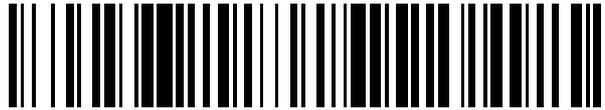


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 080**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0775** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2007 E 07820134 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 2076588**

54 Título: **Procedimiento de expansión de células madre adultas de sangre, en particular sangre periférica, y aplicación relativa en el campo médico**

30 Prioridad:

**20.09.2006 IT RM20060498**

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

**18.12.2013**

73 Titular/es:

**THANKSTEM S.R.L. (100.0%)  
Via Manzini, 21  
33100 Udine (UD), IT**

72 Inventor/es:

**GAMBACURTA, ALESSANDRA y  
POLETTINI, MARCO**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 435 080 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

Procedimiento de expansión de células madre adultas de sangre, en particular sangre periférica, y aplicación relativa en el campo médico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de expansión para células madre de la sangre, en particular pero no solamente de la sangre periférica, de mamíferos adultos, y a la aplicación relativa en el campo médico, en particular en el campo veterinario, para el tratamiento de lesiones, patologías inflamatorias crónicas y/o agudas, patologías neurológicas y neurodegenerativas.

10 En el presente documento, y a continuación en la descripción del mismo, y como se conoce en la literatura, por la palabra "expansión" se quiere significar el proceso de incremento del número de células por división celular o bien, como en el caso específico descrito y reivindicado, por "desdiferenciación", esto es, el proceso por el que las células presentes en la sangre se transforman en células madre después de un tratamiento *in vitro* adecuado, como se verá a continuación en el presente documento.

15 En los últimos años, el uso de células madre en tratamiento ha tenido una gran aprobación debido al éxito obtenido en el tratamiento de varias patologías que previamente se pensaba que eran incurables. Sin embargo, los procesos para la obtención de células madre conocidos hasta la fecha han sido laboriosos y caros.

Las células madre pluripotentes (CMP) son una fuente disponible no sólo para la investigación sino también para la creación de fármacos y para trasplantes (Wagers A. J. et al., 2002; Griffith L. G. et al., 2002).

20 Existen dos amplias categorías de células madre, embrionaria y adulta: la primera deriva de embriones, y más exactamente de blastocitos de 8 días, mientras que, por el contrario, las células madre adultas se pueden obtener principalmente de la médula ósea, tejido adiposo o muscular y de la sangre periférica.

25 La definición de célula madre está constantemente evolucionando y, en este momento, no existe un consenso general ni un procedimiento estándar para aislarlas o identificarlas. Para todas estas células, embrionarias (ES) y adultas, tanto hematopoyéticas (CMH) como mesenquimales (CMM) (Kuwana M. et al., 2003), se han identificado diferentes marcadores genéticos, de los que algunos son comunes para muchos tipos de células (Condomines M. et al., 2006; Kang W. J. et al., 2006; Zhao Y. et al., 2003; Rabinovitch M. et al., 1976).

30 En particular, Zhao Y. et al, tanto en el artículo "A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells" como en el documento WO 2004/043990, divulga un procedimiento para preparar células madre derivadas de monocitos que incluye las etapas de aislar un monocito de sangre periférica, ponerlo en contacto con un componente mitógeno y posteriormente cultivar el monocito de sangre periférica bajo condiciones adecuadas para la propagación de las células.

35 Este procedimiento, que requiere en primer lugar una etapa de aislamiento del monocito y en segundo lugar una etapa de expansión en un medio de cultivo, implica periodos de tiempo muy largos para la obtención de un número significativo de células madre, del orden de 15-20 días, y no puede obtener células madre del tipo totipotente, esto es, no especializadas, adecuadas para inocularse directamente en el paciente en un periodo de tiempo muy corto desde la primera extracción.

Numerosos trabajos científicos describen la capacidad de las células madre para regenerar diferentes tipos de lesiones, regenerando tejidos que están dañados mecánicamente o dañados por varias patologías, eliminando desde la raíz las causas que generaron la patología y no simplemente actuando sobre los efectos de las mismas.

40 En este momento, la investigación está más orientada hacia el uso de células madre aisladas de tejido embrionario, fetos o del cordón umbilical, pero esto está planteando varias cuestiones jurídicas y éticas. Ante todo, a día de hoy el uso de estas células trae varias contraindicaciones tales como: riesgos de infección, de rechazo si se trasplantan y, en caballos, la aparición de teratomas.

45 Por lo tanto, para eludir estos problemas, se ha considerado el uso en el tratamiento "in vivo" de células madre autólogas aisladas preferentemente de médula ósea, tejido adiposo o sangre periférica. Estos procedimientos, usando a partir de células madre adultas, proporcionan una etapa de diferenciación "in-vitro" (o "ex vivo") de las células madre en la línea celular deseada por medio de factores de inducción de la diferenciación específicos, y una posterior etapa de trasplante "in vivo" de la línea celular diferenciada obtenida. En estos procedimientos, el límite se debe al hecho de que se producen fenómenos de rechazo observables debido a que las células diferenciadas reintroducidas en el paciente no se reconocen como células propias, porque durante la etapa de diferenciación inducida *in-vitro* éstas pierden los factores de auto-reconocimiento.

50 En el hombre, tomar células madre de la sangre periférica implica purificarlas por medio de un proceso denominado "aféresis" o "leucoféresis". En la práctica, las células se extraen de la sangre, se recogen, y a continuación se inoculan en pacientes inmediatamente después de la quimio o radioterapia. En la aféresis, que dura de 6 a 8 horas, se toma la sangre de la vena de un brazo o de una vena en el cuello o en el pecho, y se hace pasar a través de una máquina que retira las células madre. La sangre, purificada de este modo, vuelve al paciente, mientras que se preservan las células

recogidas por medio de refrigeración en nitrógeno líquido (Condomines M. et al., 2006; Kang W.J. et al., 2006). Esta técnica no sólo es dolorosa, sino también extremadamente estresante para el paciente. Además, es impracticable para animales de tamaño pequeño o bien grande; sobre todo, la técnica no proporciona una discriminación y/o purificación real de las células madre circulantes.

5 En la actualidad, en la ciencia veterinaria se usan células madre de forma exitosa principalmente en la reconstrucción de tendones y ligamentos con lesiones. Las técnicas principales para la purificación son:

- uso de factores de crecimiento o derivados de plaquetas (TGF-B, VEGF), pero los costes económicos de su extracción son prohibitivos (Hou M. et al., 2006);
- 10 - aislamiento de células madre tomadas de la médula ósea. Esta técnica permite la purificación y después el uso para tratamiento sólo del 15 % de las células contenidas en el material extraído;
- aislamiento de células madre tomadas de tejido adiposo. Esta técnica, que requiere la retirada quirúrgica previa de cantidades considerables de tejido del animal donante, no permite una administración intravenosa;
- IGF-1 (factor de crecimiento insulinoide 1) conocido como tendotrofina (Fiedler J. et al., 2006);
- 15 - UBM (matriz de vejiga urinaria): es un derivado del cerdo que contiene citocinas (pero no células nucleadas), que induce la cicatrización de la herida pero no la regeneración de la zona con lesiones (Zhang Y.S. et al., 2005).

En vista de todo lo anterior, es obvio que se necesitan procedimientos para la expansión y purificación de células madre adultas a partir de fuentes fácilmente accesibles que además deben permitir la obtención de células madre adecuadas para su uso como medicamento en el campo médico-veterinario que, una vez se administren en el mamífero, no dé lugar a un fenómeno de rechazo y que sean fáciles de preservar.

20 También existe una necesidad obvia de obtener células madre del tipo pluripotente y totipotente, esto es, no especializada, que se puedan inocular directamente en el paciente, y con periodos de tiempo de producción mucho más cortos que los proporcionados en la actualidad.

