

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 100**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/28** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61P 19/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2004 E 04810667 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 1687010**

54 Título: **Tratamiento autólogo de disco degenerado con células**

30 Prioridad:

**13.11.2003 US 714559**

**14.11.2003 US 714594**

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

**06.03.2014**

73 Titular/es:

**DEPUY SPINE, INC. (100.0%)  
325 PARAMOUNT DRIVE  
RAYNHAM, MA 02767-0350, US**

72 Inventor/es:

**ATTAWIA, MOHAMED;  
SERHAN, HASSAN;  
DIMAURO, THOMAS, M.;  
GRACE, MELISSA y  
URBAHNS, DAVID**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 446 100 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

Tratamiento autólogo de disco degenerado con células

5 El disco intervertebral natural contiene un núcleo pulposo similar a la gelatina rodeado por un anillo fibroso. Bajo una carga axial, el núcleo pulposo se comprime y transfiere radialmente la carga al anillo fibroso. La naturaleza laminada del anillo fibroso le proporciona una elevada resistencia a la tracción y, por tanto, le permite expandirse radialmente en respuesta a esta transferencia de carga.

10 En un disco intervertebral sano, las células dentro del núcleo pulposo solo forman aproximadamente un uno por ciento del tejido discal por volumen. Estas células producen una matriz extracelular (MEC) que contiene un elevado porcentaje de proteoglicanos. Estos proteoglicanos contienen grupos funcionales sulfatados que retienen agua, de modo que proporcionan al núcleo pulposo cualidades amortiguadoras. Las células del núcleo pulposo también pueden secretar cantidades pequeñas de citocinas, así como matriz metaloproteinasas (MMP). Estas citocinas y MMP ayudan a regular el metabolismo de las células del núcleo pulposo.

15 En algunos casos de enfermedad de degeneración discal (EDD), la degeneración gradual del disco intervertebral se debe a inestabilidades mecánicas en otras partes de la columna vertebral. En estos casos, el incremento de las cargas y las presiones sobre el núcleo pulposo hacen que las células dentro del disco (o los macrófagos que lo invaden) emitan cantidades mayores de lo normal de las citocinas mencionadas anteriormente. En otros casos de EDD, los factores genéticos o la apoptosis también pueden producir una disminución del número de células del disco y/o liberar cantidades tóxicas de estas citocinas y MMP. En algunos casos, la acción de bombeo del disco puede funcionar mal (debido a, por ejemplo, una disminución de la concentración de proteoglicanos dentro del núcleo pulposo), de modo que se retrasa el flujo de nutrientes en el disco así como el flujo de productos residuales hacia fuera del disco. Esta capacidad reducida para proporcionar nutrientes a las células y eliminar los residuos puede dar como resultado una disminución de la viabilidad y el metabolismo resultante en la degradación adicional de la MEC junto con la acumulación de niveles altos de toxinas que pueden producir irritación nerviosa y dolor.

25 A medida que la EDD progresa, los niveles tóxicos de citocinas y MMP presentes en el núcleo pulposo comienzan a degradar la MEC. En concreto, las MMP (mediadas por las citocinas) comienzan a escindir las porciones que retienen agua de los proteoglicanos, de modo que se reducen sus capacidades de retención de agua. Esta degradación conduce a un núcleo pulposo menos flexible, por tanto varía el patrón de carga dentro del disco, lo que posiblemente cause la deslaminación del anillo fibroso. Estos cambios producen más inestabilidad mecánica y, de este modo, hacen que las células emitan todavía más citocinas, de modo que normalmente se regulan por aumento las MMP. Dado que esta cascada destructiva continúa y la EDD progresa más, el disco comienza a sobresalir ("un disco herniado" y, en última instancia, se rompe, lo que hace que el núcleo pulposo entre en contacto con la médula vertebral y produzca dolor.

35 La patente de EE.UU. Nº 6.352 ,557 ("Ferree") enseña la adición de sustancias terapéuticas tales como células del núcleo pulposo a la matriz extracelular fragmentada obtenidas de donantes y la inyección de dicha combinación en un disco intervertebral. No obstante, las células se tienen que cultivar primero y después añadir a la matriz donantes antes de la implantación en el disco enfermo. Este procedimiento requiere un retraso en el tratamiento del paciente además de someter al paciente a dos procedimientos distintos. El primer procedimiento consiste en recolectar las células, que después requieren cultivo. Después del cultivo, las células se implantan en el paciente.

