

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 211**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/28** (2006.01)

**A61P 21/00** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**C12N 5/0775** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2011 E 11726371 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2575831**

54 Título: **Regeneración de músculo esquelético utilizando células madre mesenquimales**

30 Prioridad:

**27.05.2010 US 348870 P**

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

**30.05.2016**

73 Titular/es:

**PLURISTEM LTD. (100.0%)  
Matam Building 20  
31905 Haifa, IL**

72 Inventor/es:

**DUDA, GEORG N.;  
WINKLER, TOBIAS.;  
MATZIOLIS, GEORG.;  
VON ROTH, PHILIPP. y  
PERKA, CARSTEN.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 572 211 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

Regeneración de músculo esquelético utilizando células madre mesenquimales

La presente invención se refiere a una sustancia terapéutica y/o medicamento y a los métodos relacionados con el uso de dicha sustancia y/o medicamento para la regeneración de músculo esquelético utilizando células madre mesenquimales (MSC) que se pueden aplicar directamente o poco después de la lesión o el daño en el músculo.

## Antecedentes de la invención

El trauma del músculo esquelético a menudo conduce a déficits funcionales graves debido a una regeneración insuficiente de la musculatura. Los enfoques para reducir los daños colaterales debidos al trauma de los tejidos blandos han sido hasta hace poco, predominantemente conservativos y se basan en la preparación de macroestructura muscular para permitir mecanismos de curación intrínsecos del músculo. Tales enfoques incluyen el enfoque tradicional RICE (Reposo Hielo Compresión Elevación) y la sutura de muñones musculares retraídos, que permiten que surtan efecto las capacidades regenerativas intrínsecas del músculo. El proceso central de tales mecanismos intrínsecos está representado por la activación de células satélite y su contribución a nuevas miofibras (Mauro, A., J Biophys Biochem Cytol 9, 493, 1961).

Un concepto relativamente reciente en la regeneración de músculo y tejido se basa en la idea de introducir células progenitoras u otras células capaces de inducir o experimentar la regeneración en el lugar de la lesión muscular o tisular. Se ha propuesto que las células con potencial regenerativo son capaces de estimular el proceso de crecimiento y curación de heridas de tejidos humanos. Los mecanismos de esta estimulación son por una parte una secreción de factores tróficos y de factores inmunomoduladores y son por otra parte una contribución a las fibras musculares contráctiles por parte de las células progenitoras.

La terapia con células madre mesenquimales (MSC) ofrece una herramienta eficaz en la regeneración de la función muscular después de un trauma grave. Las MSC son células mesenquimales encontradas, p. ej., en médula ósea, dermis, placenta, tejido adiposo y periostio. Una parte de estas células es capaz de diferenciarse en tipos específicos de tejidos mesenquimales o conectivos incluyendo tejido adiposo, óseo, cartilaginoso, muscular y tejidos conectivos elásticos y fibrosos.

Las MSC muestran un elevado potencial de proliferación y una menor morbilidad en el sitio donador cuando se comparan con células derivadas de músculo, haciéndolas de ese modo un candidato ideal para la aplicación clínica en la regeneración muscular.

Recientemente se han propuesto nuevas posibilidades terapéuticas para la regeneración muscular que se basan en la idea de un soporte extrínseco de la regeneración celular mediante el incremento del número de células progenitoras en el tejido lesionado. Los experimentos iniciales mostraron que el trasplante de mioblastos podría restaurar parcialmente la distrofina en las miofibras de la musculatura con deficiencia de esta proteína (Partridge, T.A., et al. Nature 337, 176, 1989, Huard, J., et al. Clin Sci (Lond) 81, 287, 1991) y mejorar las condiciones de regeneración de la musculatura desnervada e isquémica en comparación con músculos de control no dañados (DeRosimo, J.F., et al. Cell Transplant 9, 369, 2000, Arcila, M.E., et al. J Neurobiol 33, 185, 1997).

La aplicación clínica de MSC en la regeneración de músculo esquelético en la técnica anterior es limitada. Hasta la fecha, pocos estudios han investigado el efecto de la transferencia local de MSC sobre la regeneración del músculo esquelético, dos de los cuales evaluaron el resultado de la terapia celular (Matziolis, G., et al. Tissue Eng 12, 361, 2006, Natsu, K., et al. Tissue Eng 10, 1093, 2004).

Estudios previos han investigado el efecto de las MSC en el tratamiento de tejido muscular dañado por toxinas. Por ejemplo, se inyectaron células madre mesenquimales humanas modificadas genéticamente en musculatura con deficiencia de distrofina de ratones inmunosuprimidos después del daño tóxico. No se pudo encontrar una mejora en las fuerzas de contracción del músculo y los autores establecieron que las MSC eran de hecho poco adecuadas actualmente para el tratamiento de las distrofias musculares (Gang et al. Experimental Cell Research 315: 2624, 2009). También se han investigado tipos de células alternativos en el tratamiento de la lesión del músculo esquelético. El trasplante de células sanguíneas de cordón umbilical humano en músculos gastrocnemios aplastados demostró pocos cambios en la regeneración del músculo, por medio de lo cual se demostró que no había efecto funcional en la regeneración del músculo (Brzoska et al, Experimental Hematology, 2006).

El solicitante ha demostrado previamente que el trasplante local de  $1 \times 10^6$  MSC autólogas una semana después de una lesión en el músculo sóleo podía mejorar las fuerzas musculares medidas tres semanas después de la aplicación (Matziolis, G., et al. Tissue Eng 12, 361, 2006). El efecto funcional de las MSC aumenta con el número de células transplantadas. Una demora de una semana entre la lesión en el músculo sóleo y la inyección local de las MSC adheridas al paradigma comúnmente aceptado de que la fase inflamatoria inicial, con una elevada actividad de los macrófagos, resultaría poco ventajosa para la supuesta integración y efecto regenerativo de las MSC aplicadas (Jarvinen, M. y Sorvari, T. Acta Pathol Microbiol Scand [A] 83, 259, 1975, Li, Y. y Huard, J. Am J Pathol 161, 895, 2002).

Los procesos biológicos que se desencadenan y se mantienen por una lesión en el tejido muscular esquelético son diversos. El curso natural después de una lesión del músculo esquelético se inicia por una fase inflamatoria, que está determinada por la invasión de los neutrófilos y posteriormente los macrófagos (véase la Figura 1, adaptada de Li, Y. y Huard, J. Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injured skeletal muscle, *Am J Pathol* 161, 895, 2002). La presencia de células inflamatorias dentro del tejido se inicia inmediatamente después de la lesión y dura hasta varias semanas. Su tarea inicial es eliminar el tejido necrótico para permitir los procesos regenerativos, que comienzan con la activación de células satélite ya desde el tercer día después de la lesión de las fibras musculares.

La técnica anterior que hace referencia a los mecanismos de regeneración muscular por parte de células madre está centrada concretamente en el efecto estimulador de la regeneración paracrina o inmunomodulador de las células transplantadas, sobre el impacto de la fusión de las células con miofibras o una diferenciación en miocitos. El primero mejora muy probablemente la supervivencia de los miocitos dentro del tejido diana y por otra parte también podría disminuir los daños colaterales, que se producen por la inflamación local.

En comparación con la inyección inmediata, las MSC que se transplantan localmente siete días después de la lesión se enfrentan a cierta inflamación en el tejido muscular, pero en un grado significativamente menor. En este momento las miofibras en regeneración son predominantes, aunque el tejido fibroso de colágeno ya se ha depositado en las zonas con defecto y sus intersticios.

El momento ideal para transplantar las células progenitoras para la regeneración del daño del músculo esquelético no ha sido establecido. En el conocimiento de los autores de la presente invención, el trabajo previo sobre la regeneración muscular esquelética no ha proporcionado ninguna recomendación referente al momento de aplicación debido a la carencia de estudios destinados a esta cuestión. Los informes previos, que describen el trasplante de células sanguíneas de cordón umbilical humano a músculos gastrocnemios aplastados de ratones inmunodeprimidos o el trasplante de mioblastos a músculos con deficiencia de distrofina después de la lesión por toxinas, no pudieron demostrar ningún efecto terapéutico que condujera a la suposición de que el trasplante inmediato de células progenitoras sea propenso a empeorar el resultado debido a un microentorno inicial hostil (Gang et al. *Experimental Cell Research* 315: 2624, 2009; Rousseau al. *Cell Transplant.* 19(5), 589, 2010).

La visión general encontrada en la técnica anterior es que las MSC transplantadas directamente después del trauma del músculo no podrían ejercer su efecto sobre la regeneración debido al microentorno hostil. El extraordinario aspecto de la presente invención es que una aplicación inmediata de MSC después de una lesión muscular es igualmente capaz de incrementar las fuerzas de contracción del músculo que el trasplante retardado. La presente invención proporciona un método alternativo más eficaz y más susceptible para el trasplante local de MSC, caracterizado porque las MSC se aplican inmediatamente o poco después de la lesión del músculo esquelético. El método de trasplante de la técnica anterior una semana después de la lesión presenta múltiples desventajas con respecto al malestar y el riesgo del paciente. El efecto inesperado de que la regeneración del músculo sea eficaz después del trasplante inmediato de MSC tiene una enorme importancia pragmática ya que el trasplante de MSC directamente después del trauma muscular refleja las demandas clínicas actuales. Von Roth et al., *Inflamm. Res.* 59 (Supl. 1), página S42, hacen referencia al trasplante local inmediato de MSC en músculo gravemente lesionado en ratas.

