificadas genéticamente para reducir su inmunogenicidad.

Se proporciona un procedimiento para tratar un paciente que tiene una afección degenerativa ocular, que puede comprender administrar al paciente una preparación hecha a partir de células madre mesenquimales, en una cantidad eficaz para tratar la afección ocular degenerativa, en la que la preparación comprende un lisado celular de las MSC, o un medio condicionado en el que las MSC se cultivaron, o se revela en el presente documento una matriz extracelular de las MSC. El lisado puede comprender al menos una o todas de las fracciones subcelulares de las MSC, tales como, por ejemplo la fracción de membrana plasmática. Se conocen bien en la técnica procedimientos de lisar células e incluyen diversos medios de disrupción mecánica, disrupción enzimática, o disrupción química, o combinaciones de los mismos. Tales lisados celulares se pueden preparar a partir de células directamente en su medio de crecimiento y así pueden contener factores de crecimiento segregados y similares, o pueden prepararse a partir de células lavadas libres de medio en, por ejemplo, PBS u otra solución. Las células lavadas se pueden resuspender a concentraciones más grandes que la densidad de población original si se prefiere. En una realización, los lisados celulares enteros se pueden preparar, por ejemplo, rompiendo células sin separación subsiguiente de las fracciones celulares. En otra realización, una fracción de membrana celular se separa a partir de una fracción soluble de las células por procedimientos de rutina conocidos en la técnica, por ejemplo, centrifugación, filtración, o procedimientos similares.

Los lisados celulares o las fracciones solubles celulares preparadas a partir de poblaciones de MSC se pueden usar como están, concentrados adicionalmente, mediante por ejemplo, ultrafiltración o liofilización, o incluso secados, parcialmente purificados, combinados con vehículos farmacéuticamente aceptables o con diluyentes como se conocen en la técnica, o combinados con otros compuestos tales como productos biológicos, por ejemplo composiciones proteicas farmacéuticamente útiles. Los lisados celulares o las fracciones de los mismos se pueden usar *in vitro* o *in vivo*, solos o por ejemplo, con células vivas autólogas o alogénicas. Los lisados, si se introducen *in vivo*, se pueden introducir localmente como un sitio de tratamiento, o remotamente para proporcionar, por ejemplo factores de crecimiento celulares necesarios a un paciente.

Se divulga aquí una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una preparación hecha de las células madre mesenquimales, que puede ser un lisado de las MSC, una matriz extracelular de las MSC o un medio condicionado en el que las MSC se cultivan. Se proporcionan también kits para poner en práctica este aspecto de la invención. Estos pueden incluir los uno o más de un vehículo farmacéuticamente aceptable o de otro agente o reactivo, uno o más de un lisado celular o fracción del mismo, una matriz extracelular o un medio condicionado de las MSC e instrucciones para uso de los componentes del kit.

Formulaciones farmacéuticas.

Las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento pueden comprender células MSC postparto, o componentes o productos de las mismas, formulados con un vehículo o medio farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen agua, solución salina (tal como solución de Ringer), alcoholes,

aceites, gelatinas y carbohidratos, tales como lactosa, amilosa, o almidón, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Tales preparaciones se pueden esterilizar y si se desea, mezclar con agentes auxiliares tales como lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influenciar presión osmótica, tampones y colorante. Normalmente, pero no exclusivamente, las composiciones farmacéuticas que comprenden componentes celulares o productos celulares, pero no células vivas, se formulan como líquidos. Las composiciones farmacéuticas que comprenden MSC vivas se formulan normalmente como líquidos, semisólidos (por ejemplo, geles) o sólidos (por ejemplo, matrices, soportes y similares, según sea apropiado para manipulación de tejidos oftálmicos).

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender componentes auxiliares como sería familiar para químicos médicos o biólogos médicos. Por ejemplo, pueden contener antioxidantes en intervalos que varían dependiendo de la clase de antioxidante usado. Los intervalos razonables para antioxidantes usados comúnmente son de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,15 % en peso por volumen de sulfito de sodio y de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 2,0 % en peso por volumen de metabisulfito de sodio. Alguien experto en la técnica puede usar una concentración de aproximadamente el 0,1 % en peso por volumen para cada uno de los anteriores. Otros compuestos representativos incluyen mercaptopropionilglicina, N-acetilcisteína, beta-mercaptoetilamina, glutatión y especies similares, aunque se pueden emplear también otros agentes antioxidantes adecuados para administración ocular, por ejemplo ácido ascórbico y sus sales o sulfito o metabisulfito de sodio.

Un agente tamponante se puede usar para mantener el pH de formulaciones de gotas oculares en el intervalo de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 8,0; tal como para minimizar irritación del ojo. Para inyección intravítrea o intraocular directa, las formulaciones deberían estar a pH 7,2 a 7,5, alternativamente a pH 7,3-7,4. Las composiciones oftalmológicas pueden incluir también agentes de tonicidad adecuados para administración al ojo. Entre aquellas adecuadas está cloruro de sodio para fabricar formulaciones aproximadamente isotónicas con solución salina al 0,9 %.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas están formuladas con agentes potenciadores de la viscosidad. Tales agentes pueden ser, por ejemplo, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa y polivinilpirrolidona. Las composiciones farmacéuticas pueden ser co-disolventes añadidos si es necesario. Los co-disolventes adecuados pueden incluir glicerina, polietilenglicol (PEG), polisorbato, propilenglicol y alcohol polivinílico. Se pueden incluir también conservantes, tales como, por ejemplo, cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, clorobutanol, acetato o nitrato fenilmercúrico, timerosal, o metil o propilparabenos.