25 Los autores de la presente invención han perfeccionado ahora un procedimiento para la expansión y purificación in vitro de células madre de sangre periférica, tal como permitir la obtención de células madre que no proporcionan efectos colaterales tales como fenómenos de rechazo, infección, teratomas, una vez se administren en el mamífero adulto, que puedan diferenciarse "in vivo" y comportarse como células madre pluripotentes.

30 Los autores han observado que las células expandidas de este modo, una vez se inyectan por vía local o por vía intravenosa, adquieren "in vivo" (y no "in-vitro", como en procedimientos conocidos en el estado de la técnica por medio de factores de crecimiento y/o estímulos químicos adecuados (Gulati R. et al., 2003; Katz R. L. et al., 2002; Okazaki T. et al., 2005)) todas las características morfológicas y químicas de las células macrófagas, linfocíticas, epiteliales, endoteliales, neuronales y hepatocitos, de acuerdo con las necesidades y patologías de los animales tratados. El procedimiento es aún menos invasivo que otros procedimientos usados hasta ahora para recoger células madre, indoloro (si se compara con la aféresis), económico y técnicamente el más adecuado para usarse en todas las especies animales (pequeñas y grandes). Finalmente, la posibilidad de obtener estas células fácilmente, y que después se puedan preservar durante un periodo de tiempo largo refrigeradas en nitrógeno líquido, hace que las células obtenidas con el procedimiento de acuerdo con la invención sean adecuadas para trasplantes autólogos, para el tratamiento de muchas patologías humanas y veterinarias (lesiones de varios tipos, enfermedades metabólicas, patologías neurológicas e inflamatorias agudas y crónicas).

40 Por lo tanto, la presente invención se refiere específicamente a un procedimiento para la expansión de células madre adultas de la sangre, en particular pero no sólo de la sangre periférica, que comprende las siguientes etapas.

Una primera etapa comprende dos subetapas:

45 a) una primera subetapa de expansión de las células madre de sangre, en particular pero no sólo sangre periférica, inmediatamente después de que se hayan tomado, por medio de un tratamiento in vitro con MCSF (factor de estimulación de colonias de macrófagos) en una concentración comprendida entre 8-15 nM, preferentemente de 10 nM; la etapa de expansión puede tener una duración variable de acuerdo con las condiciones en las que se lleva a cabo el tratamiento in vitro; los autores han verificado experimentalmente que una duración del tratamiento in vitro con MCSF comprendida entre 24 y 96 horas, ventajosamente entre 48 y 72 horas, ha dado lugar a una estabilización de la expansión, con la identificación de la presencia simultánea de los marcadores CD 90, CD 34 y CD 90/CD 34 mezclados. Esta condición se consideró como la óptima.

50 Por "inmediatamente" se quiere decir el periodo de tiempo más corto posible entre que se toman las células de la sangre y el inicio del tratamiento in vitro, en cualquier caso no más de 10 minutos, ventajosamente no más de 5 minutos.

b) después de la primera subetapa, una segunda subetapa de purificación, preferentemente por medio del

fraccionamiento en un gradiente de Ficoll.

La etapa de purificación está destinada fundamentalmente a destruir los glóbulos rojos y a cultivar los macrófagos y monocitos sobre una placa.

5 Por lo tanto, al contrario que en el estado de la técnica, la presente invención proporciona en primer lugar una etapa de expansión de las células, poniéndolas en contacto con MCSF y un posible producto anticoagulante, por ejemplo en un tubo de ensayo adecuado; esta etapa de expansión se realiza inmediatamente después de que se hayan tomado las células de del paciente, sin aislar partes específicas de las mismas y sin usar ningún medio de cultivo.

Después de la etapa de purificación, se proporciona otra etapa de:

10 c) expansión adicional de las células madre de sangre, en particular pero no sólo de sangre periférica, purificadas en la etapa b) por medio de tratamiento in vitro con MCSF en una concentración comprendida entre 35-55 nM, preferentemente de 50 nM, más preferentemente de 45 nM.

Esta etapa también puede tener una duración variable de entre 24 y 96 horas, preferentemente de entre 48 y 72 horas.

15 Se ha observado que usando MCSF en una concentración mayor de 55 nM (es decir, 70 nM) ya después 24 horas las células no mantienen el fenotipo de células madre pluripotentes (véase la fig. 12). En particular, la etapa a) de expansión previa en suspensión con MCSF inmediatamente después de que se haya tomado la sangre permite incrementar el porcentaje de células madre con respecto a la población de monocitos y macrófagos (véase la fig. 13). La posterior etapa permite obtener células madre pluripotentes que se diferencian directamente in vivo, sin provocar fenómenos de rechazo o infección.

20 La invención también se refiere al uso de las células madre adultas obtenidas de acuerdo con el procedimiento de expansión descrito anteriormente para la preparación de un medicamento para tratar lesiones. Las lesiones tratables son las del grupo al que pertenecen las siguientes: lesiones cutáneas, lesiones en los tendones, lesiones en ligamentos, lesiones óseas, lesiones en las membranas mucosas en mamíferos o fracturas.

25 La presente invención también se refiere al uso de células madre adultas obtenidas de acuerdo con el procedimiento descrito para la preparación de un medicamento para tratar patologías neurológicas o neurodegenerativas elegidas del grupo que incluye: enfermedad de Cushing, sacudida de cabeza, síndrome de Wobbler, dificultades respiratorias, paresia de las extremidades; patologías inflamatorias agudas o crónicas elegidas de laminitis, periostitis, gastritis, artrosis, inflamaciones provocadas por agentes víricos, bacterianos, parásitos, micóticos; dilatación-torsión del estómago en mamíferos.

30 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende las células madre adultas obtenidas de acuerdo con el procedimiento de expansión descrito anteriormente como principio activo, junto con coadyuvantes y/o excipientes farmacológicamente aceptables.

35 De acuerdo con una forma de realización particularmente preferente, las células madre adultas obtenidas de acuerdo con el procedimiento definido anteriormente, usadas como principio activo, están presentes en una concentración comprendida entre  $90\text{-}250 \times 10^3$  células/ml en la composición, preferentemente  $150 \times 10^3$  células/ml, junto con los coadyuvantes y/o excipientes farmacológicamente aceptables, estando formulada dicha composición para inyección intravenosa.

40 De acuerdo con una forma de realización alternativa, las células madre adultas obtenidas de acuerdo con el procedimiento de expansión definido anteriormente, usadas como principio activo, están presentes en una concentración comprendida entre  $4\text{-}40 \times 10^6$  células/ml en la composición, junto con los coadyuvantes y/o excipientes farmacológicamente aceptables, estando formulada dicha composición para una aplicación local (también tópica en el caso de heridas externas).

45 Las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente también pueden comprender un antibiótico como principio activo en una concentración comprendida entre 5-15 nM, preferentemente de 10 nM, de acuerdo con una forma de realización particularmente preferente de la invención. Preferentemente, dicho antibiótico es gentamicina o amicacina.

La invención también se refiere al uso de una composición farmacéutica como se define anteriormente (es decir, adecuada para una aplicación local, con o sin antibiótico) como medicamento para tratar lesiones elegidas del grupo que consiste en lesiones cutáneas, lesiones en los tendones, lesiones en ligamentos, lesiones óseas, lesiones en las membranas mucosas en mamíferos.

50 De acuerdo con otra característica, la invención se refiere al uso de la composición farmacéutica como se define anteriormente (es decir, adecuada para una aplicación local, con o sin antibiótico) como medicamento para tratar fracturas en mamíferos.

La presente invención también se refiere al uso de una composición farmacéutica como se define anteriormente (es

decir, adecuada para una administración intravenosa), como medicamento para tratar patologías neurológicas o neurodegenerativas elegidas del grupo que incluye: enfermedad de Cushing, sacudida de cabeza, síndrome de Wobbler, dificultades respiratorias, paresia de las extremidades en mamíferos.