### **Compendio de la invención**

A la luz de la técnica anterior, el problema técnico subyacente a la presente invención es proporcionar una sustancia terapéutica y/o medicamento y métodos relacionados con el uso de dicha sustancia y/o medicamento para la regeneración de músculo esquelético utilizando células madre mesenquimales (MSC) que pueden ser aplicados directamente o poco después del daño o la lesión musculares.

Este problema se resuelve por las características de las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferidas de la presente invención se proporcionan en las reivindicaciones dependientes.

Por lo tanto, la invención se refiere a células madre mesenquimales para su uso como un medicamento para el tratamiento del daño o lesión del músculo esquelético, para potenciar la recuperación funcional y/o la regeneración estructural del daño o lesión del músculo esquelético, preferiblemente además de reducir el dolor asociado con dicha lesión muscular en el sujeto, por medio de lo cual el tratamiento con dichas MSC se produce en el plazo de 72 horas, preferiblemente en el plazo de 48 horas, más preferiblemente en el plazo de 24 horas o más, preferiblemente en el plazo de 12 horas, después del daño o lesión del músculo, en donde

las células madre mesenquimales de la presente invención se caracterizan porque las MSC son MSC alogénicas.

En una realización preferida las células madre mesenquimales de la presente invención se caracterizan porque las MSC son MSC de médula ósea, preferiblemente extraídas de médula ósea.

Las MSC autólogas se obtienen del paciente intraoperativamente durante la misma operación en la que se van a administrar las MSC.

En una realización las células madre mesenquimales de la presente invención se caracterizan porque las MSC se concentran mediante agotamiento de glóbulos rojos de un aspirado de médula ósea, preferiblemente utilizando un sistema Harvest SmartPReP 2, y se preparan como una fracción de células nucleares de la muestra de médula ósea.

5 En una realización, las células madre mesenquimales de la presente invención se caracterizan porque las MSC se preparan y/o se expanden utilizando un cultivo celular in vitro.

En una realización preferida las células madre mesenquimales de la presente invención están destinadas a su uso como un medicamento para el tratamiento del daño o lesión del músculo esquelético 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 horas después de dicha lesión, o 14, 16, 18, 20 o 22 horas después de dicha lesión

10 En una realización las células madre mesenquimales de la presente invención se caracterizan porque la lesión del músculo esquelético que se va a tratar es un lesión provocada durante una sustitución de cadera, durante la cirugía de la columna vertebral, una lesión muscular provocada en asociación con lesiones por manguitos giratorios y/o lesiones traumáticas de tejidos blandos con lesiones concomitantes del músculo esquelético.

15 En una realización las células madre mesenquimales de la presente invención se caracterizan porque las MSC se seleccionan y se aíslan utilizando adherencia al plástico, separación de células por FACS y/o MACS.

En una realización preferida las células madre mesenquimales de la presente invención se caracterizan por medio de marcadores CD44+, CD73+, CD90+ y/o CD45-.

En una realización preferida las células madre mesenquimales de la presente invención se caracterizan porque

- los marcadores CD105 CD73 y/o CD90 son positivos ( $\geq 95\%$ ), y
- 20 • los marcadores CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19, y/o HLA-DR son negativos ( $\leq 2\%$ ).

Los marcadores proporcionados en la presente memoria para las MSC de la presente invención se pueden utilizar combinados entre sí, o individualmente según se requiera.

25 En una realización preferida las células madre mesenquimales de la presente invención se caracterizan porque el daño o la lesión del músculo que se va a tratar se selecciona del grupo que comprende trauma directo, laceración, abrasión, moretones, lesión por aplastamiento, lesión por contusión de corto o largo impacto, desgarrado, distensión y/o esguince preferiblemente seleccionado del grupo que comprende lesión por contusión de corto o largo impacto, lesión por aplastamiento, laceración, distensión, y más preferiblemente seleccionado del grupo que comprende laceración muscular, lesión muscular provocada por corte o disección de, o incisión quirúrgica en, músculo esquelético, tal como lesiones musculares que se producen durante una operación o intervención quirúrgica, también conocidas por miotonías, lesiones deportivas, tales como músculos desgarrados o fibras musculares desgarradas, y/o lesiones que se producen a partir de músculos elongados o sobre-elongados y/o lesiones provocadas durante cirugía u operación en torno a la médula espinal y/o la columna vertebral, además de roturas de manguitos giratorios.

30

35 En una realización las células madre mesenquimales de la presente invención se caracterizan porque las MSC se van a administrar localmente a un músculo lesionado y/o al tejido sano que circunda la musculatura dañada, preferiblemente a una distancia de 0,5 mm a 100 mm, preferiblemente entre 0,5 mm y 50 mm o más preferiblemente entre 0,5 mm y 20 mm del daño muscular.

En una realización las células madre mesenquimales de la presente invención se caracterizan porque las MSC se van a administrar por medio de inyección.

40 En una realización las células madre mesenquimales de la presente invención se caracterizan porque la cantidad terapéuticamente eficaz de MSC que se va administrar es de entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^{10}$  MSC/kg de peso corporal.

En una realización las células madre mesenquimales de la presente invención se caracterizan porque las MSC están presentes en una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de MSC además de al menos una sustancia farmacéuticamente aceptable.

45 En una realización, las células madre mesenquimales de la presente invención se caracterizan porque las MSC están modificadas genéticamente, por ejemplo para producir y secretar proteínas, tales como IGF-1, que influyen en los procesos de regeneración o inflamatorios; por ejemplo para producir y secretar proteínas que inhiben los procesos que interfieren en la regeneración, tales como el TGF-beta que inhibe la fibrosis.

50 En una realización las células madre mesenquimales de la presente invención se caracterizan porque las MSC han sido conectadas o acopladas a proteínas u otras sustancias in vitro con el fin de influir en el proceso de regeneración o inflamatorio.

La invención se refiere adicionalmente al uso de células madre mesenquimales como medicamento, y/o para la preparación de un medicamento, para el tratamiento del daño o lesión del músculo esquelético en el plazo de 72 horas, preferiblemente en el plazo de 48 horas, más preferiblemente en el plazo de 24 horas o más preferiblemente en el plazo de 12 horas, después del daño o lesión del músculo.

5 La invención se refiere adicionalmente a un método para tratar el daño o lesión del músculo esquelético en animales o seres humanos, caracterizado por la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre mesenquimales (MSC) al mamífero en el plazo de 72 horas, preferiblemente en el plazo de 48 horas, más preferiblemente en el plazo de 24 horas o más preferiblemente en el plazo de 12 horas, por ejemplo inmediatamente o poco después del daño o lesión del músculo.

10 El método de la presente invención se caracteriza porque las MSC son MSC alogénicas. La fuente de las MSC es de un donante diferente (alogénico). Las MSC procedentes de un donante diferente se pueden administrar combinadas con otras sustancias activas, tales como inmunomoduladores, en cualquier parte necesaria para facilitar el tratamiento de un paciente con células alogénicas.

La presente invención incluye MSC que se extraen preferiblemente de médula ósea. Alternativamente, la presente invención también incluye la aplicación de MSC que se extraen de la sangre, por medio de concentración mediante centrifugación u otros procedimientos de concentración o por medio de procedimientos de selección, p. ej. clasificación celular positiva o negativa, o por medio de procedimientos de aislamiento y cultivo y/o proliferación de células. La presente invención abarca la aplicación de MSC que se extraen de tejido adiposo, p. ej. obtenido de procedimientos de liposucción. La presente invención abarca la aplicación de MSC que se extraen de la placenta, mediante digestión del tejido placentario y cultivo y proliferación de células de tipo mesenquimal. La presente invención también abarca la aplicación de MSC que se extraen de órganos parenquimales por digestión y cultivo y proliferación de células mesenquimales. La presente invención también abarca la aplicación de MSC que se extraen de tejido muscular, p. ej. mediante biopsias o por escisión de tejido muscular. La presente invención también abarca la aplicación de MSC que se extraen de periostio. La presente invención también abarca la aplicación de MSC que se extraen de la piel.

Las MSC autólogas se extraen del paciente de manera intraoperatoria durante la misma operación en la que se administran las MSC. Esto también permite que el tratamiento de pacientes de accidentes o emergencias se beneficie de la tecnología. Las células se extraen durante los procedimientos operatorios, se purifican o se clasifican en mayor o menor medida, dependiendo del paciente concreto y de la aplicación, y se administran inmediatamente. Esto representa la satisfacción de las demandas clínicas actuales y futuras, evitando la necesidad de MSC previamente extraídas y del cultivo in vitro antes de la aplicación.

