(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 573 354**

(21) Número de solicitud: 201431630

(51) Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)
A61K 35/28 (2015.01)
A61P 19/02 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

06.11.2014

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

07.06.2016

(56) Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070797

(71) Solicitantes:

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (25.0%)
Avda de la Constitución, 18
41092 Sevilla ES y
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA (75.0%)

(72) Inventor/es:

MUÑOZ CASTAÑEDA, Juan Rafael;
DÍAZ TOCADOS, Juan Manuel y
DOMÍNGUEZ PÉREZ, Juan Manuel

(74) Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

(54) Título: **Lisados de células madre mesenquimales para el tratamiento de lesiones músculo esqueléticas**

(57) Resumen:

La presente invención describe el uso del contenido intracelular de células madre mesenquimales en individuos para estimular la supervivencia, regeneración y/o reparación del órgano y/o tejido dañado. Además, la presente invención también describe el uso de este lisado para la elaboración de una composición farmacéutica que comprenda dicho contenido intracelular, y su uso en la regeneración y/o reparación del órgano y/o tejido dañado.

ES 2 573 354 A1

DESCRIPCIÓN

Lisados de células madre mesenquimales para el tratamiento de lesiones musculo esqueléticas

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología y la medicina, y se refiere al uso del contenido intracelular de células madre mesenquimales humanas (MSC) en la elaboración de un medicamento para la regeneración celular, tisular y de órganos. Preferiblemente, se refiere al uso del contenido intracelular de células madre mesenquimales humanas (MSCs) en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de lesiones músculo-esqueléticas, y preferiblemente para el tratamiento de la osteoartrosis.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La administración de células madre mesenquimales en un organismo, tiene numerosos problemas. Cuando las células administradas proceden del mismo individuo, es decir, trasplante autólogo, los principales problemas están relacionados con el manejo de las mismas y con la optimización de la dosis. Además, las células pueden presentar difícil control y existe la posibilidad de generar otros problemas, por ejemplo la generación de tumores (Koh y Kang, 2012. *EMBO Rep.*, 13(5): 412–422)

Por otro lado, cuando las células administradas proceden de otro individuo, es decir, trasplante alogénico, aparecen problemas asociados a la compatibilidad y durante el proceso de inmunosupresión del receptor. Las MSCs tienen propiedades inmunomoduladoras por lo que están indicadas para prevenir y reducir el rechazo. Sin embargo el uso o la terapia con este tipo de células ha sido relacionado con la formación de tumores (Mishra *et al.*, 2008. *Cancer Research* 68 (11), 4331–4339).

Parte de los efectos desencadenados por las MSCs se deben a las interacciones célula-célula promovidas por las proteínas de membrana. A través de la sonicación celular es posible lisar las MSC y tras una centrifugación obtener el contenido intracelular desprovisto de proteínas de membrana. El uso exclusivo del contenido intracelular de las células madre mesenquimales, podría ayudar a evitar estos problemas.

Se conoce que la enfermedad articular degenerativa u osteoartritis es una patología articular de tipo crónico con una alta incidencia en mamíferos. Se trata de un proceso degenerativo del cartílago articular. En la artrosis, este proceso se inicia a nivel del cartílago articular, involucrando en su desarrollo a todos los componentes de la articulación. Su etiología es multifactorial interviniendo factores genéticos, metabólicos, físicos, etc.

El tratamiento de la osteoartritis varía de acuerdo a la gravedad de los síntomas y se centra en disminuir el dolor y mejorar el movimiento de la articulación. Los tratamientos consisten fundamentalmente en:

- Planes que combinan fármacos, descanso, actividad física, protección de las articulaciones, uso de calor o frío para reducir el dolor y terapia física u ocupacional.
- Reducción de peso
- Empleo de medicamentos como acetaminofeno o antiinflamatorios no esteroides (AINE) para ayudar a aliviar el dolor, la rigidez y la hinchazón articular.
- Actividad física para mantener las articulaciones flexibles y conservar o mejorar la fortaleza muscular
- Protección de las articulaciones para prevenir el daño o tensión en las articulaciones con dolor.
- Se pueden inyectar corticosteroides o derivados del ácido hialurónico en las articulaciones que no responden a otros tratamientos.
- Suplementos dietéticos como glucosamina y condroitina han mostrado en ciertos estudios de rodilla que alivian el dolor y mejoran la función articular en la osteoartritis severa.
- Cirugía para osteoartritis avanzada asociada a daño articular y/o limitaciones patentes en la función de las articulaciones.

En animales las lesiones músculo-esqueléticas son tratadas con distintos tipos de medicamentos que intentan disminuir la inflamación y el dolor. Sin embargo cuando el proceso degenerativo avanza estos fármacos no son capaces de fomentar la movilidad ni de disminuir el dolor. Terapias como la infusión de células madre mesenquimales o el tratamiento con factores de crecimiento derivados de plaquetas son dos de las alternativas que actualmente están siendo evaluadas y en algún caso comercializadas, aunque su eficacia no está aún totalmente demostrada. En cualquier caso actualmente para la realización de estos tratamientos estas terapias necesitan de o bien una cirugía previa en el animal para extraer médula ósea o tejido adiposo o un ingreso previo para la extracción y formación de los factores. Respecto al tratamiento con factores no hay un consenso en el

protocolo de extracción y creación de estos factores derivados de plaquetas por lo que a menudo se justifican la disparidad de resultados.

Finalmente indicar que hoy en día no disponemos de evidencias suficientes que indiquen si las células madre ejercen un efecto beneficioso debido a una diferenciación hacia el tipo celular del órgano dañado o por el contrario el efecto está mediado por las citoquinas y factores que actúan sobre las células residentes de forma paracrina. El efecto positivo encontrado con la aplicación de lisados de MSC revela que las acciones paracrinas son muy potentes y efectivas. De esta manera la invención de entregar este concentrado en la zona dañada acelera la regeneración debido a que incrementaría la biodisponibiidad de las moléculas necesarias para regenerar el tejido.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso del contenido intracelular de al menos una célula madre mesenquimal aislada en la elaboración de un medicamento para la prevención, el alivio o el tratamiento de lesiones musculo-esqueléticas, o alternativamente, al contenido intracelular de al menos una célula madre mesenquimal aislada para su uso en la prevención, el alivio o el tratamiento de lesiones musculo-esqueléticas.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la lesión músculo-esquelética se selecciona de la lista: osteoartrosis, síndrome de tensión cervical, síndrome cervical, tortícolis, hombro congelado, epicondilitis o codo de tenista, epitrocleitis o codo de golfista, síndrome del pronador redondo, síndrome de túnel radial, tenosinovitis del extensor, bursitis del codo, síndrome de DeQuervain, síndrome del túnel carpiano, síndrome de Guyon, dedo en maza, contractura de Dupuyten, síndrome del escribiente, hernia discal, fractura vertebral, dorsalgia, lumbalgia aguda, lumbalgia crónica, lumbago agudo, lumbo-ciatoalgias, cifosis, rodilla de fregona, tendinitis del tendón de Aquiles, contusiones, desgarros musculares, esguinces, luxaciones y fracturas.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la lesión es la osteoartrosis.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la célula madre mesenquimal aislada es una célula de mamífero. En otra realización preferida es una célula mesenquimal de un perro. En otra realización preferida es una célula mesenquimal de un caballo. En otra realización preferida es una célula mesenquimal de un humano.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la célula o células madre mesenquimales aisladas procede del mismo individuo al que se va administrar el contenido intracelular.