40 La patente de EE.UU. 6.340 ,369 ("Ferree II") enseña la recolección de células vivas de disco intervertebral de un paciente, cultivar las células y transplantarlas en el disco afectado. Ferree II también enseña que las células se pueden combinar con matriz de glucosaminoglucano-colágeno de tipo II o matriz de glucosaminoglucano-colágeno de tipo I en función de si las células se recolectan del núcleo pulposo (NP) o del anillo fibroso (AF). Asimismo, Ferree II sugiere añadir una o más sustancias terapéuticas a las células antes del trasplante. Como fuente alternativa de las células, Ferree propone usar células precursoras del NP o el AF, condorcitos u otras células vivas que funcionan como células del NP o del AF o que podrían diferenciarse en las mismas. En su memoria, Ferree enseña que las células recolectadas se cultivan antes de transplantar.

50 Alini, Eur. Spine J., 11 (Supp.2): S215 - 220 (2002), sugiere que la inyección de una biomatriz incluida en células tendrá el potencial de restablecer la funcionalidad al disco. Los experimentos de Alini están dirigidos a aislar células del núcleo pulposo y cultivarlas. Alini también sugiere otras fuentes de células, incluidas las células del disco de donantes alogénicos y células madre autólogas. Sus enseñanzas sugieren que las células madre serían una fuente ideal, pero que no hay procedimientos conocidos para cultivar las células madre de modo que se diferenciarían en células del núcleo pulposo antes de la implantación. En esencia, Alini requiere que las células se cultiven antes de la implantación.

55 Russell (Abstract 27 ISSLS 2003) informa la realización de un experimento para determinar si las células madre mesenquimatosas (CMM) podrían estar dirigidas a presentar fenotipos de condrocitos del disco. Russell descubrió que se inducía la diferenciación de CMM humanas adultas en un fenotipo condrocítico cuando están mediadas por condiciones de cultivo y también mediante la adición de TGF-B1.

Sakai (Abstract 24 ISSLS 2003) informa de la evaluación de si el trasplante autólogo de CMM en el disco

prevendría la degeneración del disco o no. Usando conejos se aislaron CMM de la médula ósea y se cultivaron durante 2 semanas antes del trasplante. Los resultados mostraron una significativa conservación del disco.

5 Sakai, *Biomaterials*, 24: 3531 - 3541 (2003) describe el uso de una densidad celular final de  $1 \times 10^6$  células/ml, para inyectar 0,04 ml de solución en la que las CMM cultivadas autógenas se incluyeron a través de un inyector de insulina de calibre 0,41 mm en cada disco. La proliferación de las células tras el trasplante tuvo éxito.

10 Sobajima (Aabstract 43 ISSLS 2002) estudió la viabilidad de la terapia con células madres para la EDD. Las células del NP humanas se aislaron de pacientes sometidos a cirugía discal y se co cultivaron con CMM de pacientes sometidos a cirugía de cadera o células madre derivadas de músculo de ratones. Los datos demostraron un efecto sinérgico entre las células madre y las células del núcleo pulposo, lo que tiene como resultado una regulación por aumento de la síntesis de proteoglicanos *in vivo*.

Ganey, *Eur Spine J*, 11(Suppl.2):S206-S214 (2002), notificó cirugías realizadas en Alemania donde las células se recolectaban de partes del disco de un paciente después de una disquetomía. Después, las células se cultivaron y volvieron a transplantarse al paciente en una fecha posterior.

15 Sander et al. en la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. 2003/0069639 enseña el uso de biopsias tisulares tomadas de un paciente como fuente para recolectar células para implantar en un disco degenerado.

Todas las enseñanzas citadas en lo que antecede requieren cultivar las células antes de implantar, lo que, a su vez, necesita un retraso en el tratamiento del disco en degeneración del paciente.