En una realización preferida el método de la presente invención se caracteriza porque las MSC se concentran mediante agotamiento de glóbulos rojos a partir de aspirado de médula ósea, preferiblemente utilizando el sistema Harvest SmartPReP 2, y se administran como una fracción de células nucleares de la muestra de médula ósea. Los sistemas Harvest SmartPReP, los sistemas Sepax u otros sistemas que son apropiados para la separación de fracciones de células nucleares de las aspiraciones de médula ósea, que contienen las MSC que se van a administrar, también están incluidas en la presente invención. Tales sistemas de separación o concentración permiten la administración intraoperatoria de las MSC. La fracción nuclear de la muestra de médula ósea se puede administrar a continuación directamente, o se pueden acometer separaciones adicionales de células antes de la administración, si el paciente o la aplicación demandan una mayor pureza de las MSC.

En una realización adicional, el método de la presente invención se caracteriza porque las MSC se preparan y/o expanden utilizando el cultivo celular in vitro. En una realización adicional, el método de la presente invención se caracteriza porque las MSC se aplican en el tratamiento de las lesiones musculares después de la sustitución de la cadera, el daño del músculo esquelético durante la cirugía de la columna vertebral, la lesión muscular provocada en asociación con lesiones por manguitos giratorios y/o lesiones traumáticas de tejidos blandos con lesiones del músculo esquelético concomitantes.

En una realización preferida el método de la presente invención se caracteriza porque las MSC se seleccionan y se aíslan utilizando la adherencia al plástico, la separación celular por medio de FACS y/o MACS. En una realización adicional, el método de acuerdo con la invención se caracteriza porque la separación por medio de FACS y/o MACS se lleva a cabo utilizando marcadores CD44+, CD73+, CD90+ y/o CD45-, y/o los siguientes criterios, caracterizados porque los marcadores CD105 CD73 y/o CD90 son positivos ( $\geq 95\%$ ) y los marcadores CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19, y/o HLA-DR son negativos ( $\leq 2\%$ ). Estos criterios para la caracterización de las MSC han sido establecidos por la International Stem Cell Society.

FACS (clasificación celular activada por fluorescencia) es un método de separación celular basado en la citometría de flujo bien conocido por los expertos en la técnica. MACS (clasificación celular activada por magnetismo) se refiere a un mecanismo de separación celular adicional basado en la separación de células dependiente de sus antígenos extracelulares y también es conocido por los expertos en la técnica.

En una realización preferida, el método de la presente invención se caracteriza porque el daño o la lesión del músculo que se va a tratar se selecciona del grupo que comprende trauma directo, laceración, abrasión, moretones, lesión por aplastamiento, lesión por contusión de impacto corto o largo, desgarro, distensión y/o esguince, preferiblemente seleccionado del grupo que comprende lesión por contusión de corto o largo impacto, lesión por aplastamiento, laceración, distensión, y más preferiblemente seleccionado del grupo que comprende laceración muscular, corte o disección de, o incisión quirúrgica en, músculo esquelético, tal como lesiones musculares que se pueden producir durante la operación o la intervención quirúrgica, también conocido como miotonía. Las lesiones del músculo esquelético adicionalmente preferidas que se van a tratar con el método y con los productos de la presente invención son lesiones deportivas, tales como músculos desgarrados o fibras musculares desgarradas, y/o lesiones que se producen a partir de músculos elongados o sobre-elongados. Otras lesiones que se van a tratar hacen referencia a lesiones musculares provocadas durante la cirugía u operación en torno a la médula espinal y/o la columna vertebral, y a las roturas por manguitos giratorios.

La aplicación de MSC de acuerdo con la presente invención también se refiere a su uso en la terapia contra el dolor, por medio de la cual las MSC aplicadas para potenciar la regeneración del músculo esquelético proporcionan adicionalmente un efecto de alivio del dolor. La aplicación de MSC conduce a una reducción del dolor en el sujeto tratado con las MSC en oposición a los sujetos no tratados con las MSC.

La aplicación de las MSC de acuerdo con la presente invención también hace referencia a su capacidad para acelerar el tiempo de rehabilitación después de la lesión del músculo esquelético, para mejorar las fuerzas de contracción de los músculos tratados, para reducir la generación de cicatrices y el tamaño de las cicatrices de las heridas en el post-operatorio por encima de los músculos tratados por medio de terapia con MSC. Adicionalmente, con respecto al tratamiento del enfoque relacionado con las lesiones del músculo esquelético por medio de trasplante de MSC, p. ej. durante o después de la artroplastia de cadera, la presente invención también se refiere a la capacidad de las MSC para reducir la formación de cicatrices intramusculares, para mejorar la amplitud de movimiento de la articulación, para disminuir la frecuencia de la cojera, para reducir la frecuencia de osificaciones periarticulares y consiguientemente para prolongar el tiempo de flexibilización de las prótesis, p. ej. prótesis de cadera.

La presente invención proporciona por lo tanto mejoras significativas en la regeneración del músculo esquelético en más de un sentido, debido a que se potencia la curación de heridas, se potencia la regeneración funcional y se reduce el dolor que rodea la herida y también general en pacientes que reciben las MSC. Esta combinación única de características no ha sido descrita en la técnica anterior, por medio de lo cual se puede producir cada uno de los efectos solo, combinado con otro de los efectos, o los tres efectos combinados. Cuando aparecen combinados, los efectos descritos en la presente memoria interactúan entre sí en sinergia para proporcionar un resultado único en lo que se refiere a la curación, la regeneración funcional y/o la restauración del músculo esquelético después de la lesión.

En una realización adicional, el método de la presente invención se caracteriza porque las MSC se aplican localmente al músculo lesionado y/o al tejido sano que rodea la musculatura dañada, preferiblemente a una distancia de 0,5 mm a 100 mm, preferiblemente entre 0,5 mm y 50 mm o más preferiblemente de 0,5 mm a 20 mm del daño muscular.

En una realización preferida el método de la presente invención se caracteriza porque las MSC se administran por medio de inyección.

En una realización preferida el método de la presente invención se caracteriza porque la cantidad terapéuticamente eficaz de MSC que se va a administrar es de  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^{10}$  MSC/kg de peso corporal.

En un aspecto preferido adicional, el método de la presente invención se caracteriza porque las MSC se administran como una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de MSC además de al menos una sustancia farmacéuticamente aceptable.

### Descripción detallada de la invención

Uno de los principales problemas en la implantación de sustituciones completas de cadera por medio del enfoque transgluteal clásico es la lesión asociada del músculo glúteo medio. Esto da como resultado una pérdida consecutiva de tejido muscular y el subsiguiente remplazo con tejido cicatrizal. Esto conduce directamente a un déficit funcional de la musculatura estabilizadora de la pelvis y una cojera pronunciada del paciente de intensidades variables. Durante períodos prolongados esto también conduce a una resorción ósea o una degeneración en el sitio de inserción femoral del músculo lesionado en torno al vástago proximal de la prótesis. Debido a que la flexibilización o dislocación de la prótesis se produce más a menudo en los casos en los que la musculatura pélvica tiene una coordinación y estabilización limitadas, se puede esperar un efecto negativo sobre la vida del remplazo de cadera.

Además, los métodos mínimamente invasivos recientemente establecidos conducen a menudo a un trauma indirecto pronunciado de la musculatura que rodea la cadera en el sentido de un trauma por presión o aplastamiento y a un

trauma por desnervación debido a la entrada quirúrgica. Semejante lesión y trauma muscular no dejan esperanza de una mejora fundamental de la función de la musculatura de la cadera o la pelvis.

En el momento actual no existe una terapia establecida para la regeneración de la musculatura lesionada.

5 Las lesiones musculares se pueden producir a través de muchos mecanismos diferentes. Los tipos posibles de lesiones son el trauma directo, tales como cortes y abrasiones, moretones o contusiones, desgarros, distensiones o esguinces a partir de trauma indirecto, isquemia y disfunciones neurológicas. En los campos de la cirugía ortopédica y de emergencias, los traumas por cortes y contusiones juegan un papel crítico.

Se describen diversas fases de regeneración muscular que tienen lugar a lo largo de todo el proceso de curación.

10 (1) Fase de degeneración e inflamación: En los primeros días después del trauma, las porciones de fibras musculares mueren y se produce una reacción inflamatoria. La zona necrótica es infiltrada por células mononucleares, macrófagos activados y células T. Los linfocitos activados secretan una gran número de sustancias mensajeras diferentes que desencadenan con posterioridad una respuesta inflamatoria. El proceso de regeneración se inicia a continuación, pero es inicialmente inhibido por la formación de un hematoma intra- y extra-muscular. Además, el hematoma también promueve la formación de un tejido cicatrizal no deseado.

15 (2) Fase de reparación: En los siguientes 7 - 10 días las porciones de fibra muscular necrótica son aclaradas por los macrófagos y comienza la regeneración del músculo. Las células satélite migran a las fibras musculares dañadas o forman nuevas fibras. Los capilares también inmigran a la zona de regeneración. El proceso de regeneración alcanza su punto más activo aproximadamente 14 días después del trauma.