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere al uso de una composición que comprende contenido intracelular de al menos una célula madre mesenquimal, en la elaboración de un medicamento para la prevención, el alivio o el tratamiento de lesiones musculo-esqueléticas, o alternativamente a una composición que comprende contenido intracelular de al menos una célula madre mesenquimal para su uso en la prevención, el alivio o el tratamiento de lesiones músculo-esqueléticas.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la lesión músculo-esquelética se selecciona de la lista: osteoartrosis, síndrome de tensión cervical, síndrome cervical, tortícolis, hombro congelado, epicondilitis o codo de tenista, epitrocleitis o codo de golfista, síndrome del pronador redondo, síndrome de túnel radial, tenosinovitis del extensor, bursitis del codo, síndrome de DeQuervain, síndrome del túnel carpiano, síndrome de Guyon, dedo en maza, contractura de Dupuyten, síndrome del escribiente, hernia discal, fractura vertebral, dorsalgia, lumbalgia aguda, lumbalgia crónica, lumbago agudo, lumbo-ciatoalgias, cifosis, rodilla de fregona y tendinitis del tendón de Aquiles, contusiones, desgarros musculares, esguinces, luxaciones y fracturas.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la lesión es la osteoartrosis.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la célula madre mesenquimal aislada es una célula de mamífero. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la célula madre mesenquimal aislada es una célula de perro. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la célula madre mesenquimal aislada es una célula mesenquimal de caballo. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la célula madre mesenquimal aislada es una célula de humano.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la célula o células madre mesenquimales aisladas procede del mismo individuo al que se va administrar el contenido intracelular.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Valoración ángulo de extensión. La extensión de la articulación de la cadera es el movimiento articular más doloroso y de mayor restricción en osteoartrosis de cadera en perros. La valoración del ángulo de extensión registra un aumento en su valor a 1 mes respecto al valor basal, este incremento en el dato se hace más evidente a los 3 meses, lo que indica una mejoría notable en el rango de movilidad articular tras la terapia.

Fig. 2. VAS (Valoración Subjetiva del Dolor). La valoración medio del grado de dolor asignado por el propietario para su animal, muestra una importante disminución a 1 mes que aún desciende a los 3 meses, lo que indica que el tratamiento reduce el dolor percibido por el propietario para su animal.

Fig. 3. Pico de Fuerza Vertical. En osteoartrosis que afectan a ambas caderas los pacientes tienen cojera bilateral, y normalmente una articulación tiene un grado más avanzado de OA. Esto supone que en estado basal, apoya menos (menor PVF) el miembro cuya cadera tiene mayor degeneración, y realiza mayor carga en el apoyo con el miembro cuya cadera esta mejor (mas PVF). El tratamiento hace que desaparezca el dolor en ambas articulaciones, por tanto el paciente reparte la fuerza de apoyo entre ambos miembros pelvianos, el efecto es que la que estaba mejor a nivel basal y mostraba mayor PVF tras el tratamiento disminuye este valor, mientras que la que tenía menor PVF incrementa este valor de fuerza de apoyo. Este equilibrio en el parámetro PVF para ambos miembros pelvianos indica mejoría por la terapia.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención han evaluado el efecto beneficioso del contenido intracelular de las células mesenquimales (MSCs) en lesiones musculo esqueléticas. Además han encontrado una serie de diferencias que indican que la infusión de contenido intracelular de las células madre mesenquimales presenta ventajas frente al trasplante de estas células intactas.

Un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso del contenido intracelular de al menos una célula madre mesenquimal aislada en la elaboración de un medicamento para la prevención, el alivio o el tratamiento de lesiones musculo-esqueléticas, o alternativamente, al contenido intracelular de al menos una célula madre mesenquimal aislada para su uso en la prevención, el alivio o el tratamiento de lesiones musculo-esqueléticas.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la lesión músculo-esquelética se selecciona de la lista: osteoartrosis, síndrome de tensión cervical, síndrome cervical, tortícolis, hombro congelado, epicondilitis o codo de tenista, epitrocleitis o codo de golfista, síndrome del pronador redondo, síndrome de túnel radial, tenosinovitis del extensor, bursitis del codo, síndrome de DeQuervain, síndrome del túnel carpiano, síndrome de Guyon, dedo en maza, contractura de Dupuyten, síndrome del escribiente, hernia discal, fractura vertebral, dorsalgia, lumbalgia aguda, lumbalgia crónica, lumbago agudo, lumbo-ciatoalgias, cifosis, rodilla de fregona y tendinitis del tendón de Aquiles, contusiones, desgarros musculares, esguinces, luxaciones y fracturas.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la lesión es la osteoartrosis.

Las células madre mesenquimales son obtenidas de un tejido o un órgano de un individuo en un estado de crecimiento posterior al estado embrionario, preferiblemente de su médula ósea. Preferiblemente, las células madre de la investigación han sido aisladas en un estado post-natal. Preferiblemente han sido aisladas de un mamífero, y más preferiblemente de un humano, incluyendo neonatos, juveniles, adolescentes y adultos.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la célula madre mesenquimal aislada es una célula de mamífero. En otra realización preferida es una célula mesenquimal de un perro. En otra realización preferida es una célula mesenquimal de un caballo. En otra realización preferida es una célula mesenquimal de un humano.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la célula o células madre mesenquimales aisladas procede del mismo individuo al que se va administrar el contenido intracelular.

En general hay ventajas asociadas con el uso de células o tejidos autólogos, o con el contenido intracelular de células autólogas, que incluyen: (a) una reducción significativa del número de infecciones desde el donante al receptor por agentes infecciosos, y (b) la ausencia del efecto de rechazo inmunitario, por lo tanto, el paciente no tiene que someterse a otros tratamientos, y se previenen los efectos y problemas asociados con la inmunodepresión.

El término “individuo” incluye a cualquier animal, en particular, animales vertebrados, preferentemente mamíferos, tales como ratones, ratas, caballos, cerdos, conejos, gatos, ovejas, perros, vacas, seres humanos, etc. El término mamífero, tal como se entiende en esta memoria, hace referencia a cualquier organismo del superreino *Eukaryota*, reino *Metazoa*, Phylum *Chordata*, clase *Mammalia*. Así, la sangre puede obtenerse del seno coronario de ratón, rata, cerdo, perro, caballo y humano. En otra realización preferida, el mamífero es el ser humano. En otra realización preferida, el mamífero es el perro. En otra realización preferida, el mamífero es el caballo.

Si se desea, las células madre mesenquimales que dan lugar al lisado intracelular de la invención puede ser modificada genéticamente por cualquier método convencional incluyendo, a modo ilustrativo, no limitativo, procesos de transgénesis, deleciones o inserciones en su genoma que modifiquen la expresión de genes que sean importantes para sus propiedades básicas (proliferación, migración, diferenciación, etc.), o mediante la inserción de secuencias de nucleótidos que codifiquen proteínas de interés como, por ejemplo, proteínas con propiedades terapéuticas. Por tanto, en otra realización preferida, la célula de la invención ha sido modificada genéticamente.

La progenie de una sola célula clonal puede expandirse mediante numerosos pases, sin aparentemente sufrir ninguna anormalidad cromosómica, o la pérdida de sus propiedades de crecimiento y diferenciación.

Por tanto, si se desea, las células mesenquimales pueden expandirse clonalmente usando un procedimiento adecuado para clonar poblaciones celulares. Por ejemplo, una población proliferada de células puede recogerse físicamente y sembrarse en una placa separada (o los pocillos de una placa “multi-pocillo”). Otra opción es que la células pueden subclonarse en una placa “multi-pocillo” en una relación estadística para facilitar la operación de colocar una única célula en cada pocillo (por ejemplo, desde aproximadamente 0,1 a cerca de una célula/pocillo o incluso de unas 0,25 a 0,5 células/pocillo, como por ejemplo 0,5 células/pocillo). Por supuesto, las células pueden clonarse a baja densidad (por ejemplo, en una placa de Petri u otro sustrato adecuado) y aislarlas de otras células usando dispositivos tales como anillos de clonación. La producción de una población clonal puede expandirse en cualquier medio de cultivo adecuado. En cualquier caso, las células aisladas pueden cultivarse hasta un punto adecuado cuando su fenotipo de desarrollo pueda evaluarse.

El término “aislada” indica que la célula o la población celular de la invención a la que se refiere, no se encuentran en su ambiente natural. Esto es, la célula o la población celular

han sido separadas de su tejido circundante. Particularmente significa que dicha célula o la población celular está sustancialmente exenta (libre) de otras células normalmente presentes en el tejido del que han sido aisladas, esto es, cuando se separa de, al menos, el 60%, preferentemente de al menos el 80%, preferentemente de, al menos, el 90%, más preferentemente de, al menos, el 95%, aún más preferentemente de, al menos, el 96%, 97%, 98% o incluso 99%, de otras células presentes en el tejido del que han sido aisladas.