20 El documento WO-A-2004/022078 (que forma parte del estado de la técnica de acuerdo con el Artículo 54(3) EPC) divulga un procedimiento de tratamiento de lesiones de tejido esquelético blando que implica administrar una composición de células madre mesenquimatosas autónomas en una suspensión líquida. Las células pueden enriquecerse mediante la metodología de Ficoll-Paque. La composición administrada puede incluir componentes adicionales tales como factores de crecimiento, incluidos TGF- $\beta$ , IGF-1, IGF-2, PDGF y FGF. La suspensión se puede administrar en alícuotas de 0,1 ml a 0,5 ml.

25 El documento EP-A-1464307 (que forma parte del estado de la técnica de acuerdo con el Artículo 54(3) EPC) divulga un implante de fusión intervertebral que incluye una jaula de fusión. Las superficies internas de la jaula están expuestas a una solución para proporcionar un recubrimiento de las células progenitoras (por ejemplo, células madre mesenquimatosas) y un factor de crecimiento.

30 Los presentes inventores han desarrollado un procedimiento intraoperatorio para tratar de forma eficaz la enfermedad del disco degenerativo introduciendo células no cultivadas autólogas (p. ej., células madre mesenquimatosas o condrocitos o fibroblastos) en el disco del paciente. Este procedimiento proporciona un punto de tratamiento inmediato para el paciente.

De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona una formulación para tratar la enfermedad del disco vertebral degenerativo, como se define en la reivindicación 1.

35 La formulación proporcionada por la invención se puede usar en un procedimiento de tratamiento de un disco intervertebral en el que las células recogidas de la médula ósea del paciente se introducen después en el disco degenerado para diferenciarse en células del núcleo pulposo y/o el anillo fibroso presentes en el disco, de modo que se aumenta el número de las células presentes en el disco. El implante de las células en el disco se puede realizar inmediatamente después de recolectar las células, de modo que el paciente puede evitar tener que someterse a un primer procedimiento de recolección de células, esperar a que las células se cultiven (que puede requerir varias semanas) y, después, volver para un segundo procedimiento para implantar las células cultivadas en el.

40 Se cree que hay varias ventajas derivadas de la introducción de las células en un disco objetivo. Una función principal de las células es producir matriz extracelular. Como se ha descrito anteriormente, hay varios factores que tienen como resultado muerte celular o malfunción, que a su vez contribuyen a la degradación de esta matriz. Una estrategia para reconstruir o regenerar la matriz extracelular es aumentar el número de células viables en el disco funcional que producen la matriz. Los inventores creen que el fenómeno de plasticidad de las células madre mesenquimatosas (CMM) las convierte en una elección ideal de tipo de célula para diferenciarse en las células del disco después de su implantación en el disco objetivo. Las células pueden convertirse en células del núcleo pulposo (NP) y/o del anillo fibroso que serán capaces de producir la necesaria matriz extracelular dentro del disco. Además, en el momento de la implantación, las células se pueden combinar con otros agentes terapéuticos, tales como factores de crecimiento, para ayudar a las células a sobrevivir una vez dentro del disco.

45 La formulación proporcionada por la invención se puede usar en un procedimiento para tratar la enfermedad del disco degenerativo en un disco intervertebral, que comprende recolectar CMC de un paciente e introducir las CMM viables, sin tener que cultivarlas, en el disco intervertebral del mismo paciente, en el que las células proliferarán y se diferenciarán en células del núcleo pulposo y/o del anillo fibroso.