20 (3) Fase de restauración (fibrosis): Esta fase se produce solapándose con la fase previa y puede durar tanto como cuatro semanas. El diámetro de fibra normal y la diferenciación completa de los tipos de fibras se logran por medio de una re-innervación del tejido en regeneración.

25 En función de estos conocimientos, se llevaron a cabo típicamente estudios con animales experimentales que implicaban el transplante de células una semana después del trauma muscular. El concepto subyacente del transplante retardado se basaba en el criterio científico lógico. El entorno celular y tisular del músculo inmediatamente después del trauma indicaba claramente un efecto negativo sobre las células transplantadas.

30 Teniendo en cuenta que el transplante sólo representa un estrés significativo tanto para las células transplantadas como para el tejido receptor, era extraordinariamente probable que la combinación de este estrés en un entorno tisular post-trauma inmediato tuviera un impacto negativo sobre cualquier potencial efecto de regeneración aditivo. Por lo tanto, el transplante de células en un entorno estimulador de la regeneración (fase 2) ofrecía las mayores posibilidades de éxito. Como resultado de esto se ha demostrado la aplicación clínica y la utilidad del transplante de células madre, como es sabido en la técnica anterior, basándose en este concepto de transplante retardado.

35 A pesar de esto, la estrategia de transplante retardado no representa un procedimiento ideal para el procedimiento clínico cotidiano. Los músculos se pueden lesionar iatrogénicamente durante una operación o durante un trauma relacionado con un accidente. En ambas situaciones, una solución ideal consiste en proporcionar MSC al mismo tiempo que la operación o el trauma con el fin de evitar un tratamiento adicional del paciente una semana después de la operación o el accidente. Cada intervención en el paciente acarrea riesgos potenciales, tales como infecciones o incidentes de narcosis. Por lo tanto, la aplicación de MSC se podría llevar a cabo al mismo tiempo que el tratamiento inicial siempre que sea posible. Incluso en el caso de una reducción potencial del efecto de regeneración del músculo debida a la aplicación temprana de las MSC, la reducción del riesgo relacionado para el paciente debido a la minimización de procedimientos médicos representa una ventaja significativa.

40 La presente invención representa por lo tanto una alternativa a la terapia con transplante retardado de MSC, que supera las desventajas de la técnica anterior.

Por lo tanto, la invención proporciona células madre mesenquimales (MSC) como se describe en la reivindicación 1.

45 Es importante observar que el método descrito en la presente memoria hace referencia a un método de regeneración funcional del músculo esquelético. La aplicación o el uso descritos de MSC potencian la recuperación del músculo, de manera que la herida o lesión muestran una mejora de la curación además de propiedades contráctiles funcionalmente mejoradas, como se describe en los ejemplos de más abajo. La mejora en las fuerzas de sacudida rápida y tetánica demostrada en el músculo tratado de acuerdo con la presente invención no se había mostrado antes. Diversos estudios en la técnica anterior han intentado analizar el destino de las células transplantadas, aunque sigue estando poco claro si se logran beneficios funcionales por medio del transplante de MSC después de la lesión del músculo esquelético.

50 Un aspecto adicional es que las MSC son capaces de regular a la baja la respuesta inmunitaria inflamatoria. Se ha demostrado en la técnica anterior que las MSC influyen en la secreción de numerosas citoquinas pro-inflamatorias e inhiben la formación de células dendríticas a partir de monocitos. Estos efectos han hecho uso de estudios clínicos frente a la enfermedad de injerto de contra anfitrión, donde se han administrado de manera sistémica MSC y han

5 resultado satisfactorias al mitigar la reacción. De este modo, son las propias propiedades de las MSC las que les permiten alterar la inflamación intramuscular. Otros mecanismos abordados de la terapia con MSC incluyen la transferencia de proteínas superficiales y otras proteínas desde las células transplantadas a las células del anfitrión. Por ejemplo se podría demostrar que las MSC son capaces de transferir antígenos leucocitarios humanos a otras células.

10 En un estudio reciente, el autor de la presente invención marcó MSCS con nanopartículas de óxido de hierro y realizó un seguimiento de las mismas in vivo por medio de formación de imágenes por resonancia magnética una semana después del trasplante al músculo sóleo lesionado. Las células transplantadas se pudieron detectar en la zona circunscrita durante un período de tres semanas. La migración de las MSC dentro del músculo no se produjo. Una posible explicación para tales descubrimientos fue que la ausencia de migración que se había encontrado se debía a la barrera natural de la fibrosis, que las células encuentran en ese momento. Sorprendentemente, cuando las MSC se transplantan inmediatamente después de la lesión, esta barrera a la migración celular no se encuentra presente, ya que el entrecruzamiento de la matriz extracelular se inicia de horas a días más tarde. El hematoma intramuscular se extiende por todo el músculo, creando unas condiciones previas óptimas para la distribución de las células transplantadas inmediatamente. El efecto sorprendente, de que las células de la presente invención transplantadas inmediatamente funcionan igual de bien en la regeneración muscular que las del trasplante retardado, a pesar del aumento de degeneración e inflamación que se encuentra presente poco después de la lesión, se potencia por el hecho inesperado de que la migración celular es favorecida inmediatamente después de la lesión muscular.

20 Por lo tanto es particularmente ventajoso, en una realización de la presente invención, administrar las MSC mediante aplicación local al músculo lesionado y/o al tejido sano que circunda la musculatura dañada, preferiblemente a una distancia entre 0,5 mm y 100 mm, preferiblemente entre 0,5 mm y 50 mm o más preferiblemente entre 0,5 mm y 20 mm del daño muscular. También está incluida en la invención la administración de células a una distancia de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, y/o 90 mm de la lesión muscular. La administración de MSC en estas regiones específicas que circundan la lesión muscular funciona en una combinación sinérgica con el sorprendente efecto de la mejora de la migración celular, que está presente inmediatamente después de la lesión, para facilitar el efecto regenerador de las MSC transplantadas. La administración de células en estos intervalos concretos en los momentos específicos descritos en la presente solicitud facilita el sorprendente efecto de que la curación de heridas y la regeneración funcional del músculo sean potenciadas más allá de lo que hubiera cabido esperar. Estos sitios de administración proporcionan mejoras significativas en la migración celular en comparación con la administración en otros sitios o a través de otros métodos.

35 La presente invención se refiere a la aplicación inmediata o rápida de MSC en el tratamiento del daño del músculo esquelético. La expresión referente a la aplicación de las MSC "en el plazo de 72 horas después del daño o lesión del músculo" hace referencia a la administración de MSC al paciente inmediatamente, por ejemplo en el plazo de un minuto o después de unos pocos minutos, hasta 72 horas después de la lesión. La invención se refiere a una aplicación preferida de MSC poco después de la lesión, en comparación con la aplicación de las MSC una semana después de la lesión de la técnica anterior. Por lo tanto, la aplicación de MSC después de 72 horas todavía representa una mejora significativa sobre el método de aplicación de la técnica anterior una semana después de la lesión. En una realización adicionalmente preferida las MSC se aplican en el plazo de 48 horas después de la lesión, o más preferiblemente en el plazo de 24 horas después de la lesión. En realizaciones adicionalmente preferidas, las MSC se aplican después de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 horas después de la lesión, o 14, 16, 18, 20 o 22 horas después de la lesión. Se prefiere una aplicación inmediata o rápida, tal como en el plazo de la primera hora después de la lesión, aunque, debido a que muchos pacientes permanecen bajo cuidados médicos, por ejemplo en hospitales, durante algún tiempo después de la lesión la administración de MSC hasta unos pocos días después de la lesión todavía representa una mejora significativa sobre el método de aplicación anterior después de una semana, lo que requiere una visita separada y el tratamiento del paciente por profesionales relevantes de la medicina .

El término "músculo esquelético" hace referencia a tejido muscular estriado bajo el control del sistema nervioso somático. Incluye todos los tipos de músculo al margen del músculo cardíaco y liso.

50 Según se utiliza en la presente memoria el término "composición farmacéutica" representa una composición que comprende una preparación de células madre mesenquimales y al menos un ingrediente que no es un ingrediente activo por medio de lo cual la composición puede ser utilizada de manera segura y eficaz como un producto para obtener o lograr un resultado deseado. El término "composición farmacéutica" según se utiliza en la presente memoria representa composiciones que resultan de la combinación de componentes individuales que son farmacéuticamente aceptables por sí mismos. Por ejemplo, cuando se prevé la administración intravenosa, los componentes son adecuados o aceptables (tanto en calidad como en cantidad) para la administración intravenosa. El sujeto de la administración de las MSC de acuerdo con la presente invención es un mamífero. Las células madre mesenquimales de la presente invención se pueden administrar a mamíferos, preferiblemente seres humanos o ganado, por diversas vías, tales como intravenosamente, intraarterialmente o intramuscularmente. La dosis administrada puede ser de entre aproximadamente  $10^3$  y aproximadamente  $10^{11}$  células por dosis, preferiblemente entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^{10}$  MSC/kg de peso corporal o entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^9$  MSC/kg de peso corporal, u otras cantidades que los expertos normales en la técnica consideran que son terapéuticamente eficaces como terapia para potenciar la regeneración muscular.