5 De acuerdo con otra forma de realización, la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica como se define anteriormente (es decir, adecuada para una administración intravenosa), como medicamento para tratar patologías inflamatorias agudas o crónicas elegidas de laminitis, periostitis, gastritis, artrosis, inflamaciones provocadas por agentes víricos, bacterianos, parásitos, micóticos en mamíferos.

10 La invención también se refiere al uso de una composición farmacéutica como se define anteriormente (es decir, adecuada para una administración intravenosa), como medicamento para tratar el síndrome de dilatación-torsión del estómago en mamíferos.

En una forma de realización preferente de la presente invención, los usos en el campo médico tienen una aplicación preferente en el campo veterinario y los mamíferos tratados se eligen de caballos, perros, gatos u hombres.

La presente invención se describirá ahora como un ejemplo no restrictivo, en sus formas de realización preferentes, con referencia particular a los dibujos adjuntos en los que:

15 La fig. 1 muestra una lesión de 20 cm entre el metatarso y la primera falange con clostridia y destrucción del tendón extensor en una yegua;

La fig. 2 muestra la misma yegua de la fig. 1 tres meses después de la aplicación local de las células madre de acuerdo con la invención;

La fig. 3 muestra la yegua después de seis meses de tratamiento;

20 La fig. 4 muestra la ecografía de un caballo con una lesión de un 80 % de la superficie del tendón flexor;

La fig. 5 muestra la ecografía del caballo aproximadamente tres meses y medio después del tratamiento local con células madre de acuerdo con la invención;

La fig. 6 muestra la ecografía del caballo aproximadamente tres meses y medio después del tratamiento local con células madre;

25 La fig. 7 muestra la ecografía del caballo después de aproximadamente cuatro meses del tratamiento local; cabe destacar la regeneración casi completa del tendón y la ausencia de tejido cicatrizado;

La fig. 8 muestra la ecografía de una yegua con una lesión de tendón de entidad menor (menos de 1 cm de diámetro);

La fig. 9 muestra la ecografía de la misma yegua de la fig. 7 después de un mes del tratamiento local;

30 La fig. 10 muestra un caballo de 17 años de edad con debilidad general, operado de cólico, antes del tratamiento con las células madre de acuerdo con la invención;

La fig. 11 muestra el rendimiento del caballo de 17 años de edad un año después del tratamiento intravenoso con las células madre de acuerdo con la invención;

35 La fig. 12 muestra el número de células cultivadas aisladas de sangre periférica tratadas con diferentes cantidades de MCSF en la etapa c) del presente: 15 nM (línea discontinua con cruces), 25 nM (línea discontinua con triángulos, vértice hacia abajo), 35 nM (línea discontinua con triángulos, vértice hacia arriba), 50 nM (línea discontinua con círculos negros), 60 nM (línea discontinua con cuadrados blancos), 70 nM (línea discontinua con círculos blancos); los resultados son el promedio del recuento de células de las tres muestras de sangre periférica;

40 La fig. 13 muestra el número de células cultivadas aisladas de sangre periférica pretratadas con MCSF (línea discontinua con puntos negros), no tratadas con MCSF (línea discontinua con cruces); los resultados son el promedio del recuento de células de las tres muestras de sangre periférica.

### **Ejemplo 1: Expansión y purificación de células madre adultas de sangre periférica y sus usos médicos**

Las células aisladas de sangre periférica actúan "in vivo" como células madre pluripotentes (CMP) después de la expansión de acuerdo con la invención y pueden resolver, en el espacio de unos pocos meses, lesiones o patologías incurables o curables sólo lentamente con metodologías y/o fármacos clásicos.

45 **Materiales y procedimientos**

#### **Muestreo**

Cada muestra de sangre periférica consistía aproximadamente en 5-7 ml, se tomó de caballos y perros de las extremidades inferiores y se pusieron inmediatamente en tubos de ensayo que contenían, por ejemplo, heparina (150

U), y MCSF (10 nM).

Sin embargo, se puede reemplazar la heparina por otra sustancia anticoagulante adecuada.

#### Purificación

5 Se diluyeron las muestras de sangre (5-7 ml) 1:5 en PBS (solución salina tamponada con fosfato) que contenía NH<sub>4</sub>Cl (200 mM), para provocar la lisis de los glóbulos rojos, se centrifugó a 10.000 g, se lavó dos veces con PBS y se centrifugó de nuevo a 200 g. Se incubaron las células nucleadas obtenidas durante 7-12 horas a 37 °C, preferentemente durante 10-12 horas, y se purificó por medio de fraccionamiento en un gradiente e Ficoll, a continuación se aisló y se lavó tres veces con medio RP-MI 1640 (Life Technologies, Grand Island, New York). Una vez purificadas, se incubaron las células que contenían aproximadamente un monocitos al 95 % (determinado por medio de análisis citofluorométrico por medio de un fotómetro de flujo FACScan, Becton Dickinson), durante otras 24 horas en 50 ng/ml de MCSF 45 nM y a continuación se expandieron para obtener el número de células necesarias para los tratamientos locales o se centrifugó a 10.000 g y se resuspendió en PBS a una concentración de aproximadamente 90x10<sup>3</sup> células/ml para tratamientos intravenosos.

#### Cultivos celulares

15 Se incubaron las células durante 8-12 horas, preferentemente durante 10-12 horas, a 37 °C (CO<sub>2</sub> al 8 %) en placas de 15 cm a una concentración de aproximadamente 2-3 x 10<sup>5</sup> células por placa; posteriormente se lavó en medio de cultivo para retirar las células no adherentes y a continuación se incubó otras 48 horas con 10 ml de medio RPMI complementado con FBS al 10 %, penicilina (100 unidades/ml), estreptomina (100 mg/ml), L-glutamina (2 mM) y MCSF (factor de estimulación de colonias de macrófagos - 50 ng/ml). Algunas de estas células aisladas con las células madre muestran una morfología alargada, cuando se incuban con MCSF, lo que puede recordar a los fibroblastos (Zhao Y. et al., 2003). Todos los productos usados, a menos que se indique de otro modo, se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Se obtuvo la suspensión celular pipeteando después de la incubación durante 5-8 minutos con lidocaína al 2 % (Sigma) en PBS como ya se describió (Rabinovitch M. et al., 1976). Una vez separadas, se lavaron las células dos veces con PBS y se centrifugó durante 5 min a 2000 g, se añadió gentamicina (10 nM) y se diluyó hasta una concentración final de 5-7x10<sup>6</sup>, preferentemente de 6x10<sup>6</sup> células/ml (excepto cuando se indica una concentración mayor).

En experimentos preliminares, se sometió a prueba una cuota de células para determinar el marcador CD34, uno de los marcadores principales de células madre hematopoyéticas por medio de las técnicas ya descritas por Randall et al., 1998.

#### Inmunotinción

30 Para el citofenotipado, se lavaron las células en PBS y a continuación se fijaron sobre portaobjetos en formaldehído, 4 % en PBS durante 20 min a 20 °C.

35 Para identificar las proteínas intracelulares, se permeabilizaron las células con Triton X-100 al 0,5 % durante 5 min a 20 °C y a continuación se incubó durante 1 hora con los anticuerpos primarios diluidos en PBS que contenía BSA al 1 % (para bloquear los sitios antigénicos inespecíficos). Después de tres lavados sucesivos, los portaobjetos se incubaron a continuación durante 45 min con el anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo más apropiado: FITC o isotiocianato de tetrametilrodamina B (TRITC), o Cy5.

40 Todos los anticuerpos secundarios se desarrollaron usando el burro como huésped, por Jackson ImmunoResearch. Se llevaron a cabo las inmunocitoquímicas a la temperatura de 4 °C y en una atmósfera saturada de humedad. Después de tres lavados, se montaron los portaobjetos usando "gelvatol-PBS". A continuación, se adquirieron las imágenes de fluorescencia por medio de un microscopio de fluorescencia usando como estándar interno una inmunofluorescencia dirigida contra la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (anticuerpo policlonal de oveja producido por Cortex Biochem, San Leandro, CA). Como controles negativos y para calibrar los niveles de fondo de fluorescencia, se usaron portaobjetos incubados con anticuerpos inespecíficos, del mismo isotipo que las muestras implicadas.