Las formulaciones para la inyección se pueden diseñar para administración de un solo uso y no contienen conservantes. Las soluciones inyectables pueden tener isotonicidad equivalente a solución de cloruro de sodio al 0,9 % (osmolalidad de 290-300 miliosmoles). Esto puede lograrse por adición de cloruro de sodio u otros co-disolventes como se enumeran anteriormente, o excipientes tales como agentes de tamponación y antioxidantes, como se enumeran anteriormente.

Los tejidos de la cámara anterior del ojo están bañados por el humor acuoso, mientras que la retina está en exposición continua al vítreo. Estos fluidos/geles existen en un estado altamente reducido debido a que contienen compuestos antioxidantes y enzimas. Por lo tanto, puede ser ventajoso incluir un agente reductor en las composiciones oftalmológicas. Agentes reductores adecuados incluyen N-acetilcisteína, ácido ascórbico o una forma sal y sulfito o metabisulfito de sodio, con ácido ascórbico y/o N-acetilcisteína o glutatión siendo particularmente adecuados para soluciones inyectables.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden células, componentes celulares o productos celulares se pueden administrar al ojo de un paciente en uno o más de varios modos de administración conocidos en la técnica. En una realización que puede ser adecuada para usar en algunos casos, las composiciones se administran tópicamente al ojo en gotas oculares o lavados oculares. En otra realización, las composiciones pueden administrarse a diversas localizaciones dentro del ojo por medio de inyección intraocular periódica o por infusión en una solución de irrigación tal como BSS o BSS PLUS (Alcon USA, Fort Worth, TX). Alternativamente, las composiciones se pueden aplicar en otras formas de dosificación oftalmológicas conocidas por aquellos expertos en la técnica, tales como geles o liposomas preformados o formados in situ, por ejemplo como se describe en la Patente de los EE.UU. 5.718.922 cedida a Herrero-Vanrell. En otra realización, la composición puede administrarse al o a través del cristalino en un ojo en necesidad de tratamiento por medio de una lente de contacto (por ejemplo Lidofilcon B. Bausch & Lomb CW79 o DELTACON (Deltafilcon A)) o de otro objeto residente temporalmente sobre la superficie del ojo. En otras realizaciones, se pueden emplear soportes tales como un escudo córneo de colágeno (por ejemplo escudos corneales solubles BIO-COR, Summit Technology, Watertown, Mass.).

Las composiciones pueden administrarse por infusión dentro del globo ocular, bien a través de una cánula a partir de una bomba osmótica (ALZET, Alza Corp., Palo Alto, Calif.) o por implantación de cápsulas de liberación regulada (OCCUSENT) o de discos biodegradables (OCULEX, OCUSERT). Estas vías de administración tienen la ventaja de proporcionar un suministro continuo de la composición farmacéutica al ojo. Esto puede ser una ventaja para administración local a la córnea, por ejemplo.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden células vivas en un vehículo semi-sólido o sólido están

normalmente formuladas para implantación quirúrgica en el sitio de daño o sufrimiento ocular. Se apreciará que la composición líquida también se puede administrar por procedimientos quirúrgicos. En realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas semi-sólidas o sólidas pueden comprender geles semipermeables, redes, soportes celulares y similares, que pueden ser no biodegradables o biodegradables. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, puede ser deseable o apropiado secuestrar las células exógenas de sus alrededores, permitiendo aún a las células segregarse y administrar moléculas biológicas a las células de los alrededores. En estas realizaciones, las células pueden rodearse como implantes autónomos que comprenden MSC vivas o población celular que comprende MSC vivas rodeadas por una barrera no degradable que separa físicamente las células trasplantadas del tejido del huésped. Tales implantes se refieren algunas veces como "inmunoprotectores", ya que tienen capacidad para evitar que las células inmunitarias y las macromoléculas maten a las células trasplantadas en ausencia de inmunosupresión inducida farmacológicamente (para una revisión de tales dispositivos y procedimientos, véase, por ejemplo, P.A. Tresco y cols., 2000, Adv. Drug Delivery Rev. 42: 3-27).

Soportes.

En un aspecto, las MSC de la presente invención se pueden incorporar en un material de soporte antes del trasplante. Los materiales de soporte adecuados para usar para propósitos de la presente invención incluyen plantillas, conductos, barreras y reservorios tisulares útiles para reparación tisular. En particular, son adecuados los materiales sintéticos y naturales en forma de espumas, esponjas, geles, hidrogeles, textiles y estructuras no tejidas, que se han usado *in vitro* e *in vivo* para reconstruir o regenerar tejido biológico, así como para administrar agentes quimiotácticos para inducir crecimiento tisular. Véanse, por ejemplo, los materiales divulgados en la Patente de los Estados Unidos 5.770.417, la Patente de los Estados Unidos 6.022.743, la Patente de los Estados Unidos 5.567.612, la Patente de los Estados Unidos 5.759.830, la Patente de los Estados Unidos 6.626.950, la Patente de los Estados Unidos 6.534.084, la Patente de los Estados Unidos 6.306.424, la Patente de los Estados Unidos 6.365.149, la Patente de los Estados Unidos 6.599.323, la Patente de los Estados Unidos 6.656.488 y la Patente de los Estados Unidos 6.333.029. Se divulgan polímeros ejemplares para usar en la presente invención en la Solicitud Publicada de los EE.UU. 2004/0062753 A1 y la Patente de los EE.UU. 4.557.264.