55 Dado que la EDD es un proceso continuo, el disco en degeneración al que se administran las células puede estar

- 5 uno cualquiera de una serie de estados degenerativos. De acuerdo con lo anterior, el disco en degeneración puede ser un disco intacto. El disco en degeneración puede ser un disco herniado (es decir, en el que una porción del anillo fibroso ha sobresalido). El disco en degeneración puede ser un disco roto (es decir, en el que el anillo fibroso se ha roto y el volumen del núcleo pulposo ha exudado). El disco en degeneración puede estar deslaminado (es decir, en el que las capas adyacentes del anillo fibroso se han separado). El disco en degeneración puede tener fisuras (es decir, en el que el anillo fibroso tiene finas grietas o desgarros a través de los cuales se pueden perder moléculas determinadas del núcleo pulposo). En todos estos estados degenerativos, la matriz extracelular del AF o del NP también se está degradando.
- 10 La formulación proporcionada por la invención se puede usar para proporcionar células madre mesenquimatosas (CMC) autólogas viables intraoperatoriamente a un disco intervertebral degenerado de un paciente. Las células se pueden liberar en el núcleo pulposo o en el anillo fibroso o en ambos para reparar y restablecer cada matriz extracelular respectiva.
- 15 Los inventores creen que las CMM proporcionan una ventaja especial para administrar en un disco en degeneración porque poseen propiedades que las ayudarán a sobrevivir más fácilmente en el ambiente relativamente duro presente en el disco en degeneración. Específicamente, las CMM tienen un nivel deseable de plasticidad que les proporciona la capacidad para proliferar y diferenciarse en células de NP y del AF.
- 20 Las CMM se pueden obtener de la propia médula ósea del paciente. Como alternativa, el tejido adiposo o muscular puede ser la fuente de las CMM. Las CMM concentradas sin cultivar se pueden obtener fácilmente mediante centrifugación filtración (retención selectiva) o inmunoabsorción. Cuando se selecciona la filtración, se pueden usar los procedimientos divulgados en la patente de EE.UU. N° 6.049.026 ("Muschler"). Por ejemplo, una suspensión de aspirado de médula ósea se puede pasar por un sustrato poroso implantable biocompatible para proporcionar un injerto óseo compuesto que tiene una población enriquecida de células progenitoras tisulares. En algunas realizaciones, la matriz usada para filtrar y concentrar las CMM también se coadministra en el núcleo pulposo o el anillo fibrosis como agente terapéutico. Si esta matriz tiene propiedades mecánicas adecuadas, se puede usar para restablecer la altura del espacio discal que se ha perdido durante el proceso de degeneración. Las células se pueden inyectar al mismo tiempo o de forma concurrente con la matriz en el área objetivo del disco.
- 25 El volumen de médula ósea aspirada obtenida para recolectar las CMM está, preferentemente, entre aproximadamente 5 cc y aproximadamente 100 cc. Después, este volumen se usa durante el procedimiento de concentración para concentrar las CMM.
- 30 Cuando se selecciona centrifugación, se pueden usar los procedimientos divulgados por Connolly et al. (véase Development of an Osteogenic Bone Marrow Preparation, JBJS 71-A (No.5) Junio 1989). En este estudio con conejos, Connolly notificó que la centrifugación de 7-10 ml de médula ósea daba una media de  $3,6 \times 10^6$  células nucleadas por mililitro en la suspensión celular final.
- 35 Cuando las células e concentran usando el proceso de centrifugación, se pueden liberar en el disco en forma de pella en suspensión. En otra realización, las células se liberan usando un vehículo. El vehículo puede comprender el grupo que consiste en perlas, microesferas, nanoesferas, hidrogeles, geles, polímeros, cerámicas, colágeno y geles de plaquetas, o se puede seleccionar de dicho grupo.
- 40 El vehículo, en forma sólida o fluida, puede transportar las células de varias formas. Las células se pueden incluir, encapsular, suspender o fijar a la superficie del vehículo. En una realización, el vehículo encapsula las células, proporciona nutrientes y protege a las células cuando se liberan en el interior del disco. Después de un periodo de tiempo dentro del disco, el vehículo se degrada y libera las células. Los tipos específicos de los diversos vehículos se describen a continuación.
- 45 En algunas realizaciones, las células madre mesenquimatosas se proporcionan en un dispositivo de liberación sostenida (es decir, un dispositivo de liberación sostenida). La formulación administrada puede comprender el dispositivo de liberación sostenida. El dispositivo de liberación sostenida se adapta para permanecer dentro del disco durante un periodo prolongado y liberar lentamente las células madre mesenquimatosas contenidas en el interior hacia el entorno circundante. Este modo de liberación permite que las células madre mesenquimatosas permanezcan en cantidades terapéuticamente eficaces dentro del disco durante un periodo prolongado. Uno o más agentes terapéuticos adicionales también se pueden liberar a través de un dispositivo de liberación sostenida.
- 50 Se han diseñado armazones sintéticos, como armazones basados en ácido fumárico, y se han adaptado para permitir la atracción de determinadas células y para proporcionar la dirección para que las células se diferencien en las áreas deseadas. Las células también se pueden incluir en el armazón y después inyectar en el área objetivo sin afectar a la viabilidad o proliferación de las células. Después de implantar el armazón a base de ácido fumárico, se degrada en el tiempo y no se necesita más cirugía para eliminar el armazón.
- 55 Los vehículos también pueden comprender hidrogeles. Las células se encapsulan en las cadenas poliméricas del hidrogel después de la gelación. Los hidrogeles se pueden liberar de un modo mínimamente invasivo, tal como con una inyección en el área objetivo. El hidrogel también es reabsorbido por el cuerpo. Las propiedades del hidrogel, tal como el tiempo de degradación, el comportamiento de adhesión celular y la acumulación espacial de la matriz