También se refiere a las células o poblaciones celulares que han sido aisladas del organismo en el que se originan. El término también incluye células que han sido aisladas de un organismo y re-introducidas en el mismo organismo, o en otro.

El término "célula madre" hace referencia a una célula con capacidad clonogénica, de autorrenovación y de diferenciación en múltiples linajes celulares. En particular, las células madre mesenquimales tienen la capacidad de proliferar extensamente y formar colonias de células fibroblásticas. Tal como se usa en la presente invención, la expresión "célula madre" se refiere a una célula totipotente, pluripotente o multipotente, capaz de generar uno o más tipos de células diferenciadas, y que además posee la capacidad de auto regenerarse, es decir, de producir más células madre. Las "células madre totipotentes" pueden dar lugar tanto a los componentes embrionarios (como por ejemplo, las tres capas embrionarias, el linaje germinal y los tejidos que darán lugar al saco vitelino), como a los extraembrionarios (como la placenta). Es decir, pueden formar todos los tipos celulares y dar lugar a un organismo completo. Las "células madre pluripotentes" pueden formar cualquier tipo de célula correspondiente a los tres linajes embrionarios (endodermo, ectodermo y mesodermo), así como el germinal y el saco vitelino. Pueden, por tanto, formar linajes celulares pero a partir de ellas no se puede formar un organismo completo. Las "células madre multipotentes" son aquellas que sólo pueden generar células de su misma capa o linaje embrionario de origen. La médula ósea alberga al menos dos poblaciones de células madre distintas: células madre mesenquimales (MSCs) y células madre hematopoyéticas (HSCs). En el contexto de la presente invención, las células madre son seleccionadas del grupo que comprende células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre adultas, o combinaciones de las mismas. En una realización particular, las células madre son células madre de un mamífero, preferiblemente humanas. En una realización particular, las células madre son células madre mesenquimales, preferiblemente células madre mesenquimales humanas.

El término "célula madre adulta" se refiere a aquella célula madre que es aislada de un tejido o un órgano de un animal en un estado de crecimiento posterior al estado embrionario. Preferiblemente, las células madre de la invención son aisladas en un estado postnatal. Preferiblemente son aisladas de un mamífero, y más preferiblemente de un humano, incluyendo neonatos, juveniles, adolescentes y adultos. Se pueden aislar células madre adultas de una gran variedad de tejidos y órganos, como médula ósea (células madre mesenquimales, células progenitoras adultas multipotentes y células madre hematopoyéticas), tejido adiposo, cartílago, epidermis, folículo piloso, músculo esquelético, músculo cardíaco, intestino, hígado, neuronal.

El término "célula madre mesenquimal" o "MSC", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una célula de estroma multipotente, originada a partir de la capa germinal mesodermal, que puede diferenciarse en una variedad de tipos de células, incluyendo osteocitos (células de hueso), condrocitos (células de cartílago) y adipocitos (células de grasa). Los marcadores expresados por las células madre mesenquimales incluyen CD105 (SH2), CD73 (SH3/4), CD44, CD90 (Thy-1), CD71 y Stro-1 así como las moléculas de adhesión CD106, CD166, y CD29. Entre los marcadores negativos para las MSCs (no expresados) están los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34, CD14, y las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40 así como la molécula de adhesión CD31. Las MSC pueden ser obtenidas a partir de, sin quedar limitado a, médula ósea, tejido adiposo (tal como el tejido adiposo subcutáneo), hígado, bazo, testículos, sangre menstrual, fluido amniótico, páncreas, periostio, membrana sinovial, músculo esquelético, dermis, pericitos, hueso trabecular, cordón umbilical humano, pulmón, pulpa dental y sangre periférica. Las MSC de acuerdo con la invención pueden obtenerse a partir de cualquiera de los tejidos anteriores, tal como a partir de médula ósea, de tejido adiposo subcutáneo o de cordón umbilical. Se pueden aislar MSC de médula ósea mediante procedimientos conocidos por el experto en la materia. En general, dichos métodos consisten en aislar células mononucleares mediante centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll, Percoll) de aspirados de médula ósea, y posteriormente sembrar las células aisladas en placas de cultivo de tejido en medio que contiene suero fetal bovino. Estos métodos se basan en la capacidad de las MSC de adherirse al plástico, de forma que mientras que las células no adherentes se retiran del cultivo, las MSC adheridas pueden expandirse en placas de cultivo. Las MSC también pueden aislarse de tejido adiposo subcutáneo siguiendo un procedimiento similar, conocido para el experto en la materia. Un método para aislar MSC de médula ósea o de tejido adiposo subcutáneo ha sido descrito previamente (De la Fuente et al., *Exp. Cell Res.* 2004, Vol. 297: 313:328). En una realización particular de la invención,

las células madre mesenquimales son obtenidas a partir de cordón umbilical, preferiblemente de cordón umbilical humano.

Las células madre mesenquimales conforme a la presente invención pueden ser obtenidas mediante procedimientos y metodologías conocidas por el experto en la materia a partir de un tejido de un sujeto. La muestra que comprende las células madre inicialmente es, preferiblemente, lavada para separar la fracción que comprende las células madre mesenquimales del material restante. En una realización particular, la muestra de tejido se lava con una solución salina fisiológicamente compatible, tal como una solución salina tamponada fosfato o PBS.
Métodos de purificación de células madre tras su obtención han sido ampliamente descritos en la técnica e incluyen, sin quedar limitados a, centrifugación en gradiente de densidad (mediante, por ejemplo, Ficoll-Hypaque) seguida de incubación de las células adherentes, citometría celular con *sorting* e incubación con partículas magnéticas específicas de marcador (con selección positiva o negativa).

Como el experto en la técnica entiende, el número total de células madre que puede obtenerse a partir de un individuo puede ser mayor o menor en función del tejido de procedencia de dichas células madre. Así, en particular, el número total de células madre mesenquimales que puede obtenerse a partir de tejido adiposo es mayor que el que puede obtenerse a partir de, por ejemplo, médula ósea.

El término “osteoartritis”, también conocida como osteoartrosis, artrosis o enfermedad degenerativa de las articulaciones, es el tipo más común de artritis. La osteoartritis es una condición crónica caracterizada por el desgaste del cartílago de las articulaciones. El desgaste del cartílago hace que los huesos friccionen uno contra otro, causando rigidez, dolor y pérdida de movimiento articular. La osteoartritis típicamente afecta ciertas articulaciones, como caderas, manos, rodillas, zona lumbar (espalda baja) y cuello. Después de los 50 años de edad, las mujeres presentan más frecuencia de osteoartritis que los varones. Los síntomas se inician típicamente a partir de los 40 años y avanzan lentamente. Los principales síntomas de la osteoartritis son: dolor o rigidez en las articulaciones después de periodos de inactividad o uso excesivo, sensación rasposa o de agarre durante el movimiento de la articulación y crecimientos óseos en las orillas de las articulaciones involucradas. Se desconocen las posibles causas de la osteoartritis aunque pero hay ciertos factores que aumentan el riesgo de desarrollar la enfermedad: herencia, sobrepeso, lesiones

de las articulaciones, uso excesivo o repetitivo de algunas articulaciones, falta de actividad física, daños en los nervios y envejecimiento.

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DE LA INVENCIÓN

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende el contenido intracelular de células madre mesenquimales. Preferiblemente, la célula madre mesenquimal aislada es una célula humana. Más preferiblemente, la composición es una composición farmacéutica. Aún más preferiblemente, la composición además comprende excipientes farmacéuticamente aceptables.

El contenido intracelular de la composición de la invención se obtiene a partir de células mesenquimales, que comprende una célula aislada o una población aislada de la invención.

Dicha composición se obtiene a partir de células madre mesenquimales de la invención y puede contener un medio en el que se encuentren las células de la invención; dicho medio debe ser compatible con dichas células. Por ejemplo, pero sin limitarse, soluciones isotónicas, opcionalmente suplementadas con suero; medios de cultivo celular o, alternativamente, un medio soporte sólido, semisólido, gelatinoso o viscoso.