45 Las imágenes que se obtienen muestran las células vistas por medio de un microscopio de contraste de fases, superpuestas sobre la imagen de fluorescencia de los lípidos coloreados con Rojo Nilo y sobre la imagen de los núcleos coloreados con DAPI (4',6-diamidín-2-fenilindol). La barra de referencia mide 40 μm. Se examinó la intensidad de fluorescencia relativa por medio de microscopía de imágenes de proporción cuantitativa entre células tratadas con MCSF y macrófagos.

50 Se usó el procedimiento descrito anteriormente para identificar todos los marcadores investigados (CD 90, CD 34, CD 90/CD 34).

#### Resultados

##### Uso local

Se aplicaron las células directamente en los casos de heridas externas. Por el contrario, en el caso de lesiones en

tendones, ligamentos y fracturas, se inocularon las células directamente en el sitio de la lesión a una concentración final, excepto cuando se indicó de otro modo, de  $5-10 \times 10^6$  células/ml de acuerdo con la gravedad de la lesión; en casos en los que no se pudieron insertar las células de forma precisa en las lesiones, se usó el siguiente procedimiento:

- para lesiones en ligamentos colaterales, se realizó la inyección entre la segunda y tercera falange,
- 5 • para lesiones en los naviculares, se realizó la inyección en el túnel carpiano,
- para lesiones en las articulaciones sacroilíacas y en casos de enfermedad de Wobbler, se realizó la inyección entre la quinta y la sexta vértebra cervical o entre la sexta y la séptima.

#### Lesiones cutáneas

10 Caso de una yegua con una herida entre el metatarso y la primera falange, 20 cm de diámetro con complicaciones por Clostridium que habían dado lugar a la destrucción de los tejidos subyacentes, incluyendo el tendón extensor (fig. 1). Se realizó la primera aplicación un año después del accidente y después de dos intervenciones quirúrgicas para retirar los queloides, y se repitió tres veces más en una distancia de 15 días, usando de  $10$  a  $400 \times 10^6$  células resuspendidas en una solución fisiológica en presencia de gentamicina. Después de 100 días, la herida estaba completamente curada (fig. 2) y después de 6 meses el pelo había reaparecido en un 70 % de la zona de la cicatriz (fig. 3).

#### 15 Tendones

Se trataron tres caballos con lesiones de un 80 % del tendón flexor superficial que, ya después de tres meses del tratamiento con aproximadamente  $300 \times 10^6$  células, no volvieron a mostrar zonas hipocogénicas en una exploración por ultrasonidos y, por el contrario, se mostró que el grosor del tendón (que se había incrementado después de la laceración y los procesos inflamatorios) se redujo visiblemente en un 80 %, como se pueda ver a partir de las ecografías mostradas en las fig. 4-7.

20

Otros caballos con lesiones menores en el tendón (1 cm de diámetro) 1 mes después del tratamiento no volvieron a mostrar la lesión (fig. 8 y 9).

#### Ligamentos

25 Entre las lesiones tratadas se hizo una inserción del ligamento suspensorio bajo el corvejón con la consecuente cojera: menos de tres meses después de una inoculación local, el caballo empezó a trabajar de nuevo, sin cojera, y después de un año no se produjo recidiva.

Otros caballos tratados, que tenían lesiones entre las ramificaciones y el cuerpo central del ligamento suspensorio, anterior y posterior, se resolvieron con *restitutio ad integrum*.

#### Fracturas

30 Entre las fracturas tratadas, se presentó el caso de un perro con un fémur fracturado que, tras una intervención quirúrgica, después de 4 meses aún no se había formado callo óseo. Después de una aplicación local de  $1 \times 10^6$  células, se produjo una recuperación completa en 30 días.

#### Membranas mucosas

35 Con relación a la curación de lesiones en las membranas mucosas, se trataron varias úlceras crónicas. El caso más sensacional fue el de un caballo de doma con varias úlceras en la boca que ya tenía dos operaciones de cirugía plástica. Después del tratamiento, el caballo ya dejó de sangrar tres días después de la aplicación local de  $4 \times 10^5$  células. Después de 15 días, las lesiones estaban completamente curadas.

40 En conclusión, la aplicación local de células aisladas enriquecidas con este procedimiento en tendones, ligamentos, articulaciones y fracturas ha demostrado más de un 80 % de los casos perfectamente resueltos en unas pocas semanas o, como mucho, en cuatro meses. De todos modos, el 20 % restante de casos mostró mejoras considerables. Los procedimientos usados comúnmente en la actualidad en la ciencia veterinaria en estos casos dan resultados positivos en no más de un 60 % de los casos, después de un tratamiento de aproximadamente 6-15 meses y mejoras sólo en un 5 % de casos.

#### Uso intravenoso

45 Se usaron células por vía intravenosa (1 dosis =  $150 \times 10^3$  células) en las siguientes patologías:

Enfermedad de Gushing: esta es una patología debida a la hipertrofia de la hipófisis intermedia con una reducción en la producción de dopamina por el hipotálamo, muy similar a la enfermedad de Parkinson en humanos.

Se trató un poni afectado, que también tenía, aparte de los síntomas clásicos de la enfermedad, las defensas inmunitarias reducidas con hemólisis. Después de tres tratamientos en una distancia de 5 días con  $150 \times 10^3$  células por

tratamiento, se notaron mejoras. Después de 4 ciclos repetidos en una distancia de 40 días, los síntomas desaparecieron completamente. Otros cuatro caballos tratados de la misma manera dieron los mismos resultados.

5 Sacudida de cabeza: patología neurológica del sistema nervioso central con complicaciones secundarias del nervio trigémino lo que da lugar a una sacudida de cabeza continua y a problemas de fotofobia. El caballo tratado había tenido estos síntomas durante seis meses. El tratamiento implicó un ciclo de  $150 \times 10^3$  células en una distancia de una semana durante 5 semanas. Ya en la tercera semana los síntomas habían desaparecido. Otros dos caballos tratados con el mismo protocolo mostraron los mismos resultados.

10 Tres casos de Wobbler: ésta es una compresión neurológica cervical congénita. Los casos tratados administrando tres dosis (por vía intravenosa y local) en una distancia de una semana, mostraron una remisión completa de los síntomas después del tratamiento.

El uso intravenoso de células madre expandidas y purificadas usando el procedimiento descrito mostró cómo estas células pueden resolver "in vivo" patologías que afectan al tejido neuronal dando ya los primeros resultados después de una semana de tratamiento.

15 Reconstrucción vascular. En un caballo afectado por laminitis (destrucción de la vascularización periférica en la pata, con el resultado de una cojera extremadamente dolorosa tal como para evitar el movimiento) el dolor casi había desaparecido 12-24 horas después de que se administrara una dosis, inoculada en los vasos sanguíneos. Se obtuvo el mismo resultado para otros dos casos de caballos afectados por la misma patología.