Para formar un soporte incorporado con un agente farmacéutico, el agente farmacéutico puede mezclarse con la solución polimérica anterior a formar el soporte. Alternativamente, un agente farmacéutico puede estar revestido sobre un soporte farmacéutico tejido, preferentemente en presencia de un vehículo farmacéutico. El agente farmacéutico puede estar presente como un líquido, un sólido dividido finamente, o cualquier otra forma física apropiada. Alternativamente, los excipientes se pueden añadir al soporte para alterar la velocidad de liberación del agente farmacéutico. En una realización alternativa, el soporte se incorpora con al menos un compuesto farmacéutico que está en un compuesto antiinflamatorio, tal como, por ejemplo, compuestos revelados en la Patente de los Estados Unidos 6.509.369.

En una realización, el soporte se incorpora con al menos un compuesto farmacéutico que está en un compuesto antiapoptótico, tal como, por ejemplo, compuestos revelados en la Patente de los Estados Unidos 6.793.945.

En otra realización, el soporte se incorpora con al menos un compuesto farmacéutico que está en un inhibidor de fibrosis, tal como, por ejemplo, los compuestos revelados en la Patente de los Estados Unidos 6.331.298.

En una realización adicional, el soporte se incorpora con al menos un compuesto farmacéutico que es capaz de potenciar angiogénesis, tal como, por ejemplo, los compuestos revelados en la Solicitud Publicada de los Estados Unidos 2004/0220393 y en la Solicitud Publicada de los Estados Unidos 2004/0209901.

En aún otra realización, el soporte se incorpora con al menos un compuesto farmacéutico que está en un compuesto inmunosupresor, tal como, por ejemplo, compuestos revelados en la Solicitud Publicada de los Estados Unidos 2004/0171623.

En una realización adicional, el soporte se incorpora con al menos un compuesto farmacéutico que es un factor de crecimiento, tal como, miembros de la familia del TGF- β , incluyendo TGF- β 1, 2 y 3, proteínas morfogénicas de hueso (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12 y -13), factores de crecimiento fibroblástico-1 y -2, factor de crecimiento derivado de plaquetas-AA y -BB, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF-I, II), factor de diferenciación de crecimiento (GDF-5, -6, -8, -10, -15), factor de crecimiento derivado de células endoteliales (VEGF), pleiotrofina, endotelina, entre otros. Otros compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, factor inducible por hipoxia 1-alfa, péptido similar al glucagón-I (GLP-1), compuesto que mimetiza GLP-1 y compuesto que mimetiza GLP-2 y II, Exendina-4, ácido retinoico, hormona paratiroidea, tenascina-C, tropoelastina, péptidos derivados de trombina, catelicidinas, defensinas, laminina, péptidos biológicos que contienen dominios de unión a células y a heparina de proteínas de matriz extracelular adhesivas tales como fibronectina y vitronectina, inhibidores de MAPK, tales como, por ejemplo, compuestos divulgados en la Aplicación Publicada de los EE.UU. 2004/0209901 y en la Aplicación Publicada de los EE.UU. 2004/0132729.

La incorporación de las células de la presente invención en un soporte se puede lograr por el simple depósito de las células en el soporte. Las células pueden entrar en el soporte por difusión simple (J. Pediatr. Surg. 23 (1 Pt. 2): 3-9 (1988)). Se han desarrollado varias aproximaciones distintas para potenciar la eficiencia de la siembra celular. Por

ejemplo, se han usado matraces de rotador en siembra de condrocitos sobre soportes de ácido poliglicólico (Biotechnol. Prog. 14 (2): 193-202 (1998)). Otra aproximación para sembrar de células es el uso de centrifugación, que proporciona estrés mínimo a las células sembradas y potencia la eficiencia de siembra. Por ejemplo, Yang y cols. desarrollaron un procedimiento de siembra celular (J. Biomed. Mater. Res. 55 (3): 379-86 (2001)), referido como Centrifugational Cell Immobilization (CCI).

La supervivencia de las células trasplantadas en un paciente vivo puede determinarse por el uso de diversas técnicas de exploración, por ejemplo, exploración por tomografía axial computerizada (CAT o CT), formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) o exploraciones por tomografía de emisión de positrones (PET).

La determinación de supervivencia al trasplante se puede hacer también post-mortem retirando el tejido y examinándolo visualmente o a través de un microscopio. Alternativamente, las células se pueden tratar con tinciones que son específicas para células neuronales u oculares o productos de las mismas, por ejemplo, neurotransmisores. Las células trasplantadas puede identificarse también por incorporación anterior de tinciones rastreadoras tales como microesferas teñidas de rodamina o fluoresceína, fast blue, micropartículas férricas, bisbenzamida o productos génicos comunicadores introducidos, tales como beta-galactosidasa o beta-glucuronidasa.

Examinando la restauración de la función ocular que estaba dañada o enferma puede evaluarse la integración funcional de las células trasplantadas dentro del tejido ocular de un sujeto. Por ejemplo, la efectividad en el tratamiento de la degeneración macular o de otras retinopatías se puede determinar por mejora de la agudeza visual y por evaluación de anomalías y clasificación de fotografías de fondos en color estereoscópicas (Age-Related Eye Disease Study Research Group, NEI, NIH, AREDS Comunicación N.º: 8, 2001, Arch. Ophthalmol. 119: 1417-1436).

La presente invención se ilustra adicionalmente, pero no está limitada por, los siguientes ejemplos.