extracelular, se pueden alterar mediante modificaciones químicas y de procesamiento.

Los hidrogeles adecuados para usar en la presente invención incluyen geles que contienen agua, es decir polímeros que se caracterizan por hidrofiliencia e insolubilidad en agua. Véase, por ejemplo, "Hydrogels", páginas 458 - 459, in Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, Eds Mark et al., Wiley and Sons (1990). Aunque su uso es opcional en la presente invención, la inclusión de hidrogeles puede ser altamente ventajosa porque tienden a poseer una serie de cualidades deseables. En virtud de su naturaleza hidrofílica con agua, los hidrogeles pueden alojar células viables, como células madre mesenquimatosas y pueden ayudar a cargar las capacidades de soporte del disco.

En una realización, el hidrogel es un hidrogel sintético en polvo fino. Los hidrogeles adecuados exhiben una combinación óptima de propiedades, como compatibilidad con el polímero de la matriz de elección, y biocompatibilidad. El hidrogel puede incluir uno cualquiera o más de los siguientes: Polisacáridos, proteínas, polifosfacenos, polímeros de bloque de poli(oxietileno)-poli(oxipropileno), polímeros de bloque de poli(oxietileno)-poli(oxipropileno) de etilendiamina, ácidos poliacrílicos, ácidos poli(metacrílicos), copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, poli(acetato de vinilo) y polímeros sulfonados.

En general, estos polímeros son al menos parcialmente solubles en soluciones acuosas, por ejemplo agua, o soluciones alcohólicas acuosas que tienen grupos laterales cargados o una sal iónica monovalente de los mismos. Existen muchos ejemplos de polímeros con grupos laterales ácidos que se pueden hacer reaccionar con cationes (p, ej., poli(fosfacenos), ácidos poliacrílicos y ácidos polimetacrílicos. Ejemplos de grupos ácidos incluyen grupos de ácido carboxílico, grupos de ácido sulfónico y grupos alcohólicos halogenados (preferentemente fluorados). Ejemplos de polímeros con grupos laterales básicos que pueden reaccionar con aniones son poli(vinilaminas), poli(vinilpiridina) y poli(vinilimidazol).

Las células madre mesenquimatosas se pueden liberar en el espacio discal con al menos un agente terapéutico adicional, tal como un agente para ayudar en la proliferación y diferenciación de las células. Por ejemplo, puede haber un agente terapéutico adicional (es decir, un segundo agente terapéutico) o puede haber múltiples agentes terapéuticos adicionales (p. ej., agentes terapéuticos segundos y terceros). El agente terapéutico adicional se puede liberar de forma simultánea con las células madre mesenquimatosas. En otra realización, el agente terapéutico adicional se libera tras administrar las células madre mesenquimatosas en el disco. En otra más, agente terapéutico adicional se administra primero, es decir antes de administrar las células madre mesenquimatosas al disco.

El mismo vehículo se puede usar para liberar las células y el agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, las células se localizan sobre la superficie del vehículo y el agente terapéutico adicional se introduce en el interior del vehículo. En otras realizaciones, las células y el agente terapéutico adicional se pueden liberar usando diferentes vehículos.

Otros agentes terapéuticos adicionales que se pueden añadir al disco incluyen, entre otros: vitaminas y otros suplementos nutricionales; hormonas, glicoproteínas, fibronectina, péptidos y proteínas, hidratos de carbono (simples y/o complejos), proteoglicanos, oligonucleótidos (ADN y/o ARN sentido y/o antisentido), proteínas morfogenéticas óseas (PMO), factores de diferenciación, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos frente a agentes infecciosos, tumores, fármacos u hormonas), reactivos de terapia génica y agentes anticancerosos. Las células alteradas genéticamente y/u otras células también pueden estar incluidas en la matriz de la presente invención. Si se desea, sustancias como analgésicos y narcóticos también se pueden mezclar con el vehículo para administración y liberación en el espacio discal.