Otros casos generales en los que se administraron las células por vía intravenosa fueron:

- 20 - Caso de un caballo con una fractura del navicular que reinició su actividad competitiva después de la administración simultánea de las células madre en los vasos periféricos, la bursa navicular y la superficie articular entre el tendón flexor profundo y el hueso navicular;
- Caso de un caballo que padece periostitis que, con la administración de dos dosis por vía intravenosa, mejoró su cojera;
- 25 - Caso de un caballo de diecisiete años de edad operado de cólico y posteriormente retirado porque no podía continuar su actividad competitiva debido a un estado persistente de debilidad general. Después de 4 ciclos de 3 dosis cada 5 días, el caballo inició su actividad competitiva de nuevo, participando en competiciones y obteniendo resultados que nunca antes tuviera (fig. 10 y 11).
- Caso de un caballo de veinte años de edad con sospecha de isquemia cerebral con la consecuente pérdida de coordinación en tres extremidades que, después del tratamiento farmacológico a base de derivados de cortisona, aún continuaba manteniendo un paso incierto y de tambaleo. Después de la administración de dos dosis en una distancia de una semana, el animal reinició su actividad normal sin volver a mostrar ningún síntoma;
- 30 - Caso de una yegua de veinte años de edad, con una preñez a los 21 años de edad, que, después de que finalizara el periodo de lactancia, se trató con dos dosis de células por vía intravenosa. Después del tratamiento, la yegua reinició su actividad competitiva plenamente (a los 20 años, se considera que un caballo es demasiado mayor para una actividad competitiva);
- 35 - Caso de un caballo con una pelvis fracturada que, después de dos dosis de células, reinició su actividad competitiva internacional;
- Caso de un caballo de quince años de edad con dificultades respiratorias y un carácter muy nervioso que, después del tratamiento con dos dosis, volvió a competir de nuevo a nivel internacional y sin la más mínima dificultad respiratoria;
- 40 - Caso de dos caballos con cojera extrema, durante más de dos años como consecuencia de la fuerza sobre el ligamento colateral entre la primera y la segunda falange. Esta patología se considera irreversible en un 75 % de los casos. Después del tratamiento con tres dosis durante tres meses ambos animales tratados volvieron a competir de forma normal;
- 45 - Caso de un caballo de trece años de edad operado de cólico a los 7 años y castrado a los 12 años. Después de la segunda operación, el animal había tenido complicaciones bacterianas no emitentes a pesar del tratamiento con antibióticos y antiinflamatorios. Además, el animal padecía de gastritis crónica, comprobada por una gastroscopía. Después de la administración de 4 dosis en una distancia de una semana, se le practicó de nuevo una gastroscopía al caballo que mostró la regeneración completa de la membrana mucosa gástrica. Se obtuvo el mismo resultado en otros 10 caballos de galope;
- 50 - Caso de un caballo con soplo pansistólico y numerosos soplos atípicos en la auscultación cardíaca, con prueba de sangre positiva para una forma activa del virus del Herpes 1 lo que provocaba problemas neurológicos y pérdida de equilibrio; en este caso, se administraron tres dosis por vía intravenosa tres veces en una distancia de 5 días,

seguido de una cuarta dosis administrada al nivel de la columna vertebral. Después de dos meses, el caballo ya comenzó a moverse de nuevo, recuperando el equilibrio casi por completo;

- 5
- Caso de un caballo de diecinueve años de edad retirado casi por completo de su actividad competitiva debido a un deterioro físico general que, después de la administración de  $200 \times 10^3$  células, dos veces en una distancia de una semana y con tratamiento repetido, después de tres meses volvió a ser uno de los mejores en su categoría (en competiciones de salto, con alturas en los saltos de 1,35-1,40 m).

Se aplicó el mismo tipo de tratamiento a perros muy mayores y dieron los mismos resultados. En perros, se trataron las siguientes patologías:

- 10
- dos casos de perros con torsión del estómago: el primero era un gran danés de seis años de edad sometido a una intervención quirúrgica pero con recidiva después de una semana y, por tanto, sometido de nuevo a otra operación; después de una primera administración de  $150 \times 10^3$  células, el perro volvió a comer de nuevo y después de dos dosis en una distancia de una semana, el perro volvió a su actividad normal; el segundo caso era una hembra de gran danés de diez años de edad, que padecía de artrosis, diagnosticada con diabetes, habiéndole practicado una histerectomía-ovariectomía; cuatro meses después de la operación, tuvo una torsión del estómago con una posterior intervención quirúrgica que, sin embargo, no aportó una gran mejora. En ese momento, se administraron dos dosis, en una distancia de una semana y otros cuatro ciclos en los siguientes cuatro meses. Actualmente, ocho meses después del último ciclo, el perro no sólo tiene una glucemia normal sino que además su capacidad de caminar se ha mejorado en un 80 %;
- 15
- Caso de un perro mestizo, 13 años de edad, macho, con paresia de las extremidades posteriores e incontinencia; hasta ese momento sólo se había tratado con cortisona, sin resultados apreciables. Quince días después de que se suspendiera la cortisona, se tomaron las células y se sometió al perro a un ciclo de dos dosis en una distancia de una semana. Seis días después del último tratamiento, el perro no sólo había recobrado el uso de sus patas, sino que estaba orinando y defecando de forma normal.
- 20

25

Los resultados obtenidos con el procedimiento de acuerdo con la invención hacen que este procedimiento sea extremadamente versátil, gracias al hecho de que, en este momento, ninguna técnica "in vivo" proporciona la expansión de células pluripotentes. Además, la ausencia de cualquier forma de rechazo o infección después de la administración en todos los historiales de casos informados anteriormente hace que esta técnica sea adecuada para procedimientos de autotrasplante.