La composición de la invención también puede contener el secretoma de las células madre mesenquimales de la invención. En esta invención se entiende por secretoma al conjunto de de proteínas secretadas al espacio extracelular por una determinada célula, tejido u órgano. Normalmente, las proteínas secretadas están implicadas en diversos procesos fisiológicos como la señalización celular.
La composición de la invención, pueden formar parte a su vez de una composición farmacéutica para su administración a un sujeto. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, de ahora en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende el contenido intracelular una célula mesenquimal aislada de la invención ó de una población de células mesenquimales de la invención. En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida, la composición farmacéutica de la invención además comprende otro principio activo.

El término “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un vehículo que debe estar aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal o enumerado en la Farmacopea Estadounidense o la Farmacopea Europea, u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más concretamente en humanos.

El término “vehículo” se refiere a un diluyente, coadyuvante, excipiente o portador con el que se deben administrar el contenido intracelular de las células mesenquimales de la invención o de dicha composición que comprende el contenido intracelular de células madre mesenquimales obtenibles según el procedimiento de la invención; obviamente, dicho vehículo debe ser compatible con dicho contenido intracelular.

La composición farmacéutica de la invención, si se desea, puede contener también, cuando sea necesario, aditivos para aumentar, controlar o dirigir de otro modo el efecto terapéutico deseado del contenido intracelular de las células madre mesenquimales, las cuales comprenden dicha composición farmacéutica, y/o sustancias auxiliares o sustancias farmacéuticamente aceptables, tales como agentes tamponantes, tensioactivos, codisolventes, conservantes, etc. Dichas sustancias farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en la composición farmacéutica de la invención son conocidas, en general, los técnicos en la materia y se usan normalmente en la elaboración de composiciones celulares. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen, por ejemplo, en “Remington's Pharmaceutical Sciences”, de E.W. Martin. Puede encontrarse información adicional sobre dichos vehículos en cualquier manual de tecnología farmacéutica (Farmacia Galénica).

Como se emplea aquí, el término “principio activo”, “sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” ó “ingrediente farmacéuticamente activo” significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere al uso de una composición que comprende contenido intracelular de al menos una célula madre mesenquimal, en la elaboración de un

medicamento para la prevención, el alivio o el tratamiento de lesiones musculo-esqueléticas, o alternativamente a una composición que comprende contenido intracelular de al menos una célula madre mesenquimal para su uso en la prevención, el alivio o el tratamiento de lesiones músculo-esqueléticas.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la lesión músculo-esquelética se selecciona de la lista: osteoartrosis, síndrome de tensión cervical, síndrome cervical, tortícolis, hombro congelado, epicondilitis o codo de tenista, epitrocleitis o codo de golfista, síndrome del pronador redondo, síndrome de túnel radial, tenosinovitis del extensor, bursitis del codo, síndrome de DeQuervain, síndrome del túnel carpiano, síndrome de Guyon, dedo en maza, contractura de Dupuyten, síndrome del escribiente, hernia discal, fractura vertebral, dorsalgia, lumbalgia aguda, lumbalgia crónica, lumbago agudo, lumbo-ciatoalgias, cifosis, rodilla de fregona y tendinitis del tendón de Aquiles, contusiones, desgarros musculares, esguinces, luxaciones y fracturas.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la lesión es la osteoartrosis.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la célula madre mesenquimal aislada es una célula de mamífero. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la célula madre mesenquimal aislada es una célula de perro. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la célula madre mesenquimal aislada es una célula mesenquimal de caballo. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la célula madre mesenquimal aislada es una célula de humano.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la célula o células madre mesenquimales aisladas procede del mismo individuo al que se va administrar el contenido intracelular.

El término “medicamento”, tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales.

La composición farmacéutica de la invención contendrá una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de contenido intracelular de células madre mesequimales, para proporcionar el efecto terapéutico deseado. Tal como se usa en la presente descripción, el término “cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva” se refiere a la cantidad de

contenido intracelular de células madre mesequimales contenida en la composición farmacéutica que es capaz de producir el efecto terapéutico deseado y, en general, se determinará, entre otros factores, por las propias características del lisado intracelular las células y el efecto terapéutico deseado que se persigue. En general, la cantidad terapéuticamente efectiva de contenido intracelular de la invención que debe administrarse dependerá, entre otros factores, de las propias características del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la forma de administración, etc. Por este motivo, las dosis mencionadas en esta invención deben tenerse en cuenta sólo como guía para la persona conocedora de la técnica, que debe ajustar esta dosis dependiendo de los factores anteriormente descritos.

La composición farmacéutica de la invención se formulará de acuerdo con la forma de administración elegida. La composición farmacéutica de la invención puede preparase en un modo de dosificación líquido o gel, por ejemplo, en forma de suspensión, para ser inyectada o perfundida al individuo.

La administración de la composición farmacéutica de la invención al individuo se llevará a cabo por los medios convencionales. Por ejemplo, dicha composición farmacéutica se puede administrar a dicho individuo por vía intravenosa utilizando los dispositivos adecuados, tales como jeringas, catéteres (un catéter intravenoso periférico estándar, un catéter venoso central o un catéter arterial pulmonar, etc.), trocares, cánulas, etc. En todos los casos, la composición farmacéutica de la invención se administrará utilizando los equipos, aparatos y dispositivos adecuados a la administración de composiciones celulares y conocidos por el experto en la técnica.

Como entiende el experto en la materia, en ocasiones la administración directa de la composición farmacéutica de la invención al sitio que se pretende beneficiar puede ser ventajosa. De este modo, la administración directa de la composición farmacéutica de la invención al órgano o tejido deseado se puede lograr por administración directa (por inyección, etc.) en la superficie externa del órgano o tejido afectado por medio de inserción de un dispositivo adecuado, e.g., una cánula apropiada, por perfusión arterial o venosa (incluyendo mecanismos de flujo retrógrado) o por otros medios mencionados en esta descripción o conocidos en la técnica.

La composición farmacéutica de la invención, si se desea, se puede almacenar hasta el momento de su aplicación mediante los procedimientos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. Esta composición farmacéutica también se puede almacenar junto a

medicamentos adicionales, útiles en el tratamiento en enfermedades, en una forma activa que comprende una terapia combinada.

Como se ha dicho previamente, si se desea, la células madre mesenquimales que dan lugar al contenido intracelular de la invención puede ser modificada genéticamente por cualquier método convencional incluyendo, a modo ilustrativo, no limitativo, procesos de transgénesis, deleciones o inserciones en su genoma que modifiquen la expresión de genes que sean importantes para sus propiedades básicas (proliferación, migración, transdiferenciación, etc.).

En otra realización preferida, la composición de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida, la composición de la invención además comprende otro principio activo o agente terapéutico. Dicho agente terapéutico se selecciona, preferiblemente, de entre un agente analgésico (en el tratamiento de la inflamación y del dolor) o un agente antiinfeccioso (en la prevención de infección).

En particular, ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos de utilidad de acuerdo a la invención incluyen las siguientes categorías terapéuticas: analgésicos, como los medicamentos anti-inflamatorios no esteroides, agonistas opiáceos y salicilatos; agentes anti-infecciosos, tales como antihelmínticos, antianaeróbicos, antibióticos, antibióticos aminoglucósidos, antibióticos antifúngicos , cefalosporinas, antibióticos macrólidos, diversos antibióticos beta-lactámicos, penicilinas, antibióticos quinolonas, antibióticos sulfonamidas, antibióticos de tetraciclina, antimicobacterianos, antimicobacterianos antituberculosos, antiprotozoarios, antiprotozoarios antimaláricos, agentes antivirales, agentes anti-retrovirales, escabicidas, agentes anti-inflamatorios, corticosteroides antiinflamatorios, antipruriginosos/anestésicos tópicos locales, antiinfecciosos, antimicóticos tópicos antiinfecciosos, antivirales tópicos antiinfecciosos, agentes electrolíticos y renales, tales como agentes acidificantes, agentes alcalinizantes, diuréticos, inhibidores de la anhidrasa carbónica, diuréticos, diuréticos de asa, diuréticos osmóticos, diuréticos ahorradores de potasio, diuréticos de tiazida, suplementos de electrolitos, y agentes uricosúricos, enzimas, tales como enzimas pancreáticas y las enzimas trombolíticos, agentes gastrointestinales, tales como antidiarreicos, antieméticos, gastrointestinales agentes anti-inflamatorios gastrointestinales, el salicilato de agentes anti-inflamatorios, antiácidos anti-úlcera gástrica, agentes inhibidores de la bomba de ácido antiulcerosos agentes, mucosa gástrica antiulcerosos agentes bloqueantes H2, antiulcerosos, agentes colelitolíticos digestants, eméticos, laxantes y ablandadores de heces y agentes procinéticos, anestésicos generales