En algunas realizaciones, los factores de crecimiento son agentes terapéuticos adicionales. Como se usa en el presente documento, la expresión "factor de crecimiento" abarca cualquier producto celular que modula el crecimiento o diferenciación de otras células, en particular células progenitoras del tejido conjuntivo. Los factores de crecimiento que se pueden usar de acuerdo con la presente invención incluyen, entre otros, miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos, incluidos el factor de crecimiento de fibroblastos ácido y básico (FGF-1 y FGF-2) y FGF-4, miembros de la familia del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), incluyendo PDGF-AB, PDGF-BB y PDGF-AA; EGF, miembros de la familia del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), incluyendo IGF-I e -II; la superfamilia de TGF- $\beta$ , incluyendo TGF- $\beta$ 1, 2 y 3 (incluyendo MP-52), el factor inductor de osteocitos (OIF), angiogenina(s), endotelinas, el factor de crecimiento de los hepatocitos y el factor de crecimiento de queratinocitos; miembros de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) BMP-1, BMP-3, BMP-2, OP-1, BMP-2A, BMP-2B, BMP-4, BMP-7 y BMP-14; HBGF-1 y HBGF-2; factores de diferenciación del crecimiento (GDF), miembros de la familia de proteínas de tipo hedgehog, incluyendo las proteínas hedgehog india, sonic y desert; ADMP-1; y miembros de la familia del factor estimulante de colonias (CSF), incluyendo CSF-1, G-CSF y GM-CSF; e isoformas de los mismos. El factor de crecimiento puede ser autólogo, como los incluidos en el plasma rico en plaquetas, u obtenerse comercialmente. En una realización, el factor de crecimiento se administra en una cantidad eficaz para reparar el tejido discal.

En algunas realizaciones, el factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste en TGF- $\beta$ , bFGF e IGF-1. Estos factores de crecimiento se cree que estimulan la regeneración del núcleo pulposo o estimulan la proliferación y/o diferenciación de los condrocitos, así como la secreción de la matriz extracelular. En una realización, el factor de

crecimiento es TGF- $\beta$ . Más preferentemente se administra TGF- $\beta$  en una cantidad de entre aproximadamente 10 ng/ml y aproximadamente 5000 ng/ml, por ejemplo entre aproximadamente 50 ng/ml y aproximadamente 500 ng/ml, por ejemplo entre aproximadamente 100 ng/ml y aproximadamente 300 ng/ml.

5 En una realización, al menos uno de los agentes terapéuticos adicionales es TGF- $\beta$ 1. En una realización, otro agente terapéutico adicional es FGF.

10 En algunas realizaciones, el concentrado de plaquetas se proporciona como un agente terapéutico adicional. En una realización, los factores de crecimiento liberados por las plaquetas están presentes en una cantidad al menos dos veces (p. ej., cuatro veces) mayor que la cantidad hallada en la sangre de la que se extrajeron las plaquetas. En algunas realizaciones, el concentrado de plaquetas es autólogo. En algunas realizaciones, el concentrado de plaquetas es plasma rico en plaquetas (PRP). El PRP es ventajoso porque contiene factores de crecimiento que pueden reestimar el crecimiento de la MEC y porque su matriz de fibrina proporciona un almacén adecuado para el crecimiento de tejido nuevo.

La formulación de la invención se puede usar en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad de disco degenerativo en un disco intervertebral que tiene un núcleo pulposo, que comprende:

- 15 a) administrar células madre mesenquimatosas autólogas sin cultivar en el disco en degeneración; y  
b) administrar por vía transdiscal al menos un agente terapéutico adicional en el disco en degeneración.