La descripción presentada en la presente memoria está dirigida a una composición farmacéutica que puede ser administrada por medio de una variedad de vías incluyendo intravenosamente, intraarterialmente, intramuscularmente o directamente a o sobre el individuo afectado. Cuando el medicamento es suministrado por medio de una inyección, la inyección de la composición de células madre mesenquimales puede producirse en forma de una única inyección o de múltiples inyecciones en cualquier localización dentro o fuera del organismo. La dosis se administra a un sujeto en donde la cantidad de preparación de células madre mesenquimales suministrada al sujeto a partir del medicamento es aproximadamente aquella que es terapéuticamente eficaz para tratar el daño de la musculatura esquelética. Adicionalmente, el medicamento puede incluir opcionalmente componentes adicionales tales como sales, estabilizadores y antimicrobianos. El medicamento de la presente invención contiene una preparación de células madre mesenquimales y un portador farmacéuticamente aceptable. La cantidad y la naturaleza de las células madre mesenquimales que se van a incorporar a la composición variarán dependiendo del efecto terapéutico deseado y del lapso de tiempo durante el cual la composición va a proporcionar un efecto terapéutico. La cantidad de células madre mesenquimales en el medicamento es aquella que suministrará una cantidad terapéuticamente eficaz para el tratamiento del daño de la musculatura esquelética. Por supuesto, la concentración y el carácter de las células madre mesenquimales que se van a incluir en el medicamento variarán dependiendo de los componentes utilizados en la composición, de la ruta por la cual se administren, de los síntomas y detalles del daño muscular que requiere tratamiento, así como de otros factores conocidos por los expertos en la técnica.

### Descripción de las figuras

La invención se describe adicionalmente por medio de figuras. Éstas no están destinadas a limitar el alcance de la invención.

#### Breve descripción de las Figuras

Fig 1: Una representación esquemática del transcurso de la regeneración fisiológica después de la lesión del músculo esquelético.

Fig 2: Barridos de resonancia magnética ponderada en T1 y T2 de la extremidad inferior izquierda de una rata del grupo 3 un día después de la lesión por aplastamiento.

Fig 3: Regeneración funcional de músculo lesionado medida mediante fuerzas de contracción por sacudida utilizando un dispositivo para medir la fuerza del músculo.

Fig 4: Regeneración funcional de músculo lesionado medida mediante fuerzas de contracción tetánica utilizando un dispositivo para medir la fuerza del músculo.

Fig 5: Rastreo de MSC marcadas con Proteína Fluorescente Verde (GFP).

#### Descripción detallada de las figuras

Fig. 1: Transcurso de la regeneración fisiológica. El transcurso natural después de la lesión muscular esquelética como se entiende actualmente, se inicia por una fase inflamatoria, que está determinada por la invasión de neutrófilos y más tarde macrófagos, implicando también potencialmente degeneración. La presencia de células inflamatorias dentro del tejido se inicia inmediatamente después de la lesión y se prolonga hasta varias semanas. La fase regenerativa continúa, seguida con posterioridad de fibrosis. Las dos flechas indican en un sentido esquemático los momentos específicos de aplicación temprana (inmediata) y retardada 1 semana para las MSC transplantadas.

Fig. 2: Barrido de resonancia magnética ponderada en T1 y T2 de la extremidad inferior izquierda de una rata del grupo 3 un día después de la lesión por aplastamiento para ilustrar el trauma muscular único selectivo. El trauma muscular se llevó a cabo como se describe más abajo en los ejemplos.

Fig. 3: Regeneración funcional de músculo lesionado medida mediante fuerzas de contracción por sacudida utilizando un dispositivo de medición de la fuerza del músculo. El trasplante de MSC una semana después del trauma mejoró la regeneración funcional de los músculos lesionados como se muestra por unas fuerzas de contracción significativamente superiores en el grupo 2. El trasplante local del mismo número de MSC inmediatamente después de la lesión por aplastamiento pudo potenciar el proceso de regeneración en un grado similar con un incremento de fuerzas de contracción por sacudida máximas en torno a 73,3 % en comparación con el grupo de control.

Fig. 4: Regeneración funcional de músculo lesionado medido por las fuerzas de contracción tetánica utilizando un dispositivo de medida de la fuerza del músculo. El trasplante de las MSC una semana después del trauma mejoró la regeneración funcional de los músculos lesionados como se ha mostrado por las fuerzas de contracción significativamente mayores en el grupo 2. El trasplante local del mismo número de MSC inmediatamente después de la lesión por aplastamiento pudo potenciar el proceso de regeneración en un grado similar con un incremento de las fuerzas de contracción tetánica máximas en 49,6 % en comparación con el grupo de control.

Fig 5: Rastreo de MSC marcadas con Proteína Fluorescente Verde (GFP). A: Sección con azul de metileno 3 días después del trasplante inmediato que muestra las MSC en el tejido conectivo intersticial entre las miofibras en regeneración. B: Sección H&E emparejada de un músculo tratado con MSC transplantadas inmediatamente después del trauma y explantadas 4 semanas después del trasplante mostrando grupos de GFP+ MSC entre las miofibras maduras. C y D: Secciones H&E representativas de músculo sóleo explantado 3 días después del trasplante. Las marcas reticuladas y las flechas indican las zonas donde se encontraban las reservas de GFP+ MSC en los músculos. (C: trasplante inmediato, D: retardado). En los músculos transplantados inmediatamente las células se encontraron en grupos más pequeños y distribuidas en una zona más grande que en los músculos con trasplante retardado, donde las células se encontraron principalmente en torno al rastro de la aguja.

## 10 Ejemplos

La invención se describe adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos. No se pretende que estos limiten el alcance de la invención.

Los ejemplos experimentales se refieren al tratamiento de ratas con trauma en el músculo esquelético. Las ratas representan un modelo de mamífero, utilizado para demostrar la invención a modo de ejemplo. También se pueden tratar otros mamíferos, tales como animales y seres humanos mediante el método de la presente invención.

Se tomaron aspiraciones de médula ósea de ambas tibias de cada animal y se obtuvieron cultivos de MSC autólogos del material (como se describe más abajo). Dos semanas más tarde, los animales se separaron en tres grupos (cada n=9) y los músculos sóleos izquierdos se aplastaron sin delicadeza. En el grupo 1 se transplantaron  $2 \times 10^6$  MSC al músculo lesionado inmediatamente después del trauma, mientras que el grupo 2 y 3 recibieron una inyección de solución salina. Otra semana más tarde, se transplantaron los músculos sóleos izquierdos del grupo 2 con el mismo número de MSC. Los grupos 1 y 3 recibieron un tratamiento simulado con aplicación de solución salina de una manera idéntica. La prueba del músculo funcional *In vivo* se realizó tres semanas después del trasplante para cuantificar la regeneración muscular.

Se utilizaron los siguientes métodos para llevar a cabo la presente invención como se demuestra en los ejemplos. Se pretende que estos describan adicionalmente la invención a modo de ejemplo práctico y no representen una descripción limitante de la invención.

### Animales

Se utilizaron sesenta ratas Sprague Dawley hembra que pesaban 140 - 160 g (Charles River, Sulzbach, Alemania) para llevar a cabo los ejemplos descritos más abajo. Los animales se alojaron a una temperatura constante de 25°C con libre acceso a alimento granulado y agua. Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las políticas y los principios establecidos por el Animal Welfare Act, la NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals y las pautas nacionales de bienestar animal. El estudio fue aprobado por el representante legal local (Oficina estatal para la protección en el trabajo, la protección de la salud y la seguridad técnica, Berlín: Reg 0290/09).

### 35 Biopsias de médula ósea y cultivo celular

Las ratas se anestesiaron mediante inhalación de isoflurano (flujo de 2%) y N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub>. Se inyectó subcutáneamente Rimadyl a 5 mg/kg de peso corporal antes de todos los procedimientos quirúrgicos. Se afeitaron las rodillas bilateralmente y se desinfectaron con povidona yodada. Se realizó una incisión longitudinal de 5 mm medialmente del tubérculo tibial. El hueso cortical se abrió utilizando un taladro manual de 1 mm. A través de esta ventana se aspiró la médula ósea dos veces con una cánula de calibre 18 y se almacenó en 10 ml de medio de cultivo (DMEM + FCS al 10% + penicilina + estreptomina, Sigma, Deisenhofen, Alemania). Las heridas se cerraron en una capa.

Las suspensiones celulares se centrifugaron (250 g, 10 min), se re-suspendieron en medio de cultivo (DMEM + FCS al 10% + penicilina + estreptomina, Sigma) y se sembraron en matraces de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (Falcon, Heidelberg, Alemania). El medio de cultivo se renovó a intervalos de dos días. A una confluencia de aproximadamente 60% de la capa celular, las células se transfirieron a matraces de cultivo de tejidos de 300 cm<sup>2</sup> utilizando tripsina al 0,25% (Sigma) y se cultivaron durante dos pases más.