30

## REIVINDICACIONES

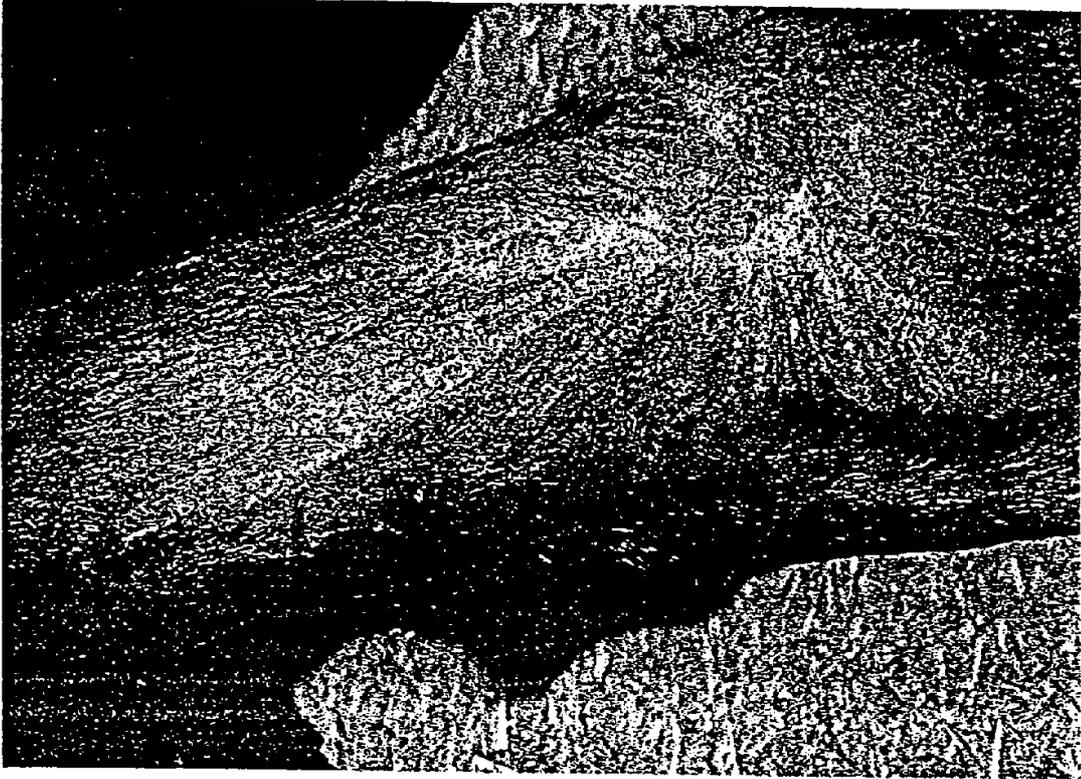
1. Procedimiento de expansión de células madre adultas de sangre, en particular pero no solamente de la sangre periférica, que comprende las siguientes etapas:
  - a) una primera etapa de expansión de las células madre de sangre, inmediatamente después de que se hayan tomado del paciente, por medio del tratamiento in vitro con MCSF en una concentración comprendida entre 8-15 nM y
  - b) una segunda etapa de purificación de las células madre expandidas, c) expansión de las células madre de sangre purificadas en la etapa b) por medio del tratamiento in vitro con MCSF en una concentración comprendida entre aproximadamente 35-55 nM durante 24-72 horas.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha etapa a) in vitro con MCSF tiene una duración comprendida entre 24 y 96 horas.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha etapa a) in vitro con MCSF tiene una duración comprendida entre 48 y 72 horas.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el tratamiento in vitro de la etapa a) se inicia no más de 10 minutos después de que se haya tomado la muestra, ventajosamente no más de 5 minutos.
5. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que dicha concentración de MCSF en la etapa a) es preferentemente de 10 nM.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha concentración de MCSF en la etapa c) es preferentemente de 50 nM, más preferentemente de 45 nM.
7. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que el tratamiento in vitro con MCSF en la etapa a) y/o etapa c) dura 24-48 horas, preferentemente 45-48 horas.
8. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que la etapa de purificación b) se produce por medio del fraccionamiento en un gradiente de Ficoll.
9. Composición farmacéutica que comprende las células madre adultas obtenidas de acuerdo con el procedimiento, como se define en cualquier reivindicación de 1 a 8, a una concentración comprendida entre  $90\text{-}250 \times 10^3$  células/ml, preferentemente  $100\text{-}120 \times 10^3$  células/ml, como principio activo, junto con coadyuvantes y/o excipientes farmacológicamente aceptables, formulándose dicha composición para inyección intravenosa, para su uso en el tratamiento de lesiones elegidas del grupo que consiste en lesiones cutáneas, lesiones en los tendones, en los ligamentos, en los huesos, en las membranas mucosas en mamíferos, o fracturas, de patologías neurológicas o neurodegenerativas elegidas del grupo que consiste en enfermedad de Cushing, sacudida de cabeza, síndrome de Wobbler, dificultades respiratorias, paresia de las extremidades en mamíferos, de patologías inflamatorias agudas o crónicas elegidas de laminitis, periostitis, gastritis, artrosis, inflamaciones provocadas por agentes víricos, bacterianos, parásitos, micóticos en mamíferos, del síndrome de dilatación-torsión del estómago en mamíferos.
10. Composición farmacéutica que comprende las células madre adultas obtenidas de acuerdo con el procedimiento, como se define en cualquier reivindicación de 1 a 8, a una concentración comprendida entre  $4\text{-}40 \times 10^5$  células/ml, preferentemente  $7 \times 10^6$  células/ml, como principio activo, junto con coadyuvantes y/o excipientes farmacológicamente aceptables, formulándose dicha composición para aplicación local, para su uso en el tratamiento de lesiones elegidas del grupo que consiste en lesiones cutáneas, lesiones en los tendones, en los ligamentos, en los huesos, en las membranas mucosas en mamíferos, o fracturas, de patologías neurológicas o neurodegenerativas elegidas del grupo que consiste en enfermedad de Cushing, sacudida de cabeza, síndrome de Wobbler, dificultades respiratorias, paresia de las extremidades en mamíferos, de patologías inflamatorias agudas o crónicas elegidas de laminitis, periostitis, gastritis, artrosis, inflamaciones provocadas por agentes víricos, bacterianos, parásitos, micóticos en mamíferos, del síndrome de dilatación-torsión del estómago en mamíferos.
11. Composición para su uso según la reivindicación 10, que comprende además un antibiótico como principio activo en una concentración comprendida entre 5-15 nM, preferentemente 10 nM.
12. Composición para su uso según la reivindicación 11, en la que el antibiótico es gentamicina.
13. Composición para su uso según la reivindicación 9, en la que dicha composición comprende células madre adultas obtenidas en una concentración igual a  $150 \times 10^3$  células/ml y se administra una vez por semana por vía intravenosa.
14. Composición para su uso según cualquier reivindicación de 9 a 13, en la que dichos mamíferos se eligen de entre hombres, caballos, gatos o perros.



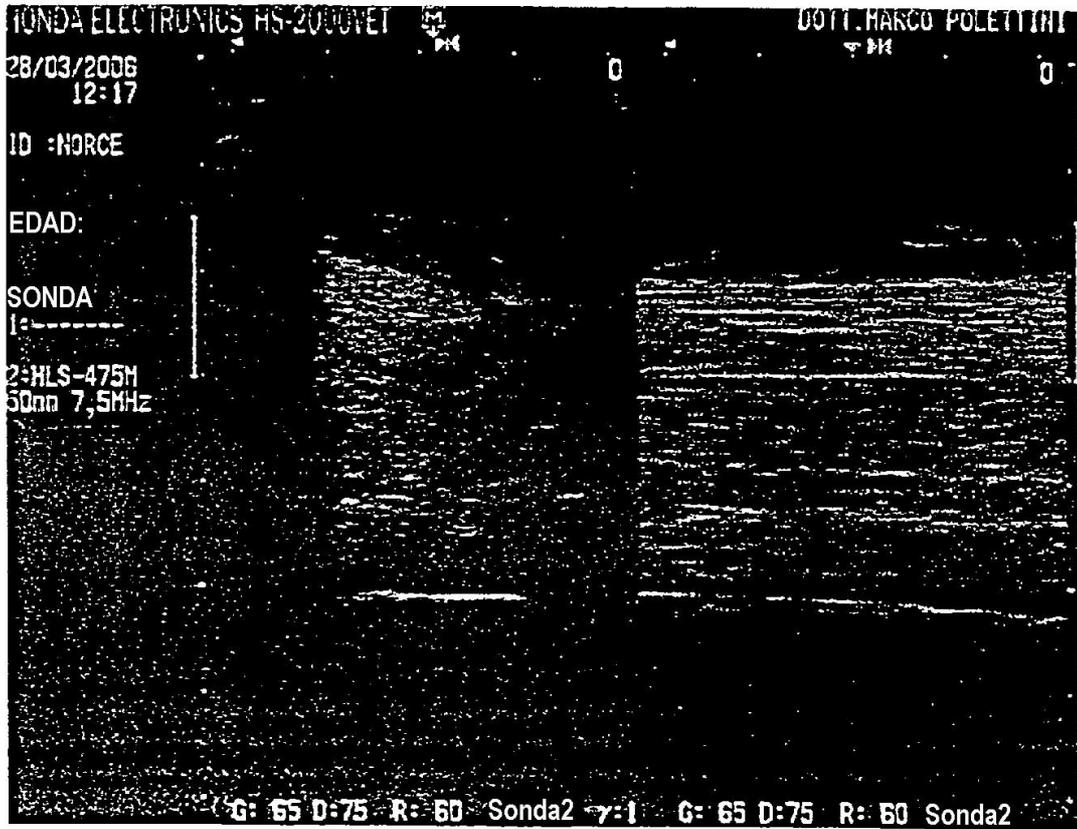
***Fig. 1***



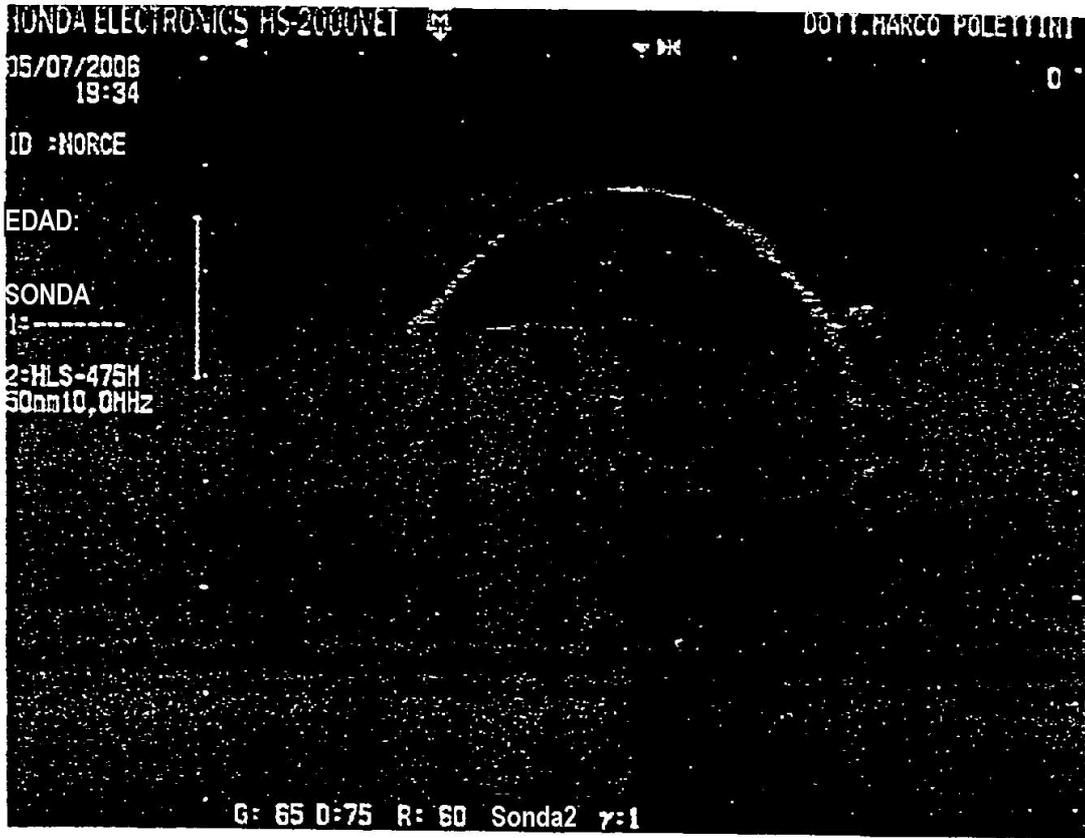
***Fig. 2***



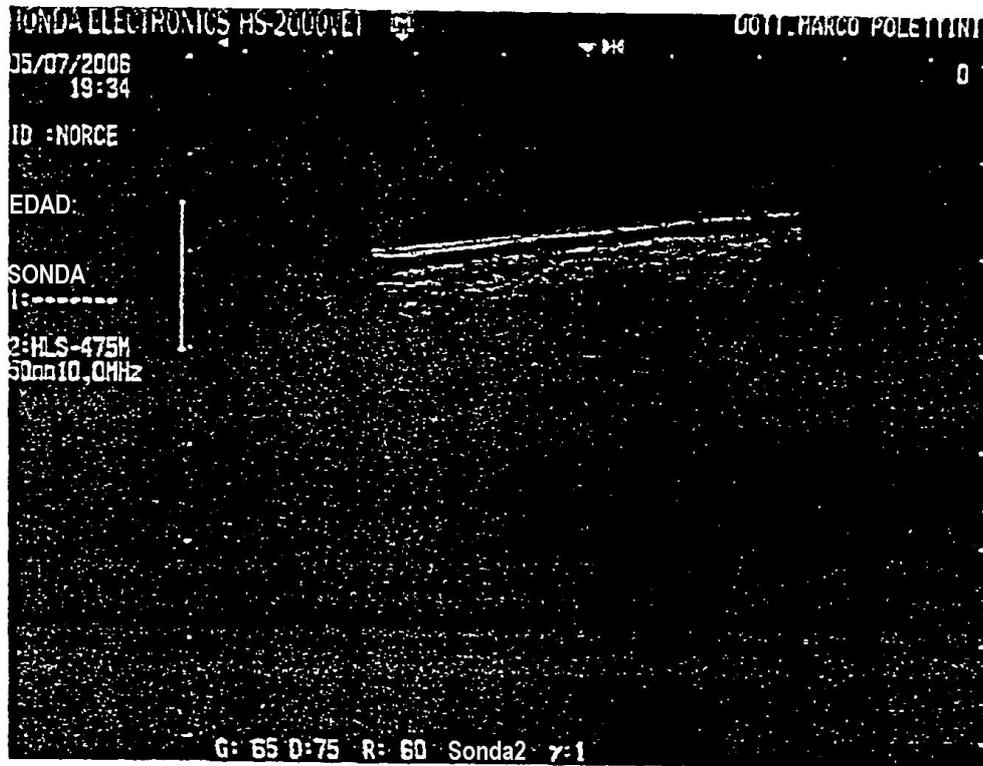
***Fig. 3***



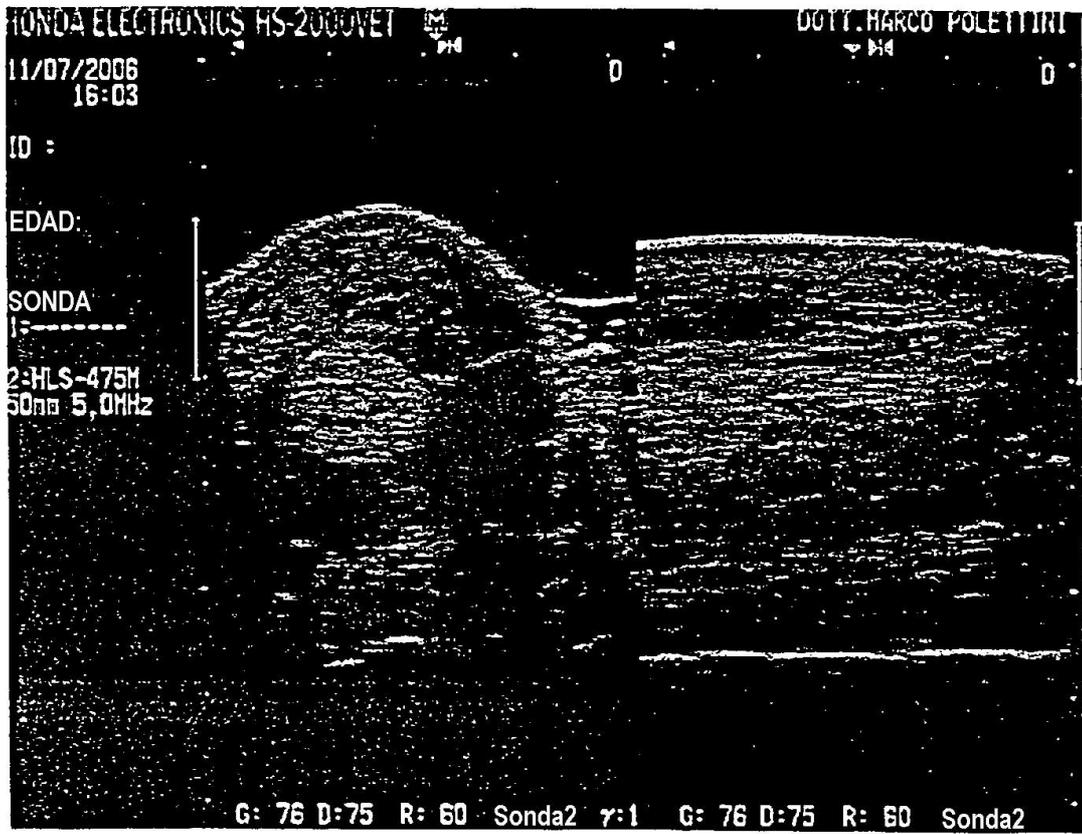
**Fig. 4**



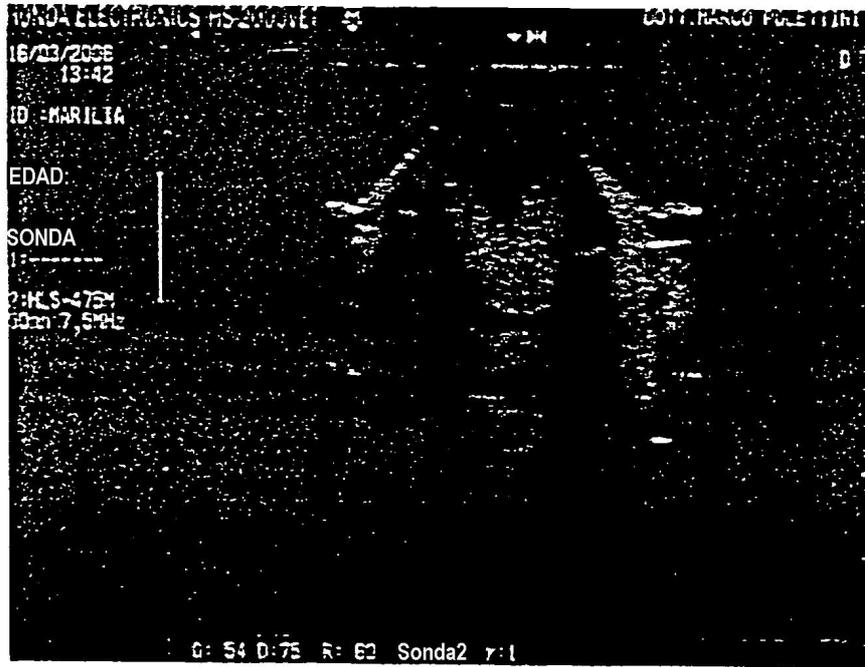
**Fig. 5**



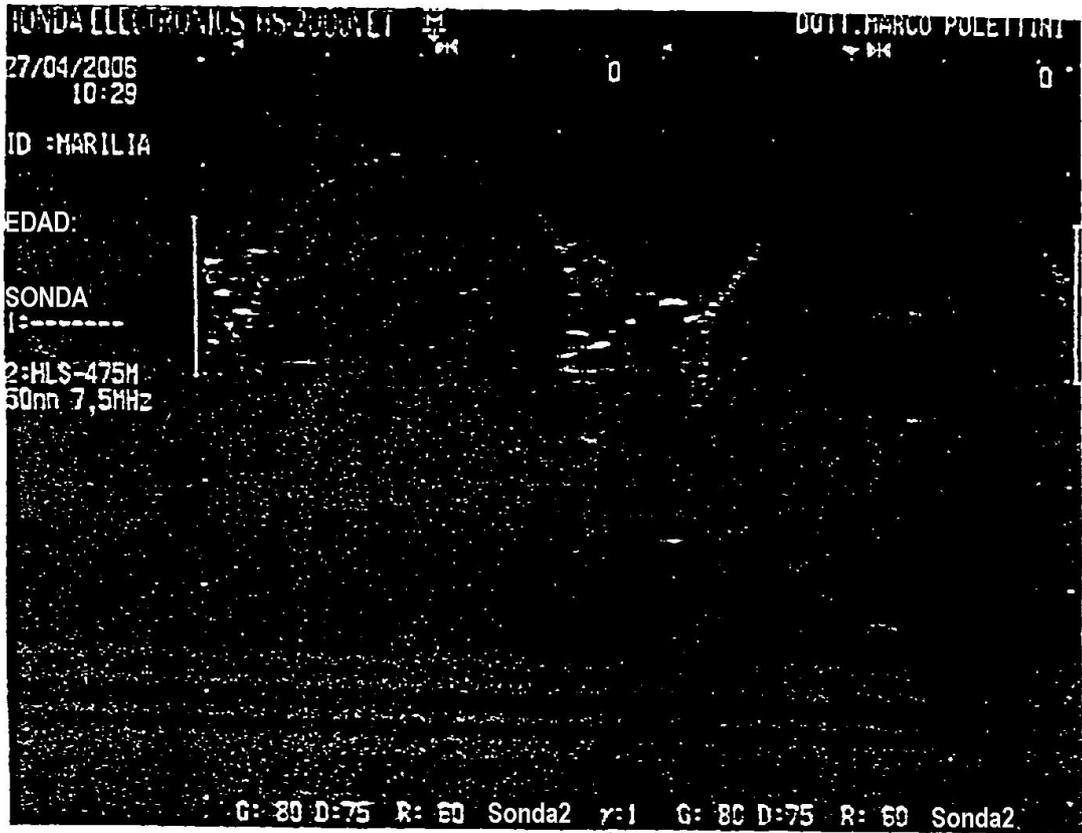
**Fig. 6**



**Fig. 7**



**Fig. 8**



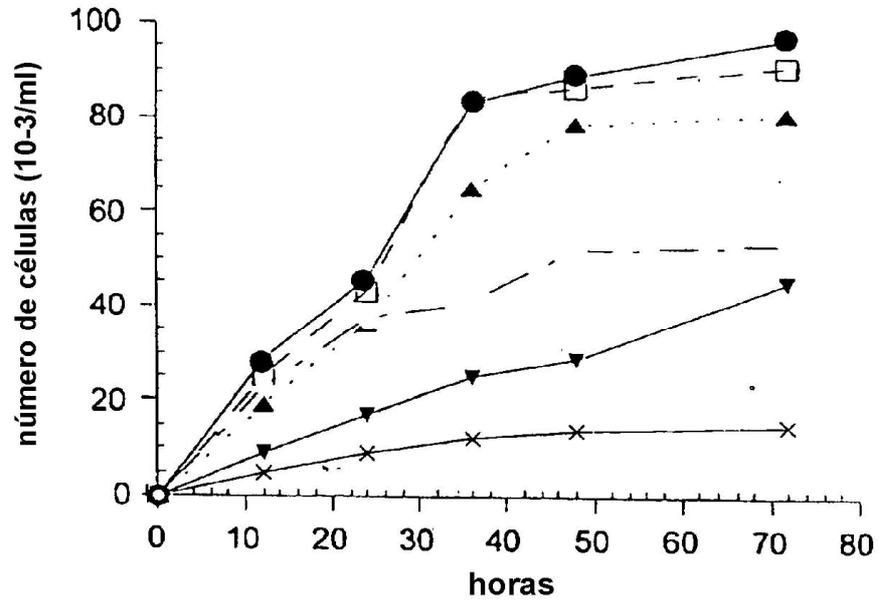
**Fig. 9**



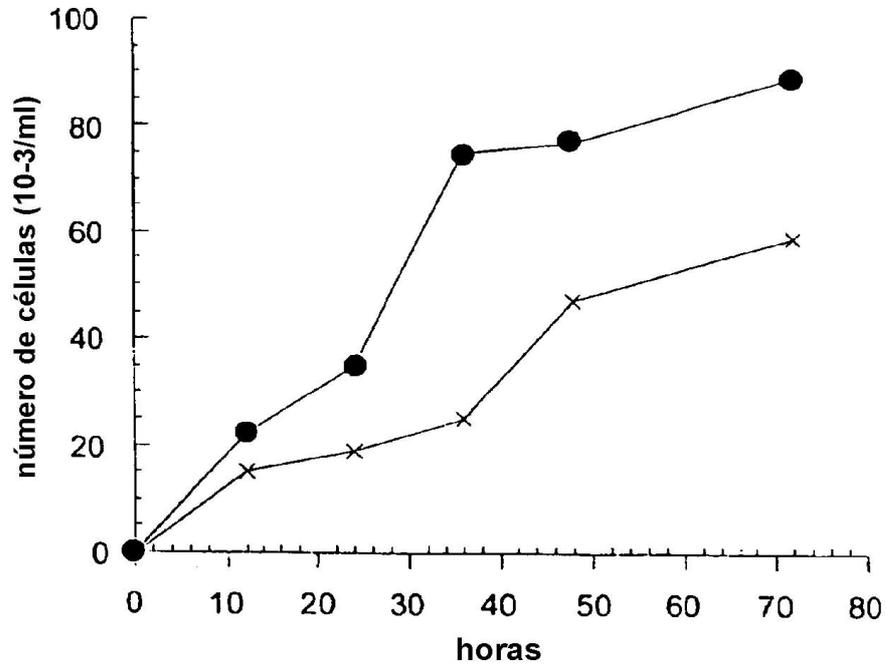
***Fig. 10***



**Fig. 11**



**Fig. 12**



**Fig. 13**