como los anestésicos inhalatorios halogenados anestésicos inhalatorios, anestésicos intravenosos, barbitúricos, benzodiazepinas anestésicos intravenosos anestésicos por vía intravenosa de opiáceos y anestésicos intravenosos agonistas, hormonas y modificadores hormonales, como abortivos, agentes corticosteroides suprarrenales, agentes suprarrenales, los andrógenos, antiandrógenos, inmunobiológicos agentes, tales como inmunoglobulinas, inmunosupresores, toxoides, y vacunas; anestésicos locales, tales como amida de los anestésicos locales y de los anestésicos locales de tipo éster, agentes musculoesqueléticos, tales como anti-gota agentes antiinflamatorios, corticosteroides anti-inflamatorios, agentes, compuestos de oro anti-inflamatoria agentes inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), agentes anti-inflamatorios salicilato, minerales y vitaminas, como la vitamina A, vitamina B, vitamina C, vitamina D, vitamina E y vitamina K.

En una realización particular, los agentes terapéuticos útiles según las categorías anteriores incluyen: (1) analgésicos en general, tales como lidocaína o sus derivados, y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) analgésicos, incluyendo diclofenaco, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno y, (2) analgésicos opiáceos agonistas, como la codeína, fentanilo, hidromorfona y la morfina, (3) analgésicos de salicilato, como la aspirina (ASA), (4) bloqueadores H1 antihistamínicos, tales como terfenadina, clemastina y (5) agentes anti-infecciosos, tales como mupirocina; (6) antianaeróbicos anti-infecciosos, tales como cloranfenicol y clindamicina; (7) antifúngicos antibióticos antiinfecciosos, tales como anfotericina B, clotrimazol, fluconazol y ketoconazol; (8) contra el antibiótico macrólido - infecciosos, tales como la azitromicina y eritromicina; (9) diversos beta-lactámico antiinfecciosos, tales como aztreonam y imipenem; (10) antibiótico de penicilina antiinfecciosos, tales como nafcilina, oxacilina, penicilina G, penicilina V y; (11) quinolona antibióticos antiinfecciosos, tales como ciprofloxacina y norfloxacina; (12) antibiótico tetraciclina antiinfecciosos, tales como doxiciclina, minociclina y tetraciclina; (13) antituberculosos antimicobacterianos antiinfecciosos, tales como isoniazida (INH), rifampicina y; (14) antiprotozoarios antiinfecciosos, como atovacuona y dapsona; (15) antipalúdicos antiprotozoarios antiinfecciosos, tales como cloroquina y pirimetamina; (16) anti-retrovirales antiinfecciosos, tales como ritonavir y zidovudina; (17) contra el antiviral - infeccioso agentes, tales como aciclovir, ganciclovir, interferón alfa, y rimantadina; (18) antifúngicos tópicos antiinfecciosos, tales como anfotericina B, clotrimazol, miconazol, nistatina y; (19) antivirales tópicos antiinfecciosos, tales como el aciclovir; (20) agentes electrolíticas y renales, como la lactulosa; (21) diuréticos de asa, como la furosemida, (22) diuréticos ahorradores de potasio, como triamtereno; (23) diuréticos tiazídicos, tales como

hidroclorotiazida (HCTZ), (24) agentes uricosúricos, tales como probenecid; (25) enzimas, tales como RNasa y DNasa; (26) antieméticos, tales como proclorperazina; (27) salicilato gastrointestinales inflamatorias anti-agentes, tales como sulfasalazina; (28) de la bomba gástrica de ácido anti-inhibidor agentes de úlceras, tales como el omeprazol; (29) bloqueantes H2, agentes anti-úlcera, tales como cimetidina, famotidina, nizatidina y ranitidina; (30) digestivos, tales como pancrelipase; (31) agentes procinéticos, tales como la eritromicina (32; éster) anestésicos locales, tales como benzocaína y procaína; (33) musculoesqueléticos corticosteroides anti-inflamatorios, agentes, tales como beclometasona, betametasona, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, y prednisona; (34) musculoesqueléticos antiinflamatorios inmunosupresores, tales como azatioprina, ciclofosfamida y metotrexato; (35) musculoesqueléticos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como diclofenaco, ibuprofeno, ketoprofeno, ketorlac, y naproxeno; (36) minerales, tales como hierro, calcio y magnesio; (37) Los compuestos de vitamina B , tales como la cianocobalamina (vitamina B12) y la niacina (vitamina B3); (38) compuestos de vitamina C, tales como ácido ascórbico, y (39) compuestos de vitamina D, tales como calcitriol.

En otra realización preferida, el agente terapéutico puede ser un factor de crecimiento u otra molécula que afecta a la diferenciación celular y/o proliferación, como por ejemplo, pero sin limitarnos, el derivado de las plaquetas (PDGF), transformante (TGF), insulínico (IGF), hepático (HGF), epidérmico (EGF), endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), o cualquier de sus combinaciones. Los factores de crecimiento que inducen la diferenciación de estados finales son bien conocidos en la técnica, y puede ser seleccionado de cualquiera de esos factores que se ha demostrado que induce un estado de diferenciación final. Los factores de crecimiento para uso en los métodos aquí descritos pueden, en ciertas realizaciones, ser variantes o fragmentos de un factor de crecimiento de origen natural. Por ejemplo, una variante puede ser generada al hacer cambios de aminoácidos conservadores y prueba de la variante resultante en uno de los ensayos funcionales descritos anteriormente u otro ensayo funcional conocido en la técnica. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen alifático-hidroxilo en sus cadenas laterales es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen que contiene amida en las cadenas laterales es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales

básicas es lisina, arginina e histidina, y un grupo de aminoácidos que tienen que contiene azufre en las cadenas laterales es cisteína y metionina. Grupos preferidos de sustitución de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina.

Como los expertos en la técnica apreciarán, las variantes o fragmentos de factores de crecimiento de polipéptidos se pueden generar usando técnicas convencionales, tales como mutagénesis, incluyendo la creación de mutación de punto discreto (s), o por truncamiento. Por ejemplo, la mutación puede dar lugar a variantes que conservan sustancialmente la misma, o simplemente un subconjunto, de la actividad biológica de un factor de crecimiento polipeptídico de la que se derivó.

En otra realización preferida, el agente terapéutico puede ser Plasma Rico en Factores de Crecimiento PRGF (*Plasma Rich in Growth Factors*). Se basa en la utilización de las plaquetas como vehículo para la liberación controlada de distintas señales celulares que aceleran y optimizan la reparación de los tejidos dañados por diversas razones como puede ser un tratamiento quirúrgico, un traumatismo ó una enfermedad.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS DE LA INVENCIÓN

El siguiente ejemplo se proporciona a modo de ilustración y no pretende que sea limitativo de la presente invención.

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los cuidados animales y procedimientos experimentales se aprobaron por el comité de investigación y ética del Hospital Universitario Reina Sofía/IMIBIC de acuerdo con la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y los boletines institucionales para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

Aislamiento de células madre mesenquimales (MSCs) de tejido adiposo de perro

Las MSC fueron extraídas a partir del tejido adiposo adyacente al ligamento falciforme, de perras donantes que habían sido sometidas a una operación de ovariectomía. El tejido se desinfectó con buffer fosfato salino (PSB) 100mM pH=7,4 (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) conteniendo penicilina y estreptomicina de manera preventiva en esterilidad. A continuación se realizaron repetidos lavados con PBS retirando los vasos sanguíneos presentes. El tejido fue triturado y se añadió el mismo volumen de una solución de digestión basada en medio de cultivo esencial mínimo alpha (α-MEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) suplementado con colagenasa (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) 1mg/ml. El tejido con el medio de digestión se mantuvo a 37ºC durante 1 hora. Transcurrido el tiempo de digestión se inactivó la colagenasa mediante la adición de un volumen de α-MEM conteniendo suero y homogenizando el contenido.