Ejemplo

Uso de células madre mesenquimales en el tratamiento de retinitis pigmentosa

Las ratas del Royal College of Surgeon (RCS) están genéticamente predispuestas a sufrir pérdida visual significativa causada por una disfunción primaria de células epiteliales del pigmento retinal (RPE). Usando este modelo, se puso a prueba la eficacia del trasplante subretinal de poblaciones de células madre mesenquimales preservando fotorreceptores en ratas RCS. En este modelo degenerativo, la función de los bastones se pierde dentro de 30 a 60 días después del nacimiento. La pérdida de la función de los conos usualmente sigue en 3 meses.

Preparación de MSC para trasplante.

Se expandieron cultivos de MSC adultas humanas (N.º de catálogo PT- 2501, Cambrex) *in vitro* durante un total de 6 pasos. Todas las células se sembraron inicialmente a 5.000 células/cm² en matraces de TT5 no revestidos en medio de crecimiento de células madre mesenquimales de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Cambrex). Para los pasos subsiguientes todas las células se trataron como sigue. Después de tripsinización, las células viables se contaron después de tinción con azul de tripano. Brevemente, 50 ml de suspensión celular se combinaron con 50 ml de azul de tripano al 0,04 % p/v (Sigma, San Luis MO) y el número de células viables, se estimó usando un hemocitómetro. Las células se tripsinizaron y lavaron tres veces en DMEM libre de suplemento: medio de glucosa baja (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los cultivos de células MSC humanas en el paso 6 se tripsinizaron y se lavaron dos veces en medio L-15 de Leibovitz (Invitrogen, Carlsbad, CA), retirando componentes del suero. Para el procedimiento de trasplante se anestesiaron ratas RCS distróficas con xilazina-ketamina (1 mg/kg i.p. de la siguiente mezcla: 2,5 ml de xilazina a 20 mg/ml, 5 ml de ketamina a 100 mg/ml y 0,5 ml de agua destilada) y su cabeza se sujetó por una barra de la nariz. Las células desprovistas de suero se resuspendieron (2 x 10⁴ células por inyección) en 2 ml de Leibovitz, medio L-15 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transplantaron usando una pipeta de vidrio fina (diámetro interno 75-150 mm) transescleralmente. Las células se administraron en el espacio subretinal dorsotemporal de ratas RSC distróficas-pigmentadas de 3 semanas de edad anestesiadas (total N = 10/tipo celular).

Las células se inyectaron unilateralmente dentro del ojo derecho, mientras que el ojo izquierdo se inyectó con medio de vehículo solo (control simulado; medio L-15 de Leibovitz). La viabilidad de las células no inyectadas residuales permaneció a más del 95 % según se valoró por exclusión de azul de tripano en la finalización de inyecciones de células. Después de que se llevaron cabo las inyecciones celulares los animales se inyectaron con dexametasona (2 mg/kg) durante 10 días tras el trasplante. Para la duración del estudio los animales se mantuvieron en ciclosporina oral A (210 mg/l de agua de bebida; concentración en sangre resultante: 250-300 mg/l) (Bedford Labs, Bedford, Ohio) desde 2 días antes del trasplante hasta el final del estudio. La comida y el agua estaban disponibles a voluntad. Los animales se sacrificaron a 60 o 90 días postoperativamente con el resto de animales sacrificándose a puntos temporales más tempranos asociados con trasplante celular.

Se puso a prueba también la capacidad de otros tipos celulares tratando la degeneración ocular observada en ratas RCS. Se prepararon composiciones celulares a partir de células derivadas de cordón umbilical humanas (células divulgadas en Solicitud de Patente de los EE.UU. publicada US2005/0054098), células derivadas de placenta humanas (células desveladas en la Solicitud de Patente de los EE.UU. publicada US2005/0058631) y fibroblastos. Las

composiciones celulares se administraron a grupos paralelos de animales de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente.

Análisis funcional.

5 *Registros de electroretinograma:* El electroretinograma (ERG) es un registro de potenciales eléctricos (potenciales de acción) que se generan dentro de la retina (normalmente en respuesta a un resplandor de luz). Se registra usando dos electrodos, con un electrodo situado en o cerca de la córnea del ojo mientras que el otro está situado en el cuero cabelludo. Tras adaptación a la oscuridad durante toda una noche, los animales se prepararon para registro de ERG en luz roja tenue, como se describe en Sauve y cols., 2004. En resumen, en condiciones de anestesia (con una mezcla de 150 mg/kg i.p de ketamina y 10 mg/kg i.p. de xilazina) la cabeza se sujetó con una agarradera de cabeza
10 estereotáxica y la temperatura corporal se sometió a seguimiento por un termómetro rectal y se mantuvo a 38 °C usando una manta homeotérmica. Las pupilas se dilataron usando partes iguales de fenilefrina al 2,5 % tópica y tropicamida al 1 %. Se usó anestesia tópica con bupivacaína al 0,75 % evitando cualesquiera reflejos corneales y se aplicó frecuentemente una gota de solución salina al 0,9 % sobre la córnea evitando su deshidratación y permitiendo contacto eléctrico con el electrodo de registro (asa de alambre de oro). Una aguja de calibre 25 insertada bajo el cuero
15 cabelludo, entre los dos ojos, sirvió como el electrodo de referencia. Se proporcionaron amplificación (a paso de banda de 1-1000 Hz, sin uso de filtro Notch), presentación de estímulo y adquisición de datos por el sistema UTAS-3000 a partir de LKC Technologies (Gaithersburg, MD).