Para los fines de la presente invención, la "administración transdiscal" incluye, entre otras:

- 20 a) inyectar una formulación en el núcleo pulposo de un disco en degeneración, tal como un disco en degeneración relativamente intacto;  
b) inyectar una formulación en el anillo fibroso de un disco en degeneración, tal como un disco en degeneración relativamente intacto;  
25 c) proporcionar una formulación en un parche unido a una pared externa del anillo fibroso,  
d) proporcionar una formulación en depot en una localización fuera pero adyacente cercano a una pared externa del anillo fibroso ("administración transanular"), y  
e) proporcionar una formulación en depot en una localización fuera pero adyacente cercana a un platillo vertebral de un cuerpo vertebral adyacente ("administración trans-platillo vertebral").

30 Asimismo, de acuerdo con la presente invención se proporciona un dispositivo para liberar una formulación para tratar la enfermedad del disco degenerativo en el disco, que comprende:

- a) una cámara que contiene la formulación de la invención, y  
b) un puerto de suministro en comunicación fluida con la cámara y adaptado para administrar la formulación en el disco en una cantidad de entre 0,5 ml y 3,0 ml.  
35 Las células se pueden introducir (es decir, administrar) en el núcleo pulposo o el anillo fibroso, dependiendo de qué matriz extracelular necesita reconstrucción. Las células se pueden introducir en ambas regiones del disco. Agentes terapéuticos específicos se pueden seleccionar en función de la región del disco en la que las células se van a liberar.

40 La formulación se puede inyectar en el disco usando una aguja de de agujero pequeño. En algunas realizaciones, la aguja tiene un agujero de un calibre de aproximadamente 0,7 mm o menor, de modo que las posibilidades de producir herniación se mitigan. Por ejemplo, la aguja puede tener un agujero de un calibre de aproximadamente 0,5 mm o menor, de modo que las posibilidades de producir herniación se mitigan.

45 Si el volumen de la inyección directa de la formulación es suficientemente alto como para producir un problema de sobrepresión en el núcleo pulposo, se prefiere que al menos una porción del núcleo pulposo se elimine antes de la administración (es decir, inyección directa) de las células madre mesenquimatosas. En algunas realizaciones, el volumen de núcleo pulposo eliminado es sustancialmente similar al volumen de la formulación que se va a inyectar. Por ejemplo, el volumen de núcleo pulposo eliminado puede estar dentro de aproximadamente 80 - 120 % del volumen de la formulación que se va a inyectar. Además, este procedimiento tiene el beneficio añadido de eliminar al menos parcialmente algo del disco degenerado del paciente.

55 El volumen de fármaco (es decir, la formulación de células suspendidas en el medio de crecimiento o un vehículo), que se inyecta en el núcleo pulposo está entre aproximadamente 0,5 ml y aproximadamente 3,0 ml, que comprende células suspendidas en medio de crecimiento o un vehículo. Cuando se inyecta en estas cantidades menores, se cree que el volumen añadido o reemplazado no producirá un incremento de presión apreciable en el núcleo pulposo. Los factores a considerar a la hora de determinar el volumen de fármaco a liberar incluyen el tamaño del disco, la cantidad de disco eliminada y la concentración de células madre mesenquimatosas en el medio de crecimiento o vehículo.

**REIVINDICACIONES**

1. Una formulación para el tratamiento de la enfermedad del disco vertebral degenerativo, que comprende:
  - (a) células madre mesenquimatosas autólogas sin cultivar, y
  - (b) el factor 5 de diferenciación del crecimiento (GDF-5),
- 5 en la que la formulación es adecuada para administrar en un disco en degeneración inmediatamente después de recolectar las células, administrándose la formulación como suspensión que contiene las células madre mesenquimatosas autólogas sin cultivar que han sido concentradas después de la recolección y el factor 5 de diferenciación del crecimiento en un medio de crecimiento o vehículo en un volumen de entre 0,5 ml y 3,0 ml.
- 10 2. Un dispositivo para la administración de la formulación de la reivindicación 1 a un disco intervertebral degenerado que comprende:
  - (a) una cámara que contiene la formulación de acuerdo con la reivindicación 1, y
  - b) un puerto de suministro adaptado para administrar la formulación en el disco en una cantidad de entre 0,5 ml y 3,0 ml.
- 15 3. El dispositivo de la reivindicación 2, que incluye una aguja a través de la cual se administra la formulación, teniendo preferentemente un calibre máximo de 0,55 mm.