Posteriormente las MSC fueron aisladas mediante centrifugación a 500 g durante 10 minutos retirando el sobrenadante y quedándonos con el pellet de células, que se volvió a resuspender en 30 ml de α-MEM y a centrifugar a 500 g.

El pellet de células sedimentadas se resuspendió en α-MEM para sembrar las células en flask de 250 cm^2 a 100000 células/cm^2 en α-MEM suplementado con 2 mM L-glutamina (BioWhittaker, Suiza), 15% de suero fetal bovino (FBS) (BioWhittaker, Suiza), 100 U/ml Penicilina (Penilevel laboratorios ERN, Barcelona, España), 0,1 mg/ml de estreptomicina (laboratorios Normon, Sevilla, España) y 1 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF; CE Peprotech, Londres, Reino Unido), y se incubaron a 37ºC y 5% CO_2 en una atmósfera con humidificación saturada.

Transcurridas 24 horas desde la siembra del cultivo, se reemplazó el medio de cultivo por α-MEM suplementado con 10% de FBS y 1 ng/ml de FGF-b. El medio de cultivo fue reemplazado 2 veces por semana, realizando lavados con PBS previamente para eliminar las células no adherentes al plástico. Una vez que las células alcanzaron 90% de confluencia se levantaron con TryPLE Select (Life Technologies).

Posteriormente las células se centrifugaron, eliminando el sobrenadante. El pellet se resuspendió en Solución salina de Hank Balance(Sigma-Aldrich, St. Louis MO). Este último paso se realizó dos veces. En el segundo lavado las células fueron resuspendidas a una

concentración de 7 millones/ml. Cada ml de células fue sonicado en tres pulsos de 30 segundos con descanso en hielo de 15 segundos. Un ensayo de azul tripan fue realizado tras la sonicación de cada vial para comprobar la ausencia total de células intactas sin lisar..

El contenido del vial de 1 ml de 7 millones de MSC de tejido adiposo lisadas es la dosis que será congelada para su posterior infusión en las articulaciones dañadas.

Los resultados obtenidos por los investigadores revelan que la terapia alogénica con lisados de MSC procedentes de tejido adiposo o médula ósea son un tratamiento eficaz para las enfermedades musculo-esqueléticas, siendo nueva y prometedora esta terapia en el tratamiento de la OA, disminuyendo la sensación de dolor, mejorando la funcionalidad, el movimiento articular y la calidad de vida del paciente sin la aparición de efectos adversos.

La terapia de MSC-lisadas ha sido evaluada en 6 perros de razas labrador retriever y pastor alemán (4 y 2 respectivamente) con un peso medio de 32,8 kg (31-40 kg) y edad de 8,4 años (6-10 años), afectados de osteoartritis en ambas articulaciones coxofemorales con una calificación de grado moderado en base a los signos clínicos y radiológicos. Los pacientes fueron evaluados antes de aplicar el tratamiento (basal) y, a 1 y 3 meses después de las infiltraciones intraarticulares de MSC-lisadas. En todos los tiempos, se empleó un cuestionario estandarizado realizado al propietario para valorar el grado de funcionalidad física, dolor y rigidez de las articulaciones, con valores de 0-4 en cada pregunta. Este cuestionario es una modificación de la escala WOMAC (*Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index*) utilizada en medicina humana para evaluar el estado de pacientes con osteoartritis de cadera y rodilla:

CUESTIONARIO ESTUDIO FUNCIONALIDAD. TRATAMIENTO BIOLÓGICO OA

PACIENTE **.....** TIEMPO **.....**

CAPACIDAD FUNCIONAL

1. ¿HA NOTADO ALGÚN CAMBIO EN LA ACTITUD O CARÁCTER DE SU MASCOTA?: .....

0= Está mucho más contento y activo que antes del tratamiento

1= Está más contento y activo que antes del tratamiento

2= Está un poco más contento y activo que antes del tratamiento

3= Tiene la misma actitud que antes del tratamiento

4= Tiene peor actitud que antes del tratamiento

2. COMPORTAMIENTO

0= Contento, juega, reacciona con entusiasmo cuando se le llama

1= Alerta, claramente responde a estímulos (juguete, comida, etc.) o cuando se le llama

2= Respuesta leve cuando le llama para ir calle, ir por juguete o ir para buscar comida

3= Decaído, deprimido, no responde a estímulos (juego, querer salir a calle, etc.)

4= Mal carácter, incluso agresividad al aproximarse a el

3. GRADO DE COJERA DURANTE LA MARCHA (tras más de 10 minutos de marcha):.....

0= No cojea

1= Cojea poco: dificultad ocasional al andar

2= Cojea bastante

3= Cojea mucho: caminar anormal de forma continua y/o pone pata en alto de forma intermitente

4= Cojera severa: mantiene la pata en alto permanentemente

4. RESISTENCIA AL ANDAR DURANTE EL PASEO: .....

0= Puede caminar largas distancias sin problemas

1= Puede caminar largas distancias pero durante el paseo se detiene a menudo

2= Puede dar sólo paseos cortos

3= Puede dar sólo paseos muy breves

4= No quiere ir de paseo

5. SUBIR O BAJAR ESCALERAS: .....

0= Sube largos tramos de escaleras sin problemas

1= Sube bien tramos cortos pero muestra dificultad en tramos de 10 escalones o más

2= Sube con bastante dificultad tramos de escalera

3= Sube con mucha dificultad tramos de escalera (pocos escalones o incluso bordillos)

4= Se resiste a subir cualquier escalón

6. CAMBIOS EN LOS APOYOS EN LA ESTACIÓN (extremidad posterior): .....

0= El perro apoya normal en la estación
1= Apoya bien pero trata de aliviar peso sacando extremidad a un lado sólo los dedos
2= Apoya poco, solo con los dedos
3= Desplaza la carga al otro lado
4= No apoya extremidad

7. COMO SE LEVANTA: .....

0= El perro se levanta perfectamente
1= Se levanta bien pero con ligera dificultad
2= Se levanta con bastante dificultad
3= Se levanta con mucha dificultad
4= No se levanta

8. COMO SE TUMBA: .....

0= El perro se tumba perfectamente
1= Se tumba bien pero con ligera dificultad
2= Se tumba con bastante dificultad
3= Se tumba con mucha dificultad
4= Se tumba sin control, dejándose caer

9. COJERA EN FRÍO: .....

0= No cojea al iniciar el andar
1= Cojea un poco inicialmente pero desaparece durante los primeros minutos de marcha
2= Cojea bastante inicialmente pero desaparece en unos 10 minutos de marcha
3= Cojea mucho inicialmente pero desaparece tras 10 minutos de marcha

4= La cojera no desaparece

10. RESISTENCIA A LA CARRERA Y AL JUEGO: .....

0= Puede correr y jugar sin dificultad

1= Corre y juega con ligeras dificultades

2= Corre o juega con bastante dificultad y se cansa rápidamente

3= Corre y juega con mucha dificultad y se cansa rápidamente

4= No corre ni juega bajo ningún estímulo

11. LIMITACIONES EN PEQUEÑOS SALTOS (40-50 cm): .....

0= Sube sin problemas al sofá o al entrar-salir del coche

1= Sube con algo de dificultad al sofá o al entrar-salir del coche

2= Sube aunque con bastante dificultad al sofá o al entrar-salir del coche

3= Sube aunque con mucha dificultad al sofá o al entrar-salir del coche

4= No sube al sofá o al coche

SUBTOTAL DE PUNTUACIÓN DE LIMITACIÓN FUNCIONAL.....

MOVILIDAD ARTICULAR

12. DOLOR EN LA MOVILIZACIÓN MANUAL PASIVA DE ARTICULACIÓN: **.....**

0= Ausente, libre de dolor y crepitación

1= Leve, se produce dolor leve con manipulación

2= Bastante dolor sobre todo en los últimos grados de flexión y extensión

3= Mucho dolor y/o crepitación por manipulación mínima

4= Manipulación imposible debido a muchísimo dolor y/o crepitación

13. ROM-LIMITACIÓN DE MOVIMIENTO EN FLEXIÓN, EL GRADO DE FLEXIÓN DE LA RODILLA ES: **.....**

0= Flexión total 50-60º

1= Ligera limitación < 80º

2= Limitación severa > 80º

14. ROM-LIMITACIÓN DE MOVIMIENTO EN EXTENSIÓN, EL GRADO DE EXTENSIÓN DE LA RODILLA ES: **.....**

0= Extensión total 160-170º

1= Ligera limitación 150-160º

2= Limitación severa < 150º

SUBTOTAL DE PUNTUACIÓN DE MOVILIDAD ARTICULAR.....

ATROFIA MUSCULAR

15. ATROFIA MUSCULAR**:**

0= No hay signos de atrofia muscular

1= Atrofia leve

2= Atrofia moderada

3= Atrofia severa

Igualmente, para diagnosticar la intensidad del dolor del paciente se incluyó la escala visual analógica (VAS) realizada por el propietario y el veterinario:

VALORACIÓN SUBJETIVA DEL DOLOR (VAS)

Correspondiendo el 0 A SIN DOLOR y el 100 AL DOLOR EXTREMO

Hacer un marca vertical en la línea que corresponda al valor del DOLOR que creo que TIENE MI MASCOTA en este momento

0 ├──┤ **100**

¿El propietario recomendaría el tratamiento con células madre? SI NO

¿Ha necesitado tomar algún analgésico en este tiempo? SI NO

OBSERVACIONES (Alguna cosa que comentar)

Además, se evaluó el rango de movilidad articular mediante goniometría, midiendo los ángulos de flexión y extensión de cada cadera. También el grado de atrofia muscular, monitorizando el perímetro muscular medido en el muslo para cada miembro pelviano. El uso de la plataforma dinamométrica permitió estudiar parámetros de la cinética del paciente mediante el registro y análisis de la fuerza de reacción que los miembros posteriores del paciente ejercen sobre el suelo en la ejecución del movimiento: pico de fuerza vertical (PFV), impulso vertical (IV), tiempo de apoyo. Finalmente tras las revisiones a 1 y 3 meses, los propietarios respondieron un cuestionario que incluyó seis preguntas, con 5 niveles de puntuación graduados de muy bien a muy mal, acerca de la satisfacción por la respuesta de los pacientes al tratamiento, y a la detección de posibles efectos adversos relacionados con la terapia:

VALORACIÓN DE SATISFACCIÓN DEL PROPIETARIO

1. ¿Cómo cree ud que ha evolucionado la cojera de su mascota?

Muy Bien **Bien** **Nada** **Mal** **Muy mal**

2. Tolerancia del tratamiento

Muy Buena **Buena** **Regular** **Mala** **Muy mala**

3. ¿Cómo cree ud que su mascota ha respondido al tratamiento en este tiempo?

Muy Bien **Bien** **Nada** **Mal** **Muy mal**

4. ¿Cómo cree ud que evoluciona el grado de cojera de su mascota?

Muy Bien **Bien** **Poco** **Mal** **Muy mal**

5. ¿Cree ud que está siendo eficaz el tratamiento con células madre hasta ahora?

Muy Bien **Bien** **Poco** **Mal** **Muy mal**

6. ¿Cómo cree ud que está limitada la calidad de vida de su mascota?

Nada **Poco** **Bastante** **Mucho** **Muchísimo**

Los resultados de la terapia han sido cuantificados y analizados estadísticamente revelando un excelente efecto. El peso de los animales no mostró cambios significativos a 1 mes, ni 3 meses respecto al basal. Los resultados de las encuestas para la capacidad funcional mostraron mejoría a 1 mes respecto al estado basal, que se mantuvieron a los 3 meses. Esta encuesta revela que los pacientes mejoran significativamente la funcionalidad a 1 mes con una mediana de 0 (0-1), cambio en la actitud y carácter estando mucho más contento y activo que antes del tratamiento, juega y reacciona con entusiasmo cuando se le llama, desaparece la cojera, puede caminar largas distancias sin problemas, subida y bajada de largos tramos de escalera sin dificultad, se levanta y se tumba perfectamente, corre y juega sin dificultad y sin limitación en pequeños saltos, respecto a la valoración basal con una mediana de 2 (2-3), en que estaban poco activos y contentos, respuesta leve ante estímulos de juego o llamada, con cojera manifiesta, pueden dar solo paseos cortos, suben con bastante dificultad tramos de escalera, se levanta y se tumba con bastante dificultad, correo y juega con dificultad y se cansa rápidamente, bastante dificultad al realizar pequeños saltos.

A 1 mes (mediana de 1, 1-2) los pacientes mejoran el rango de movilidad articular respecto a la situación basal (mediana 2, 2-3) al expresar menor dolor a la movilización pasiva de las articulaciones coxofemorales, esta mejoría se mantiene a 3 meses (mediana de 1, 0-1). El aumento de la movilidad articular es más evidente en la evaluación del grado de extensión sobre todo a 3 meses (extensión derecha 147.5º, extensión izquierda 160º) respecto al basal (extensión derecha 130º, extensión izquierda 125º) (Figura 1). La medición del perímetro muscular del muslo para cada miembro pelviano no demostró cambios al comparar los diferentes tiempos de estudio. La VAS monitorizó una disminución en la valoración media del dolor en el paciente a 1 mes (2.1) y 3 meses (1.2) respecto al basal (6.8) (ver Figura 2). El análisis del movimiento con la plataforma dinamométrica se muestra también en los gráficos del anexo 4. Se detectó una mejoría significativa en el PFV (pico de fuerza vertical) (Nw/kg, derecha: basal 6.3, 1 mes 6.3, 3 meses 6.4; izquierda: basal 6.8, 1 mes 6.8, 3 meses 6.4) (Figura 3) y el IV (impulso vertical) (Nw/sg, derecha: basal 0.89, 1 mes 0.92, 3 meses 0.95; izquierda: basal 0.87, 1 mes 0.91, 3 meses 0.91) relacionando las fuerzas de reacción sobre el suelo de ambos miembros pelvianos tras la terapia con lisado de MSC (Figura 3). En todos los pacientes tratados la terapia fue satisfactoria con claros signos de

mejoría y no se detectaron ningún efecto adverso tras tres meses de estudio. Tanto a 1 mes como a 3 meses los propietarios valoraron como, muy buena la tolerancia de su animal al tratamiento con MSC, muy buena la respuesta al tratamiento, muy bien la evolución de la cojera, muy buena la eficacia de la terapia con MSC, y mejoría manifiesta en la calidad de vida de su mascota en relación al estado del pacientes previo al tratamiento con lisado de MSC.

En base a todos los parámetros estudiados podemos concluir que los lisados de MSC mejoran la lesión de osteoartrosis proponiéndolos como un tratamiento eficaz durante más de tres meses. A la luz de los efectos beneficiosos encontrados pensamos que este tratamiento con lisados de MSC tiene capacidad para mejorar no solo lesiones de osteoartrosis sino también otras de tipo tendinoso y cartilaginoso observadas tanto en perros como en caballos y humanos.

Se ha descubierto que, al igual que las MSC intactas, el lisado celular de éstas desencadena un efecto beneficioso, incluso acelera el proceso de regeneración y evita un posible efecto secundario perjudicial derivado de mutaciones o cambios producidos en las células introducidas.
Este hecho representa un concepto de terapia totalmente novedoso que aporta las siguientes ventajas:

1. El efecto beneficioso de las MSC se desarrolla más rápido ya que se infunde en el lugar de la lesión un concentrado de los factores que liberan las MSC en estado vivo o intacto.
2. El hecho de utilizar células madre mesenquimales lisadas elimina la posibilidad de encontrar posibles efectos adversos derivados de la transformación de las células madre infundidas en células tumorales o tipos celulares indeseados.

Al ser una infusión alogénica la administración de un concentrado de este lisado celular se hace disponible de forma inmediata (una vez valorada la lesión). La composición farmacéutica solo necesita ser descongelada y administrada localmente. Este hecho elimina otros procesos realizados por la competencia como la necesidad de extraer grandes cantidades de sangre, médula ósea o tejido adiposo del paciente. Además acelera la disponibilidad del tratamiento y evita mayor manipulación de los animales sin necesidad ni de ingreso ni cirugía.

REIVINDICACIONES

1.- El uso del contenido intracelular de al menos una célula madre mesenquimal aislada en la elaboración de un medicamento para la prevención, el alivio o el tratamiento de lesiones musculo-esqueléticas.

2.- El uso del contenido intracelular de al menos una célula madre mesenquimal aislada según la reivindicación anterior, donde la lesión músculo-esquelética se selecciona de la lista: osteoartrosis, síndrome de tensión cervical, síndrome cervical, tortícolis, hombro congelado, epicondilitis o codo de tenista, epitrocleitis o codo de golfista, síndrome del pronador redondo, síndrome de túnel radial, tenosinovitis del extensor, bursitis del codo, síndrome de DeQuervain, síndrome del túnel carpiano, síndrome de Guyon, dedo en maza, contractura de Dupuyten, síndrome del escribiente, hernia discal, fractura vertebral, dorsalgia, lumbalgia aguda, lumbalgia crónica, lumbago agudo, lumbo-ciatoalgias, cifosis, rodilla de fregona y tendinitis del tendón de Aquiles, contusiones, desgarros musculares, esguinces, luxaciones y fracturas.

3.- El uso del contenido intracelular de al menos una célula madre mesenquimal aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la lesión es la osteoartrosis.

4.- El uso del contenido intracelular de al menos una célula madre mesenquimal aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la célula madre mesenquimal aislada es una célula de mamífero, preferiblemente perro, caballo o humano.

5.- El uso del contenido intracelular de al menos una célula madre mesenquimal aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, la célula o células madre mesenquimales aisladas proceden del mismo individuo al que se va administrar el contenido intracelular.

6.- El uso de una composición que comprende contenido intracelular de al menos una célula madre mesenquimal, en la elaboración de un medicamento para la prevención, el alivio o el tratamiento de lesiones musculo-esqueléticas.

7.- El uso de una composición que comprende contenido intracelular de al menos una célula madre mesenquimal según la reivindicación anterior, donde la lesión músculo-esquelética se selecciona de la lista: osteoartrosis, síndrome de tensión cervical, síndrome cervical, tortícolis, hombro congelado, epicondilitis o codo de tenista, epitrocleitis o codo de golfista, síndrome del pronador redondo, síndrome de túnel radial, tenosinovitis del extensor, bursitis

del codo, síndrome de DeQuervain, síndrome del túnel carpiano, síndrome de Guyon, dedo en maza, contractura de Dupuyten, síndrome del escribiente, hernia discal, fractura vertebral, dorsalgia, lumbalgia aguda, lumbalgia crónica, lumbago agudo, lumbo-ciatoalgias, cifosis, rodilla de fregona y tendinitis del tendón de Aquiles, contusiones, desgarros musculares, esguinces, luxaciones y fracturas.

8.- El uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 6-7, donde la lesión es la osteoartrosis.

9.- El uso de una composición que comprende contenido intracelular de al menos una célula madre mesenquimal según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, donde la célula madre mesenquimal aislada es una célula de mamífero, preferiblemente perro, caballo o humano.

10.- El uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, donde la célula o células madre mesenquimales proceden del mismo individuo al que se va administrar el contenido intracelular.

11.- El uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, donde la composición además comprende otro principio activo o agente terapéutico.

12.- El uso de una composición según la reivindicación anterior, donde el agente terapéutico se selecciona de entre un agente analgésico (en el tratamiento de la inflamación y del dolor) o un agente antiinfeccioso (en la prevención de infección).

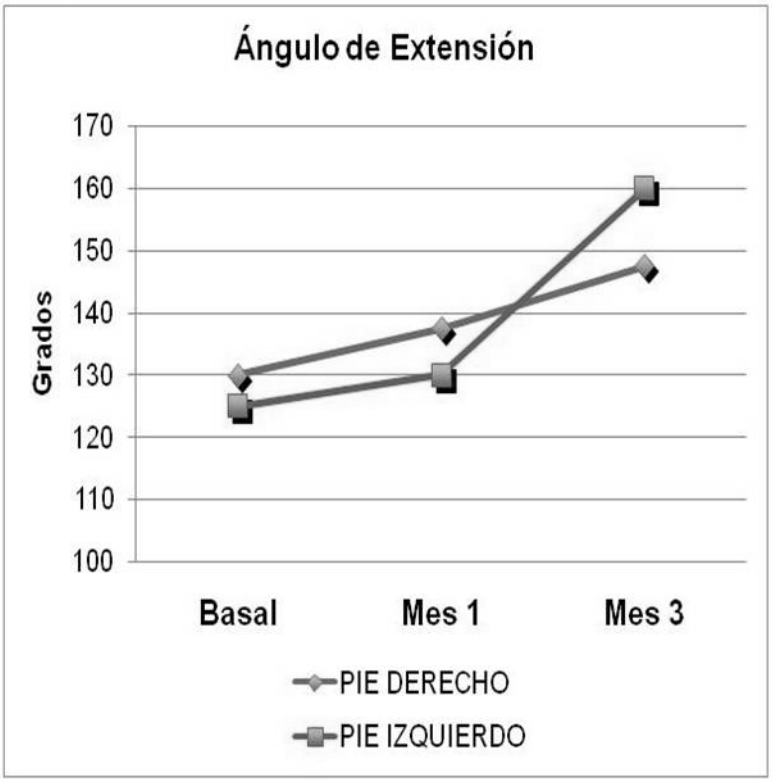
Ángulo de Extensión
170
160
150
140
130
120
110
100
Grados
Basal
Mes 1
Mes 3
PIE DERECHO
PIE IZQUIERDO

Fig.1

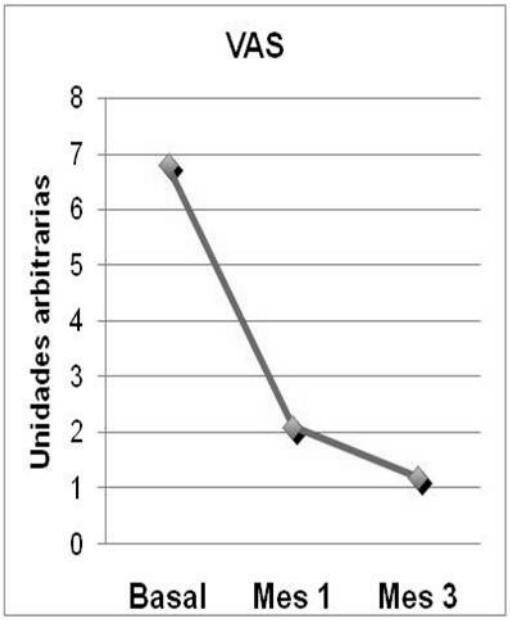
VAS
Unidades arbitrarias
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Basal
Mes 1
Mes 3

Fig.2

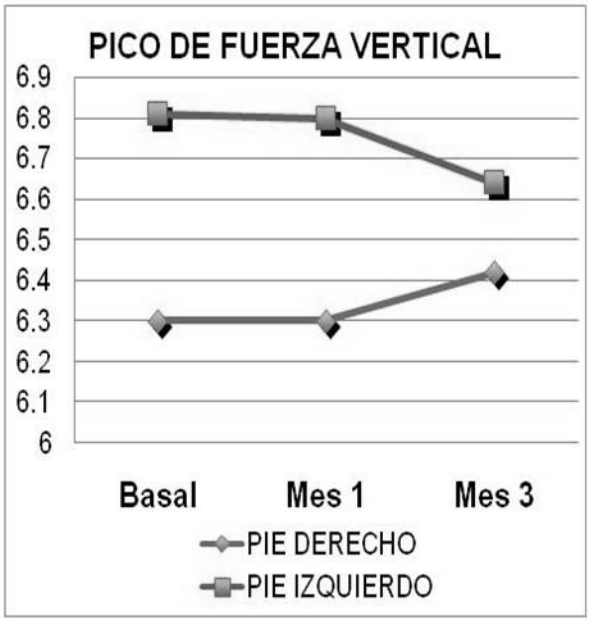
PICO DE FUERZA VERTICAL
6.9
6.8
6.7
6.6
6.5
6.4
6.3
6.2
6.1
6
Basal
Mes 1
Mes 3
PIE DERECHO
PIE IZQUIERDO

Fig.3