Se usó un protocolo de resplandor doble determinando el aislamiento de respuestas de bastones y conos (Nixon y cols., 2001). Se presentó un resplandor de sonda 1 segundo después de un resplandor condicionante, usando una característica específica del sistema UTAS-3000 (LKC Technologies) con estimulación de Ganzdfeld calibrada; asegurando recarga completa del estimulador. El papel del resplandor condicionante en este procedimiento fue saturar
20 transitoriamente los bastones de tal forma que se vuelvan incapaces de responder al resplandor de sonda. La respuesta al resplandor de sonda se tomó como que refleja la actividad dirigida por los conos (onda-a). Se obtuvo una onda-b dirigida por los bastones sustrayendo la respuesta dirigida por los conos de la respuesta mezclada (obtenida tras presentación de un resplandor de sonda solo, es decir no precedida por resplandor condicionante alguno).
25

Para la cuantificación de las ondas-b adaptadas a la oscuridad, los registros consistieron en presentaciones de resplandor individual (duración de 10 milisegundos), repetidos de 3 a 5 veces verificando la fiabilidad de respuesta y mejorando la proporción señal frente a ruido, si se requiere. Se presentaron estímulos a seis intensidades crecientes en etapas de una unidad logarítmica que varían desde -3,6 hasta 1,4 log de candelas/m² en luminancia. Minimizando
30 el blanqueo potencial de los bastones, se incrementaron intervalos de interés estímulos según se elevó la luminancia de estímulos desde 10 segundos a la intensidad de estímulos más baja hasta 2 minutos a la intensidad de estímulos más alta. La amplitud de onda-b máxima se definió como la que se obtuvo a partir de la serie de intensidad de resplandores, independientemente de la intensidad de estímulos (Nusinowitz y cols., 1999).

Los animales que recibieron inyecciones umbilicales (n = 6) demostraron mejora en todas las medidas de resultados probados en 60 días, onda-a (27 ± 11) frente a controles simulados (0), onda-b mezclada (117 ± 67) frente a controles simulados (18 ± 13), onda-b de conos (55 ± 25) frente a controles simulados (28 ± 11) y en contribución de bastones (49 ± 16 %) frente a controles simulados (6 ± 7 %). Además, se midieron a 90 días respuestas incrementadas en 2 animales puestos a prueba con medidas que son, onda-a (15 ± 7) frente a controles simulados (0), onda-b mezclada (37 ± 15) frente a controles simulados (0), onda-b de conos (16 ± 11) frente a controles simulados (7 ± 5) y en contribución de bastones (58 ± 39 %) frente a controles simulados (0 %). (Figura 1). La respuesta observada en estos
40 animales fue mucho mayor que aquella vista en animales no tratados o tratados de forma simulada. Las inyecciones de MSC (n = 5) a 58 días mostraron capacidad de respuesta a medidas de onda-a (16,4 ± 13,1) frente a controles simulados (14,6 ± 12,5). La preservación funcional de la visión se demostró en capacidad de respuesta de onda-b mezclada (81,6 ± 15,3) frente a simulados (54,4 ± 24,5) y en capacidad de onda-b de conos aislados (134 ± 68) frente a simulados (72,4 ± 40,8) y en medidas generales de contribución de bastones (41 ± 16,8) frente a simulados (21 ± 19,34). Estos resultados demostraron demostrar preservación de función fotorreceptora a 60 días en estos animales.
45

Las inyecciones de MSC (n = 5) a 88 días en los mismos animales demostraron preservación en todas las medidas de ERG cuando se comparan con controles simulados. Capacidad de respuesta a medidas de onda-a (14,3 ± 12,1) frente a controles simulados (0). La preservación funcional de la visión se demostró en capacidad de respuesta de onda-b mezclada (64,5 ± 24) frente a simulados (0) y en capacidad de onda-b de conos aisladas (32,6 ± 22,7) frente a simulados (8 ± 4) y en medidas generales de contribución de bastones (47,5 ± 29) frente a simulados (0). Estos resultados demostraron mejora en capacidad de respuesta visual cuando se compararon con controles simulados. Así, los datos demostraron claramente que la función visual se conservó en animales RCS que recibieron inyecciones MSC frente a controles simulados, donde se perdió visión en 90 días.
50

Los trasplantes de células de placenta (n = 4) a 60 días no mostraron ningún incremento en onda-a (20 ± 20) frente a controles simulados (0), pero mostraron mejora menor en onda-b mezclada (81 ± 72) frente a controles simulados (1,5 ± 2) y mejora buena en onda-b de conos (50 ± 19) frente a controles simulados (7 ± 7) y en contribución de bastones (30 %) frente a controles fingidos (0). Estos resultados indicaron mejora en capacidad de respuesta visual cuando se compararon con controles simulados. Esto sugiere que se observó rescate fotorreceptor en estos animales en un
55

grado pequeño (**Figura 1**).

En contraste, los animales que recibieron trasplantes de fibroblastos no mostraron ningún incremento en ninguno de los parámetros probados.

5 *Valoración funcional:* La realización de pruebas de sensibilidad retinal fisiológica se llevó a cabo demostrando la respuesta retinal a la luz tenue. En estas pruebas se anestesiaron animales con uretano a 1,25 g/kg i.p. La valoración fisiológica en estos animales se probó tras el trasplante en animales a 90 días registrando actividad extracelular multiunitaria en el colículo superior a iluminación de los campos receptores visuales respectivos (Lund y cols., 2001). Este procedimiento se repitió para 20 puntos independientes (espaciados 200 mm aparte, con cada etapa correspondiendo a aproximadamente 10-150 desplazamientos en el campo visual), que cubren el campo visual. Se midieron los umbrales visuales como el incremento en intensidad por encima del precedente y se mantuvieron a 0,02 candelas/m² (unidad de luminiscencia), requeridas activando unidad en los 20 mm superficiales del colículo superior con un punto de luz de 30 en diámetro. Los parámetros de respuesta se compararon entre ojos trasplantados y ojos de controles simulados que recibieron solamente vehículo.