### Caracterización de MSC

El análisis FACS de las proteínas marcadoras superficiales de las células cultivadas mostró un patrón de expresión característico para células madre mesenquimales (CD44+, CD73+, CD90+ y CD45-). Se utilizaron los siguientes anticuerpos: ratón ( $\alpha$ -CD44 de rata) (Serotec, Duesseldorf, Alemania), ratón ( $\alpha$ -CD45 de rata) y ratón ( $\alpha$ -CD90 de rata) (Acris Antibodies, Hiddenhausen, Alemania), ratón ( $\alpha$ -CD73 de rata) y rata ( $\alpha$ -IgG de ratón) (BD Biosciences, Heidelberg, Alemania). Además, los ensayos de MSC de rutina con un cultivo de las células en medios osteogénicos y adipogénicos demostraron una diferenciación completa potencial a estos linajes. El medio osteogénico (MO) consistió en medio de cultivo con un suplemento de ácido ascórbico 200  $\mu$ M,  $\beta$ -glicerolfosfato 7 mM y dexametasona 0,01  $\mu$ M. El medio adipogénico consistió en medio de cultivo con un suplemento de dexametasona 1  $\mu$ M, insulina 2  $\mu$ M, indometacina 200  $\mu$ M e isobutilmetilxantina 500  $\mu$ M.

## Trauma del músculo esquelético

Las ratas se anestesiaron como se ha descrito anteriormente. La pata izquierda se afeitó y se desinfectó. Se realizó una lesión abierta por aplastamiento del músculo sóleo como se ha descrito anteriormente. En resumen el músculo sóleo se diseccionó cranealmente y caudalmente hasta las estructuras neurovasculares y se aplastó el músculo con unas pinzas curvas para arterias (Aesculap, Tuttlingen, Alemania), cuyas mandíbulas se protegieron por medio de tubos de polietileno (Braun, Alemania) para evitar lesiones de la fascia. Las pinzas se introdujeron por lo tanto de manera distal directamente a continuación del tendón de Aquiles y se cerraron durante 20 segundos. Este procedimiento se repitió proximalmente 2 veces siempre en continuidad directa con el respectivo aplastamiento distal. Se evitó la inserción del haz neurovascular y se realizaron 2 aplastamientos proximalmente en esta zona de la manera descrita anteriormente. La Figura 2 muestra un barrido de resonancia magnética ponderado en T1 y T2 de la extremidad inferior izquierda de una rata del grupo 3 un día después de la lesión por aplastamiento para ilustrar el trauma muscular individual selectivo.

## Transplante de MSC e inyecciones simuladas

Las células se desprendieron utilizando tripsina al 0,25%, centrifugaron, se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendieron en 20 µl de solución salina al 0,9%. Se inyectaron 2 x 10<sup>6</sup> MSC en el músculo sóleo a través de una cánula de calibre 25 o bien inmediatamente (grupo 1) o bien 7 días después del trauma (grupo 2). Los animales del grupo 3 (grupo de control) y los del grupo 1 recibieron una inyección de 20 µl de solución salina en el músculo traumatizado 7 días después del trauma. Para las inyecciones las heridas se volvieron a abrir distalmente para identificar de modo seguro el músculo sóleo para el transplante.

## 20 Evaluación biomecánica

Los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de cetamina (50/mg/ml) y medetomidina (1mg/ml) 4:1 adaptados al peso después de la narcosis con isoflurano inicial y el nervio ciático y el músculo sóleo se expusieron conservando todas las demás estructuras neurovasculares. El procedimiento se realizó primero en la pata derecha seguido de la pata izquierda después de la primera medición. El tendón del músculo sóleo se separó del tendón de Aquiles. La extremidad inferior se fijó al dispositivo de medida de fuerza del músculo (Experimetria, Budapest, Hungría). El tendón del músculo sóleo se conectó al transductor de fuerza a través de una sutura (4-0, seda) y el músculo se estiró a su longitud de referencia, que es la longitud a la que se logra la máxima tensión de sacudida por medio de un único estímulo supramáximo, ajustando la tensión previa del músculo a 0,15 N. La tensión necesaria para alcanzar la longitud de referencia de los músculos sóleos de las ratas se determinó en experimentos anteriores. Con posterioridad se estimuló el nervio ciático de manera bipolar de dos modos diferentes. En el modo de sacudida rápida se utilizaron 6 pulsos a 9 mA/75 Hz con una duración de 0,1 s e intervalos de 5 s. Después de esto, se evaluó la resistencia muscular máxima por medio de períodos de estimulación ciática de 3 s a 9 mA/75 Hz durante 6 veces con intervalos de 5 s, alcanzando la tetania en todos los casos.

Los animales se sacrificaron por medio de una sobredosis intraperitoneal de anestésico después de la cuantificación de la resistencia del músculo. Las fuerzas de contracción muscular bajo sacudida rápida y tetánica se normalizaron individualmente para el músculo sóleo derecho no lesionado.

## Análisis estadístico

La media aritmética y la desviación típica se determinaron para cada magnitud. Se realizó un análisis de significación estadística utilizando la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras dependientes cuando se comparan magnitudes intra-individualmente. Se utilizó la prueba de la U de Mann-Whitney no paramétrica para muestras independientes para las comparaciones entre el grupo de tratamiento y el de control. El nivel de significación se ajustó a 0,05.

## Marcaje con GFP

Se cultivaron 3 x 10<sup>6</sup> células HEK 293 durante la noche en una placa de cultivo celular en 9 ml de Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, USA) con suero fetal de ternera (FCS, Biochrom AG, Berlin, Alemania) hasta alcanzar una confluencia de 50-70%. Al día siguiente se diluyó una mezcla de 20 µl de plásmido de empaquetamiento y 2 µg de constructo de expresión de Cop-GFP (ambos de System Biosciences, Mountain View, USA) en 400 µl de DMEM sin FCS ni antibióticos. Se diluyeron 30 µl de reactivo Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, USA) en 400 µl de DMEM sin suero, se añadieron a la solución mixta de plásmido y se incubaron a la temperatura ambiente durante 20 minutos.

El constructo de plásmido/reactivo de Lipofectamine se añadió gota a gota al cultivo de células HEK293 y se incubó a 37°C durante 48 horas. El sobrenadante se recogió 48 horas después de la transfección y se filtró con un filtro de 0,45 µm. El pseudovirus producido se utilizó para la transducción o se almacenó a -80°C.

Se sembraron 1,5 x 10<sup>6</sup> MSC diana en un matraz para el cultivo celular T175 y se cultivaron durante la noche. Las MSC diana se infectaron añadiendo 5 ml del pseudovirus, 10 ml de DMEM con FCS y 15 µl de sulfato de protamina y se incubaron a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%. Después de 24 horas, se procedió al cambio de medio por DMEM con suero

y antibióticos (penicilina, estreptomina, Sigma, Taufkirchen, Alemania). Las células diana infectadas se cultivaron adicionalmente y se analizaron a los 6 días de la transducción para la expresión utilizando FACS y microscopía de fluorescencia. La eficacia de transducción alcanzó al menos 85% en todos los casos. El día 7 después de la transducción las MSC se lavaron con PBS, se desprendieron con 2,5 ml de tripsina, se cosecharon en DMEM, se centrifugaron y se transplantaron en 20  $\mu$ l de solución salina.

#### Análisis histológico

Las ratas se anestesiaron por medio de inyección intraperitoneal como se ha descrito anteriormente y se explantaron los músculos sóleos. Los animales se sacrificaron por medio de una sobredosis intraperitoneal de anestésico. Los músculos explantados 4 semanas después del trauma se fijaron en paraformaldehído al 4%, se deshidrataron, se incluyeron en parafina y se seccionaron longitudinalmente (4  $\mu$ m).

Para la evaluación del tejido conectivo, se incubaron secciones desparafinadas y re-hidratadas durante 60 minutos en solución Sirius Red. Para ello, se disolvieron 5 g de Sirius Red en 500 ml de ácido pícrico saturado (Fluka/Riedel de Häen, Seelze, Alemania). La diferenciación se alcanzó mediante dos lavados con ácido acético diluido. Finalmente, se llevó a cabo una deshidratación corta en alcoholes graduados.

Un investigador ciego evaluó la cantidad de tejido conectivo colagenoso en los músculos. Con el fin de medir el área total de endo-fibrosis y fibrosis perimisial, se recogieron imágenes de secciones longitudinales completas del músculo desde el tendón distal al proximal utilizando un microscopio óptico Leica DMRB (Leica, Wetzlar, Alemania) y una cámara digital (AxioCam MRc, Carl Zeiss, Göttingen, Alemania). Las imágenes se correlacionaron y se conectaron para obtener las secciones longitudinales completas con la ayuda del programa Axio Vision (Rel. 4.4, Carl Zeiss, Göttingen, Alemania). Estos cuadros de los compuestos se editaron a continuación con un sistema de análisis de imágenes (KS 400 3.0, Carl Zeiss, Göttingen, Alemania).

Las estructuras tendinosas fueron retiradas por el investigador y se midió el área absoluta de tejido conectivo de color rojo y se normalizaron para la zona del músculo total. Para el análisis de la densidad de los vasos se utilizó una tinción inmunohistoquímica contra alfa-Actina de Músculo Liso (SMA). Se contaron los vasos arteriales y venosos con un diámetro por debajo y por encima de 40  $\mu$ m. Se utilizó la tinción H & E para el análisis descriptivo del trauma. Los músculos explantados el día 3 después del trasplante con GFP+-MSC se congelaron inmediatamente en 2-metilbutano enfriado con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80° C hasta el procesamiento adicional. Se obtuvieron secciones longitudinales de 6  $\mu$ m a partir de los especímenes y se tiñeron con H&E o DAPI, sirviendo como contratinción nuclear.

#### Ejemplo 1: Resultados del ensayo de músculo funcional in vivo

La estimulación por sacudida rápida de los músculos sóleos derechos sanos de todos los animales dio como resultado una fuerza de contracción media de  $0,52 \pm 0,14$  N. No se observó un descenso de los picos de contracción sucesivos en los músculos no lesionados o lesionados con independencia del tratamiento. La estimulación con 9 mA y una frecuencia de 75 Hz a una duración de 3 segundos produjo contracciones tetánicas en todos los músculos sometidos a ensayo reflejando su capacidad de contracción máxima. La última ascendió a  $0,98 \pm 0,27$  N en los músculos sóleos no lesionados. Los máximos tetánicos mostraron un descenso lineal, continuo con sucesivas estimulaciones en todos los músculos. Este descenso podía ser descrito por un gradiente de reducción, que era significativamente diferente entre los músculos sóleos izquierdos traumatizados y los derechos no traumatizados [ $-0,015 \pm 0,009$  (izquierdo) vs.  $0,031 \pm 0,014$  (derecho), valor de  $p < 0,001$ ]. La reducción de las contracciones tetánicas no resultó influenciada por la terapia celular.

La razón de las fuerzas de sacudida rápida y tetánica representa la reserva de contracción de un músculo que excede una única sacudida. A las 4 semanas del trauma esta razón mostró una diferencia significativa entre los músculos traumatizados y sanos con un valor medio de  $0,80 \pm 0,12$  (izquierdo) y  $0,54 \pm 0,15$  (derecho,  $p < 0,001$ ). No se pudo observar ninguna diferencia entre las razones de sacudida/tétano de los grupos de tratamiento y de control.

Las fuerzas de contracción máxima después de la estimulación por sacudida se redujeron a  $39 \pm 18\%$  del lado derecho de control no lesionado después del trauma por aplastamiento de los músculos sóleos medidas en el grupo 3. La estimulación tetánica reveló una reducción de la capacidad de contracción máxima de  $72 \pm 12\%$  del valor obtenido de los músculos de control interno intactos. El trasplante de  $2 \times 10^6$  MSC una semana después del trauma mejoró la regeneración funcional de los músculos lesionados como muestran las fuerzas de contracción significativamente superiores en el grupo 2 (sacudida:  $p = 0,014$ , tetania:  $p = 0,018$ ), como se muestra en las Figuras 3 y 4. El trasplante local del mismo número de MSC inmediatamente después de la lesión por aplastamiento fue capaz de potenciar el proceso de regeneración en un grado similar con un incremento de las fuerzas máximas de contracción por sacudida en  $73,3\%$  ( $p = 0,006$ ) y de las fuerzas máximas de contracción tetánica en  $49,6\%$  ( $p = 0,037$ ) en comparación con el grupo de control. Una comparación de las fuerzas de contracción entre los músculos tratados mediante el trasplante inmediato y retardado mostró una diferencia no significativa entre los grupos con valores de  $p$  de  $0,93$  (sacudida rápida) y  $0,73$  (tetania).

Las razones de sacudida/tétano, que describen la capacidad de contracción de reserva de un músculo, no fueron alteradas por la terapia con MSC cuando se compararon con el control. Mientras un músculo sóleo de rata sano es capaz de casi duplicar su fuerza de contracción cuando es estimulado con pulsos repetitivos en el modo de tetánico, los músculos lesionados solamente muestran una reserva de 25% de su fuerza de sacudida. En vista de las fuerzas significativamente e igualmente superiores en los grupos con terapia bajo los modos de estimulación por sacudida y tetánica, se puede suponer que el trasplante de MSC daba como resultado un incremento en la sustancia muscular contráctil en lugar de en la modulación de los procesos electrofisiológicos, como un modo de facilitar la fuerza - desarrollo del músculo.

#### Ejemplo 2: Resultados del análisis histológico

10 Las tinciones H&E de los músculos cosechados 3 días después de la lesión todavía mostraron una reacción inflamatoria pronunciada en todo el sóleo con infiltración de macrófagos predominantemente, pero también de neutrófilos y linfocitos. La mayor parte de las miofibras necróticas ya habían sido retiradas y se pudieron observar múltiples grupos de fibras centronucleadas en regeneración rodeadas por tejido conectivo flojo con la infiltración inflamatoria descrita anteriormente. En los músculos cosechados 10 días después de la lesión por aplastamiento la reacción inflamatoria casi había desaparecido. El tejido conectivo mostró una condensación hacia un tipo más denso, aunque todavía con núcleos fibroblásticos activos. Tres días después del trasplante tanto inmediato como retardado, se pudieron observar grupos de GFP+ MSC o de MSC individuales en los músculos sóleos crioseccionados. Se pueden observar cuadros representativos en las Figuras 5A y B. Las MSC transplantadas se encontraron predominantemente en el intersticio de los músculos, unas pocas células también en el tejido conectivo bajo la fascia muscular. Como se esperaba, el perfil de distribución de GFP+-MSC en los músculos de los dos grupos de tratamiento difería hasta cierto punto, con grupos de MSC más discriminables en los animales transplantados inmediatamente después de la lesión en comparación con los animales transplantados 7 días después del trauma y con una zona más grande cubierta por las MSC en las secciones (Fig. 5C y D). Las MSC también se encontraron en las proximidades de los vasos sanguíneos, los nervios y las miofibras.

25 En ambos grupos de tratamiento, trasplante inmediato y retardado, también se pudieron detectar GFP+-MSC en los músculos explantados cuatro semanas después del trauma, aunque en un grado menor. De manera interesante, en los músculos después del trasplante retardado solamente se pudieron detectar muy pocas GFP+-MSC, mientras en los músculos transplantados inmediatamente todavía se pudieron encontrar como pequeños grupos en una o dos zonas circunscritas del músculo. Las GFP+-MSC no se encontraron en el tejido cicatrizal excepto entre las fibras musculares regeneradas en el compartimento intersticial.

35 No se pudo observar ninguna diferencia significativa entre los grupos de tratamiento y el grupo de control en lo que se refiere a la proporción de tejido fibrótico colagenoso en los músculos 4 semanas después de la lesión. También se midió el número de vasos sanguíneos con diámetros por encima y por debajo de 40  $\mu\text{m}$  a las 4 semanas. Como es habitual para este patrón de lesión, el número de vasos pequeños aumentó significativamente en todos los músculos lesionados. El número de vasos sanguíneos con diámetros por encima de 40  $\mu\text{m}$  permaneció constante. Se pudo observar una reducción significativa de los vasos sanguíneos pequeños con respecto a los músculo de control lesionados después del trasplante inmediato (21,4 vasos/ $\text{mm}^2$  (control) vs. 18,5 vasos/ $\text{mm}^2$  (inmediato), valor de  $p = 0,045$ ). Dada la base de 11,1 vasos pequeños por  $\text{mm}^2$  en el sóleo no lesionado, esto representa una reducción de 21% de los vasos pequeños adicionales después de la lesión.

40 En el modelo de lesión presentado, el suministro de sangre al músculo se ha conservado con el fin de evitar condiciones isquémicas graves en el músculo. Por supuesto, también debido a la lesión de los vasos sanguíneos intramusculares, tuvo lugar una vasculogénesis post-traumática, reflejada por un incremento en los vasos sanguíneos de pequeño tamaño, pero obviamente las células transplantadas no recibieron un desencadenante hipóxico para la secreción de factores angiogénicos. Por el contrario, los datos mostraron que - al menos después del trasplante inmediato - era necesario un suministro de sangre menor para lograr la mejora de las fuerzas de contracción.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Células madre mesenquimales (MSC) para su uso para el tratamiento del daño o lesión del músculo esquelético; para potenciar la recuperación funcional y/o la regeneración estructural del daño o lesión del músculo esquelético; o para reducir el dolor asociado con dicha lesión muscular, en donde dichas MSC son MSC alogénicas, en donde dichas MSC se van a administrar localmente al músculo lesionado y/o al tejido sano que rodea la musculatura dañada, y por medio de lo cual el tratamiento con dichas MSC se produce en el plazo de 72 horas, preferiblemente en el plazo de 48 horas, más preferiblemente en el plazo de 24 horas o más preferiblemente en el plazo de 12 horas, después del daño o la lesión del músculo.
- 10 2. Células madre mesenquimales para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizadas porque las MSC se extraen de la placenta o son MSC de médula ósea, preferiblemente extraídas de médula ósea.
- 15 3. Células madre mesenquimales para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizadas porque las MSC de médula ósea se concentran por agotamiento de glóbulos rojos de un aspirado de médula ósea, preferiblemente utilizando el sistema Harvest SmartPreP 2, y se preparan en forma de fracción de células nucleares de la muestra de médula ósea.
- 20 4. Células madre mesenquimales para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque las MSC se expanden utilizando el cultivo celular in vitro.
- 25 5. Células madre mesenquimales para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, por medio de lo cual el tratamiento con dichas MSC se produce 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 horas después de dicha lesión, o 14, 16, 18, 20 o 22 horas después de dicha lesión.
- 30 6. Células madre mesenquimales para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque
  - a) la lesión del músculo esquelético que se va a tratar es una lesión provocada durante el remplazo de la cadera, durante la cirugía de la columna vertebral, una lesión muscular provocada en asociación con lesiones por manguitos giratorios y/o lesiones traumáticas de tejidos blandos con lesiones de músculo esquelético concomitantes; y/o
  - 35 b) el daño o la lesión del músculo que se van a tratar se seleccionan del grupo que comprende trauma directo, laceración, abrasión, moretones, lesión por aplastamiento, lesión por contusión de impacto corto o largo, desgarramiento, distensión y/o esguince preferiblemente seleccionado del grupo que comprende lesión por contusión de corto o largo impacto, lesión por aplastamiento, laceración, distensión, y más preferiblemente se seleccionan del grupo que comprende laceración muscular, lesión muscular provocada por corte o disección de, o incisión quirúrgica en, músculo esquelético, tales como las lesiones musculares que se producen durante una operación o intervención quirúrgica, también conocida como miotomía, lesiones deportivas, tales como músculos desgarrados o fibras musculares desgarradas, y/o lesiones que se producen a partir de músculos elongados o sobre-elongados y/o lesiones provocadas durante cirugía u operación en torno a la médula espinal y/o la columna vertebral, además de roturas por manguitos giratorios.
- 40 7. Células madre mesenquimales para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque las MSC se seleccionan y se aíslan utilizando la adherencia a plástico, separación celular por FACS y/o MACS.
- 45 8. Células madre mesenquimales para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas por los marcadores CD44+, CD73+, CD90+ y/o CD45-.
- 50 9. Células madre mesenquimales para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque
  - los marcadores CD105, CD73 y/o CD90 son positivos ( $\geq 95\%$ ), y
  - los marcadores CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19, y/o HLA-DR son negativos ( $\leq 2\%$ ).
- 55 10. Células madre mesenquimales para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque las MSC se van a administrar
  - a) localmente al músculo lesionado y/o al tejido sano que rodea la musculatura dañada a una distancia de 0,5 mm a 100 mm, preferiblemente entre 0,5 mm y 50 mm o más preferiblemente entre 0,5 mm y 20 mm del daño muscular; y/o
  - b) por medio de inyección.
- 60 11. Células madre mesenquimales para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque la cantidad terapéuticamente eficaz de MSC que se va a administrar está entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^{10}$  MSC/kg de peso corporal.

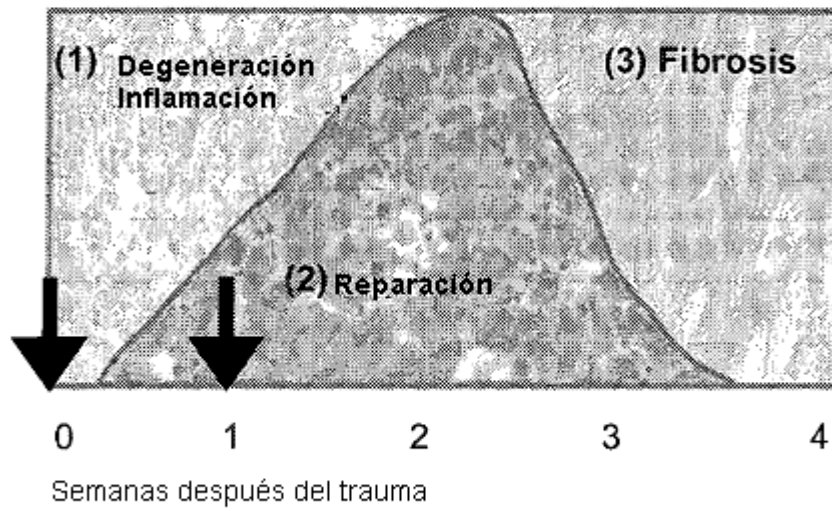
12. Células madre mesenquimales para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque las MSC están presentes en una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de MSC además de al menos una sustancia farmacéuticamente aceptable.

5 13. Células madre mesenquimales para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque las MSC están modificadas genéticamente.

14. Células madre mesenquimales para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque las MSC han sido conectadas o acopladas a proteínas u otras sustancias in vitro con el fin de influir en el proceso de regeneración o inflamatorio.

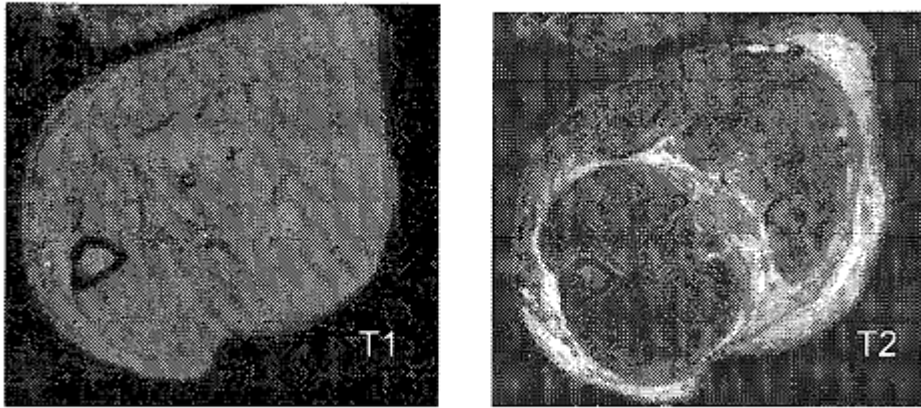
**Fig. 1**

Transcurso de la regeneración fisiológica





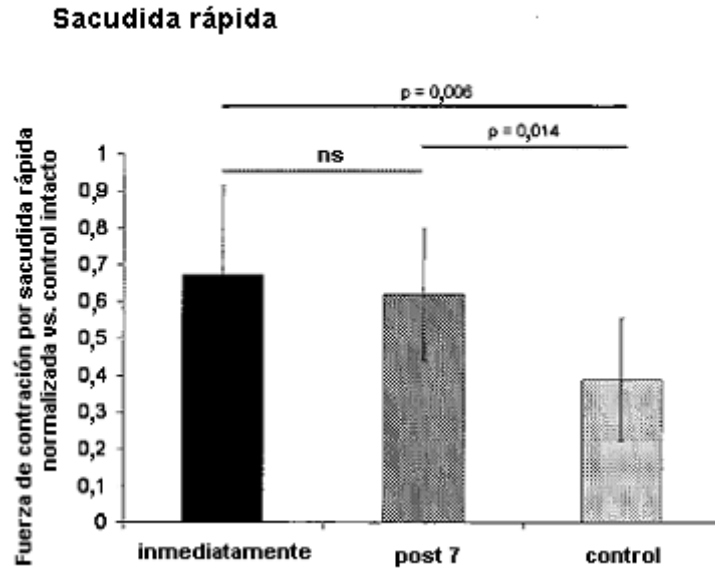
**Fig. 2**



**7 MRI Tesla**

**1 semana después del trauma**

**Fig. 3**



**Fig. 4**

**Tetania**

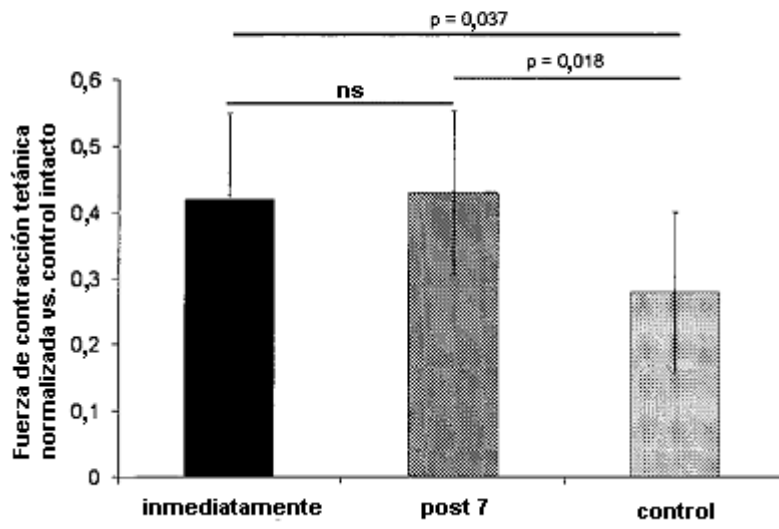


Fig. 5