15 *Agudeza visual:* La agudeza de clasificación de ratas RCS se puso a prueba después de 3 y 4 meses de edad. Los animales normales demostraron agudeza de 0,5 ciclos/grado a los 3 meses de edad. Después de 3 meses los ojos inyectados con MSC mantuvieron una agudeza promedio de 0,47 ciclos/grado (n = 14) en contraste con los animales tratados de forma simulada que retuvieron una media de agudeza de 0,2 ciclos/grado. Así la agudeza visual se preservó en estos animales 90 días tras el injerto. A 4 meses de edad los animales injertados con MSC mantuvieron una agudeza promedio de 0,36 ciclos/grado (n = 7), en contraste con animales tratados de forma fingida que retuvieron agudeza a niveles basales (**Figura 2**).

25 *Umbrales visuales:* La eficacia de los trasplantes en evitar pérdida visual se sometió a seguimiento por evaluación de capacidad de respuesta en 4 animales. La respuesta de sensibilidad umbral a la luz se usó definiendo el área de rescate de campo visual en ojos inyectados de forma fingida frente a ojos trasplantados con MSC. En ratas no distróficas, los umbrales visuales nunca excedieron de 0,5 log candelas/m² por encima de los precedentes (Figura 3). En ratas distróficas no operadas, los umbrales están usualmente en la magnitud de 4 unidades logarítmicas de candelas/m² (Blakema y Drager, 1991). En contraste, en ratas distróficas inyectadas de forma simulada no operadas, los umbrales estaban en el orden de 2,9-4,9 unidades logarítmicas de candelas/m² con un umbral promedio de 4,0 unidades logarítmicas de candelas/m², en algunos ejemplos no se pudo lograr ningún registro (Figura 3). Así, las ratas inyectadas de forma fingida mostraron algún rescate funcional altamente localizado en la retina temporal. Sin embargo, las ratas trasplantadas con MSC humanas mostraron niveles sustancialmente más altos de preservación visual con umbrales que varían desde 0,8 hasta 2,1 unidades logarítmicas de candelas/m², con un umbral promedio de 1,3 unidades logarítmicas de candelas/m² (**Figura 3**). En el 60 % de promedio de respuestas umbral estuvieron por debajo de unidades de 2,1 unidades logarítmicas de candelas en animales inyectados con MSC frente al 18 % en controles inyectados de forma fingida.

35 *Histología:* En la conclusión del estudio, los animales se sacrificaron con una sobredosis de uretano (12,5 g/kg). La orientación del ojo se mantuvo situando una sutura 6.0 a través del músculo recto superior antes de la enucleación. Después de hacer una incisión corneal, los ojos se fijaron con paraformaldehído al 2,5 %, glutaraldehído al 2,5 %, ácido pícrico al 0,01 % en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,4). Después de fijación, la córnea y las lentes se retiraron cortando alrededor del cuerpo ciliar. Se hizo una pequeña mella en la periferia de la retina dorsal antes de la retirada del recto superior ayudando en mantener orientación. Las retinas se post-fijaron después en tetróxido de osmio al 1 % durante 1 hora. Después de deshidratación a través de una serie de alcoholes a epoxipropano, las retinas se incluyeron en resina de inclusión de TAAB (TAAB Laboratories, Aldermarston, Reino Unido). Se tiñeron secciones semi-finas con azul de toluidina al 1 % en tampón borato al 1 % y las secciones ultrafinas se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

45 Para tinción de Nissl, se tiñeron secciones con violeta de cresilo al 0,75 % (Sigma, San Luis, MO) después de lo que se deshidrataron a través de alcoholes graduados al 70, 95 y 100 % dos veces. Se situaron en xileno (Sigma, San Luis, MO), se aclararon con PBS (pH 7,4) (Invitrogen, Carlsbad, CA), se cubrieron con un cubreobjetos y se montaron con solución montante DPX (Sigma, San Luis, MO).

50 Histológicamente en el punto temporal en el día 90-100 en animales tratados con MSC, se demostró claramente el rescate anatómico de los fotorreceptores huésped. (**Figura 4**). Los fotorreceptores forman una capa gruesa separada por un hueco de la capa nuclear interna, compuesta de otras células retinales. La anchura de la capa exterior en el control simulado es en el mejor de los casos una capa individual discontinua en contraste con alrededor de 3-5 células de grosor en el ojo injertado. En comparación con un animal normal esto es ligeramente más de la mitad del grosor de las capas de células fotorreceptoras observadas normalmente.

55

REIVINDICACIONES

- 5 1. Células madre mesenquimales para usar en un procedimiento de tratamiento de un paciente que tiene una afección degenerativa ocular, comprendiendo el procedimiento administrar al paciente dichas células madre mesenquimales en una cantidad efectiva para tratar la afección ocular degenerativa, en el que las células madre mesenquimales se **caracterizan por** la expresión de los siguientes marcadores de superficie: CD29, CD44, CD105 y CD166 y la falta de expresión de CD14, CD34 y CD45.
- 10 2. Las células madre mesenquimales de la reivindicación 1, en donde las células madre mesenquimales, una vez trasplantadas en una localización diana en el ojo, promueven la supervivencia de las células oculares *in situ* pero las células madre no forman estructuras similares a la capa fotorreceptora y no expresan un marcador específico de fotorreceptores.
3. Las células madre mesenquimales de la reivindicación 1, en donde las células madre mesenquimales, una vez trasplantadas en una localización diana en el ojo, promueven la formación de fotorreceptores a partir de células oculares *in situ* pero las células madre no se diferencian en fotorreceptores por sí mismas.
- 15 4. Las células madre mesenquimales de la reivindicación 1, siendo la afección ocular degenerativa una afección ocular degenerativa aguda.
5. Las células madre mesenquimales de la reivindicación 4, siendo la afección ocular degenerativa aguda un traumatismo craneoencefálico, traumatismo del nervio óptico o lesión ocular.
6. Las células madre mesenquimales de la reivindicación 1, siendo la afección ocular degenerativa una afección ocular degenerativa crónica o progresiva.
- 20 7. Las células madre mesenquimales de la reivindicación 6, siendo la afección ocular degenerativa crónica o progresiva degeneración macular, retinitis pigmentosa, retinopatía diabética, glaucoma, deficiencia celular epitelial límbica.
8. Las células madre mesenquimales de la reivindicación 1, en donde las células se administran con al menos un tipo celular distinto.
- 25 9. Las células madre mesenquimales de la reivindicación 8, siendo el al menos un tipo celular distinto un astrocito, un oligodendrocito, una neurona, un progenitor neuronal, una célula madre neuronal, célula madre epitelial retinal, célula madre epitelial corneal u otra célula multipotente o pluripotente.
10. Las células madre mesenquimales de la reivindicación 8, administrándose el al menos un tipo celular distinto simultáneamente con, o antes de, o después de, las células madre mesenquimales.
- 30 11. Las células madre mesenquimales de la reivindicación 1, administrándose las células con al menos un agente distinto.
12. Las células madre mesenquimales de la reivindicación 11, administrándose el al menos un agente distinto simultáneamente con, o antes de, o después de, las células.
13. Las células madre mesenquimales de la reivindicación 1, administrándose las células a la superficie de un ojo.
- 35 14. Las células madre mesenquimales de la reivindicación 1, administrándose las células al interior de un ojo.
15. Las células madre mesenquimales de la reivindicación 14, administrándose las células a través de una cánula o a partir de un dispositivo implantado en el cuerpo del paciente dentro del ojo o en la proximidad del mismo.
16. Las células madre mesenquimales de la reivindicación 14, administrándose las células por implantación de una matriz o un soporte tridimensionales que contienen las células.

Figura 1:

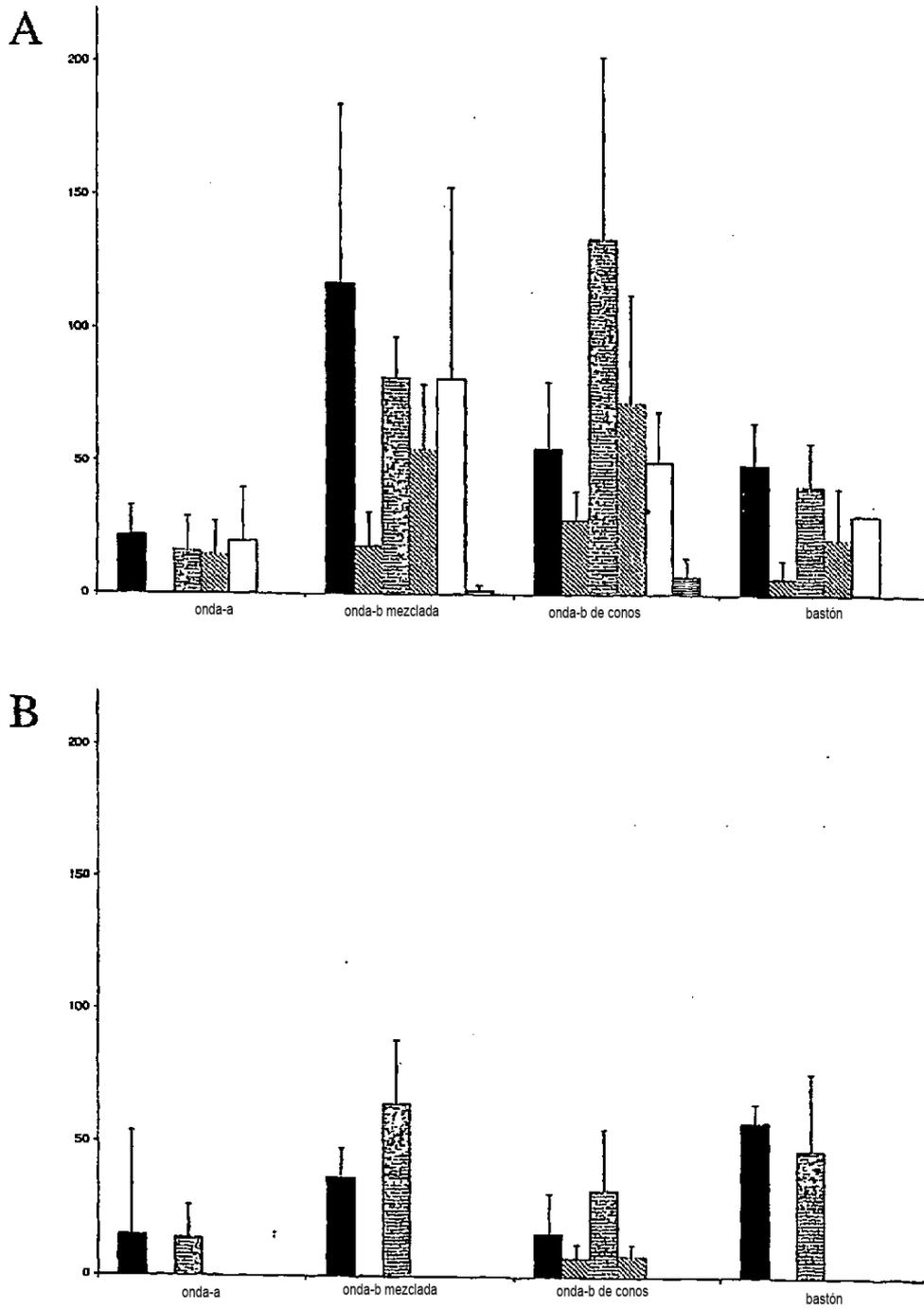


Figura 2:

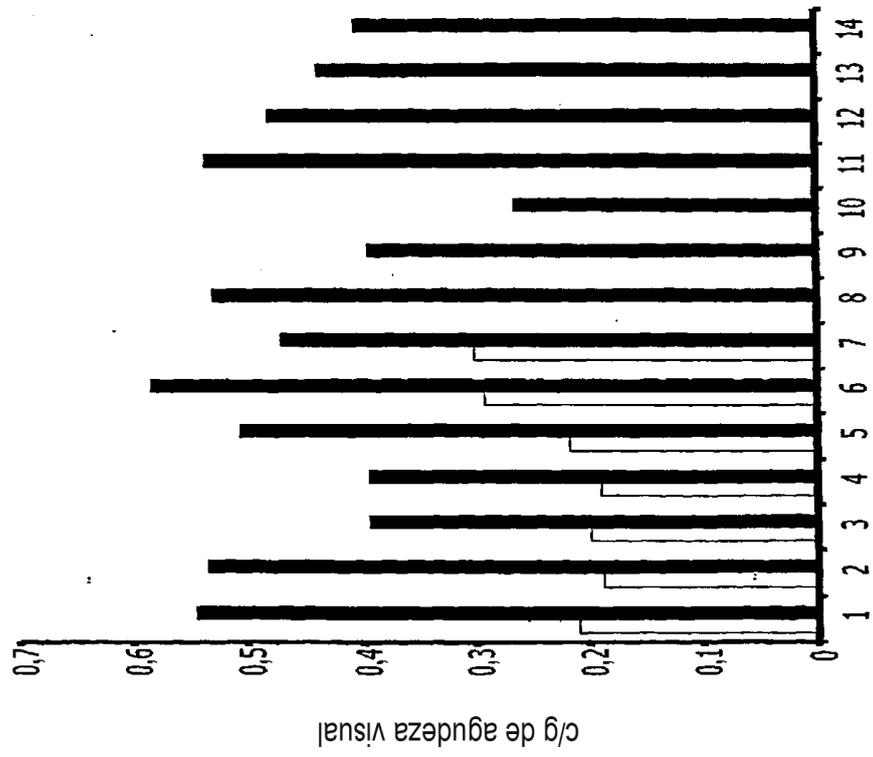


Figura 3:

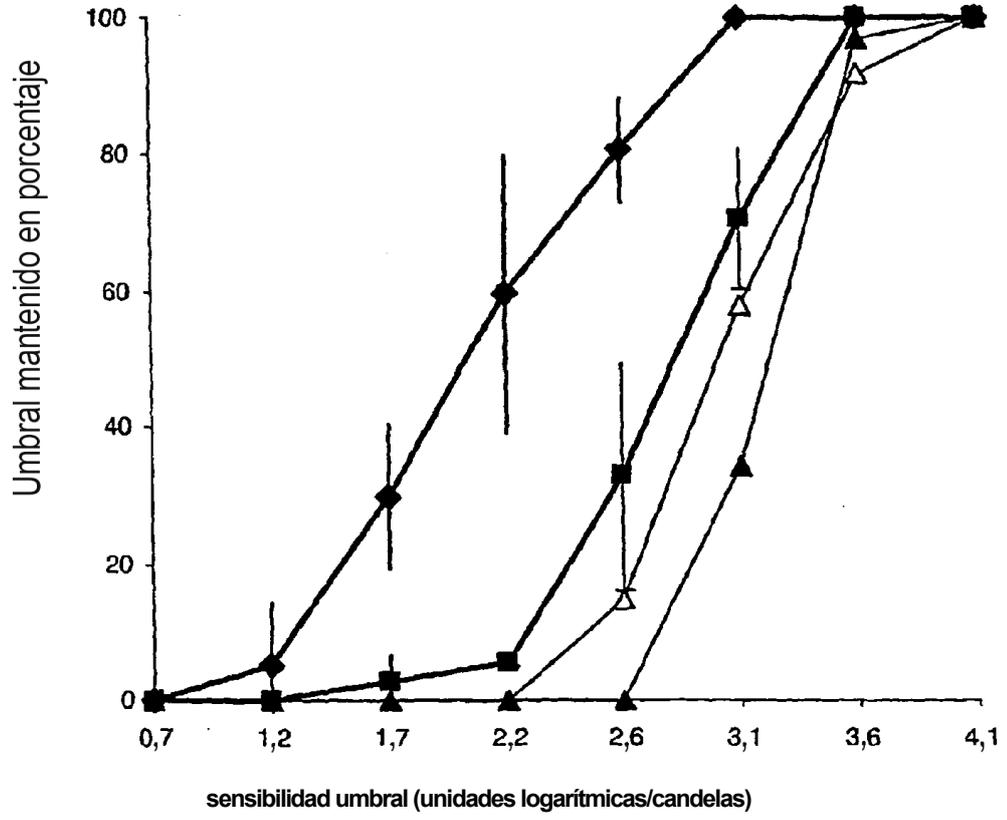


Figura 4:

