

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 006**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18	(2006.01)
A61K 38/30	(2006.01)
C12N 5/077	(2010.01)
C12N 5/0775	(2010.01)
A61K 35/36	(2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.02.2014 PCT/US2014/016109**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.08.2014 WO14127047**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2014 E 14706762 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2956543**

54 Título: **Composiciones y métodos para tratar y reparar tendones**

30 Prioridad:

12.02.2013 US 201361763908 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2019

73 Titular/es:

**REPLICEL LIFE SCIENCES INC. (100.0%)
2020-401 West Georgia Street
Vancouver, British Columbia V6B 5A1, CA**

72 Inventor/es:

**HOFFMANN, ROLF y
MCELWEE, KEVIN, JOHN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 701 006 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

Composiciones y métodos para tratar y reparar tendones

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a composiciones para su uso en métodos para reparar tendones, y más específicamente, a composiciones que comprenden células de la vaina dérmica no bulbar para su uso en el tratamiento y reparación de tendones, y para la prevención de lesiones de tendón.

10

ANTECEDENTES

Descripción de la técnica relacionada

15 Los tendones son bandas resistentes de tejido conjuntivo fibroso que normalmente conectan el músculo al hueso. Los ejemplos de tendones comunes incluyen el tendón de Aquiles, que conecta el músculo de la pantorrilla con el hueso del talón, y el tendón patelar, que conecta la rótula con la tibia.

20 Los tendones pueden lesionarse de varias maneras, incluyendo, por ejemplo, a través de sobrecarga, tensión, enfermedad y envejecimiento general. El término "tendinopatía" se puede usar para referirse a una serie de lesiones, incluidas las causadas por la inflamación y microdesgarros. Los tendones también pueden romperse o rasgarse, lo que generalmente requiere intervención quirúrgica. <McElwee et al, J. Invest. Dermatology, V123, n.º 1, págs. 34-40, 2004 describe la disección de folículos pilosos humanos en células de la vaina dérmica no bulbar. McElwee et al. J. Invest Dermatology, V121, págs. 1267-1275, 2003, describe la microdisección de un folículo piloso de ratón. El documento US5556783 se refiere a la disección de folículos pilosos de ratón.>

30 Aunque existen varios métodos quirúrgicos que pueden usarse para tratar lesiones en los tendones, incluso con tales métodos, la curación del tendón puede tardar varios años, si es que se cura. La presente invención describe nuevas composiciones y métodos para tratar lesiones de tendones, y proporciona además otras ventajas relacionadas.

RESUMEN

La invención se define en las reivindicaciones.

35

En resumen, la presente invención proporciona composiciones para su uso en métodos para tratar o prevenir lesiones en los tendones utilizando células de la vaina dérmica no bulbar ("NBDS") derivadas del folículo piloso. En un aspecto se proporcionan métodos que comprenden las etapas de (a) preparar cabello vital (es decir, "vivo"); y (b) cultivar el cabello vital de manera que se pueda obtener una población de células NBDS. En formas de realización preferidas, las células NBDS están aisladas.

40

En un aspecto, se proporcionan métodos para aislar células NBDS, que comprenden las etapas de: (a) preparar cabello vital; (b) escindir el cabello preparado en la etapa (a) para retirar el bulbo del folículo piloso (que contiene la cápsula de la vaina dérmica y la papila dérmica); (c) aislar el tejido de la vaina dérmica no bulbar; y (d) cultivar el tejido aislado de la vaina dérmica no bulbar para producir células NBDS. En una forma de realización, el cabello vital se obtiene mediante una biopsia del cuero cabelludo occipital de un sujeto. En otra forma de realización, el cabello se escinde utilizando un micromanipulador y un bisturí. En aún otras formas de realización, los métodos proporcionados en el presente documento comprenden además la etapa de realizar la digestión enzimática del tejido aislado de la vaina dérmica no bulbar, opcionalmente, con, por ejemplo, enzimas de digestión de colágeno tales como colagenasa, dispasa y leupeptina. En formas de realización adicionales, las células se pasan a través de múltiples pases.

45

50

En otros aspectos, se proporcionan células NBDS aisladas, preparadas opcionalmente de acuerdo con los métodos descritos anteriormente, en los que las células se aíslan para proporcionar una población que es principalmente positiva para uno o más de: CD 90, CD73 y CD49b, y/o principalmente negativa para uno o más de CD34, CD45 y KRT14 (opcionalmente antes o después del cultivo). En las formas de realización preferidas, las células NBDS aisladas son al menos un 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o un 100% positivas para uno o más de los marcadores positivos descritos anteriormente, y/o al menos un 80%, 90%, 95%, o un 98% negativas para uno de los marcadores negativos descritos anteriormente.

55

En las formas de realización preferidas, las células NBDS aisladas tienen menos del 15%, 10%, 5% o el 1% de queratinocitos dentro de la población celular y/o menos del 15%, 10%, 5% o 1% de melanocitos dentro de la población celular. Sin embargo, en formas de realización adicionales, la población de células NBDS aisladas se deriva de una población de células dérmicas (preferiblemente de un folículo piloso) que tienen algunos tipos de células contaminantes, incluyendo, por ejemplo, al menos el 1, 5, 10, 0,01%, 0,1 %, o el 1% de queratinocitos en la población celular, y/o al menos el 5, 10, 0,1%, 0,1% de melanocitos. En formas de realización adicionales de la invención, las células NBDS aisladas son al menos puras al 95%, y tienen al menos un tipo de célula contaminante (por ejemplo, al menos un queratinocito) dentro de la población celular.

10 Estas células NBDS (o células NBDS aisladas) pueden estar contenidas dentro de composiciones con otros ingredientes, tales como, por ejemplo, plasma sérico, fibrina y/o hialurónico. En otras formas de realización, las células NBDS (o células NBDS aisladas) pueden estar constituidas en una composición adecuada para inyección, por ejemplo, Ringer lactato o una solución salina tamponada. Otros ingredientes que pueden utilizarse para formar las composiciones incluyen, por ejemplo, componentes de la matriz extracelular (por ejemplo, glucosaminoglicanos 15 (GAG), sulfato de heparina, sulfato de condroitina, sulfato de queratina, ácido hialurónico, albúmina (por ejemplo, albúmina humana), elastina, fibronectinas y lamininas), citocinas y quimioquinas (por ejemplo, factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) y sus isoformas, factor de crecimiento insulínico (IGF) y sus isoformas, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), proteína relacionada con la hormona paratiroidea, 20 factor de crecimiento de hepatocitos/factor de dispersión (HGF/SF), proteína estimulante de macrófagos (MSP), factor de crecimiento epidérmico (EGF), interleucina 6 (IL-6), factor 1 derivado de células estromales (SDF-1), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y/o diversos agentes terapéuticos (por ejemplo, agentes analgésicos, agentes antiinflamatorios y agentes inmunomoduladores). Sin embargo, en otras formas de realización, las células NBDS (y las células NBDS aisladas) se proporcionan en 25 composiciones que no tienen ninguno de los ingredientes mencionados anteriormente (incluyendo, por ejemplo, suero o plasma).

En la invención, se proporcionan composiciones para su uso en un método para tratar o prevenir lesiones en tendones, que comprende la etapa de administrar a un sujeto una composición que comprende células NBDS como 30 se describe anteriormente (y en formas de realización preferidas, células NBDS aisladas). En una forma de forma de realización, el sujeto es un mamífero seleccionado del grupo que consiste en seres humanos, caballos, cerdos, perros, gatos, cobayas, conejos, ratas y ratones.

En diversas formas de realización de la invención, la lesión del tendón es una rotura o desgarro del tendón, u otra 35 lesión seleccionada del grupo que consiste en tendinosis, tenosinovitis y avulsión. En aún otra forma de forma de realización, el tendón es un tendón de Aquiles o el tendón patelar. En otras formas de realización, el tendón es un tendón flexor, o un tendón extensor. En otras formas de realización, debe entenderse que las lesiones del tendón incluyen una amplia diversidad de enfermedades asociadas con tendones (incluyendo tendinopatías, tendinosis, 40 tendinitis, tenosinovitis, partenonitis, paratenonitis con teninosis y microdesgarros de un tendón) que también pueden tratarse utilizando las composiciones proporcionadas en el presente documento. Los tendones representativos que pueden tratarse incluyen, por ejemplo, a) el tendón de Aquiles (por ejemplo, tendinopatía de Aquiles de porción media; paratendinopatía de Aquiles; tendinopatía de Aquiles insercional; bursitis retrocalcánea; bursitis calcánea superficial; b) Tendones del hombro (por ejemplo, tendinopatía bicipital indiferencia; tendinopatía del manguito rotador; c) Tendones del codo (por ejemplo, epicondilitis media o lateral o codo de tenista) d) Mano y muñeca: (por 45 ejemplo, tendinopatía del flexor/extensor; tenosinovitis del flexor/extensor; enfermedad de De Quervain; y contractura de Dupuytren; e) tendopatías isquiotibiales y patelares con o sin microdesgarros; y f) fascitis plantar con o sin microdesgarros.

Los detalles de una o más formas de realización se exponen en la siguiente descripción. Otras características, 50 objetos y ventajas serán evidentes a partir de la descripción, los dibujos y las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

55 La Figura 1 ilustra la disección de un folículo piloso humano. La Figura 1A muestra un folículo piloso humano aislado, que se puede escindir por encima de la porción bulbar de la raíz del cabello (es decir, por encima de las células de las papilas dérmicas y la cápsula de la vaina dérmica), pero por debajo de la base del canal de la glándula sebácea, con el fin de obtener una vaina dérmica aislada (véase la Figura 1B). La estructura representada en la Figura 1B se puede separar en al menos dos componentes separados, como se muestra en las Figuras 1C y 1D. La Figura 1C representa la fibra capilar y la vaina radicular interna

asociada, y la vaina radicular externa que contienen predominantemente queratinocitos, y la Figura 1D es la vaina dérmica que contiene células NBDS (también conocida como la vaina de tejido conectivo).

La Figura 2 es una ilustración de un folículo piloso que representa el origen de las células de las papilas dérmicas ("DP"), las células de la cápsula de la vaina dérmica ("DSC") y las células de la vaina dérmica no bulbar ("NBDS").

La Figura 3 es una fotomicrografía de células NBDS en cultivo.

La Figura 4 ilustra células NBDS que se han teñido para la producción de colágeno. Más específicamente, una mezcla en gel de NBDS/plasma se sometió a un estiramiento leve después de 5 días (Figura 4A) y 12 días (Figura 4B). Las células en la Figura 4B son apreciablemente más oscuras que las de la Figura 4A, lo que indica la producción de colágeno Tipo 1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Como se señaló anteriormente, la presente invención proporciona células de la vaina dérmica no bulbar derivadas de folículo piloso para su uso en el tratamiento o prevención de lesiones en tendones en un mamífero. Sin embargo, antes de exponer la invención, puede ser útil para un entendimiento de la misma exponer primero definiciones de ciertos términos que se usan en lo sucesivo en el presente documento.

Las células de la vaina dérmica no bulbar, o células "NBDS", se refieren a células derivadas de la dermis (o más específicamente, derivadas de los folículos pilosos). En formas de realización preferidas, las células de la vaina se obtienen de la vaina dérmica externa de un folículo piloso, por encima de la porción bulbar de la raíz del pelo (es decir, por encima de las células de las papilas dérmicas y la cápsula de la vaina dérmica), pero por debajo de la base del canal de la glándula sebácea. Las células NBDS pueden identificarse fácilmente mediante una serie de métodos, incluyendo, por ejemplo, el método de preparación y cultivo (como se describe a continuación); morfología (véase, por ejemplo, la Figura 3); así como marcadores específicos de células (por ejemplo, las células NBDS son principalmente positivas para CD 90, CD73 y CD49b, y/o principalmente negativas para CD34, CD45 y KRT14, ya sea antes o después del cultivo). Sin embargo, en todos los casos, las células deben ser de origen dérmico, y más específicamente, de origen folicular.

Las células de la vaina dérmica no bulbar expandidas, o "células eNBDS", se refieren a las células NBDS que se han expandido durante varios pases en el cultivo, pero que conservan la capacidad de producir colágeno (por ejemplo, colágeno de tipo I), así como una diversidad de citocinas y quimiocinas. Como anteriormente, inesperadamente, las células eNBDS también pueden ser inmunorreguladoras. En formas de realización preferidas, las células se pueden expandir en cultivo durante 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 o más pases.

Las células NBDS "aisladas" se refieren a una población celular de más del 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o el 100% de células NBDS. Las células NBDS tienen la capacidad de producir colágeno (por ejemplo, colágeno tipo I), así como una diversidad de citocinas y quimiocinas. Inesperadamente, las células NBDS también pueden ser inmunorreguladoras, lo que las hace particularmente adecuadas para el tratamiento de lesiones en los tendones (por ejemplo, ayudando a suprimir cualquier respuesta inflamatoria).

En ciertas formas de realización, el software u otras técnicas de visualización que pueden utilizarse para visualizar células a una escala microscópica se pueden usar para evaluar el tamaño, la forma, la viabilidad y la granularidad de un gran número de células en un campo visual, y determinar el número de células NBDS (que son de tipo fibroblasto, como se muestra en la Figura 3), a diferencia de los queratinocitos, las DSC de melanocitos y otros tipos de células que tienen una morfología diferente). Por lo tanto, en una forma de realización, se proporcionan métodos para aislar células NBDS que comprenden la etapa de cultivar células en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 o 20 pases de un folículo piloso de manera que se produce una población aislada de células NBDS. En formas de realización preferidas, las células se colocan en placas o matraces que permiten que las células NBDS se adhieran, y con cada pase se eliminan las células no adherentes, y las células adherentes restantes se liberan (por ejemplo, mediante tripsinización), seguido de la adición de medio fresco. En dichas formas de realización, se puede determinar cuándo se ha obtenido una población suficiente de células NBDS aislando visualizando las células en el cultivo celular para evaluar el número de células NBDS frente a células no NBDS. Las técnicas de visualización incluyen, pero sin limitación, la visualización microscópica directa, la tinción de las células para los marcadores (o la falta de los mismos, por ejemplo, por falta de queratina), y el análisis de luz/láser para observar los patrones de difracción de los diferentes tipos de células (véase, generalmente, "Laser Scanning Microscopy and Quantitative Image Analysis of Neuronal Tissue" Lidia Bakota y Roland Brandt, eds., Humana Press, 2014; véase también "Imaging and Spectroscopic Analysis of Living Cells: Optical and Spectroscopic Techniques", Conn ed., Academic Press, 2012)

En otras formas de realización, los marcadores específicos de células (por ejemplo, las células NBDS son principalmente positivas para CD 90, CD73 y CD49b, y/o principalmente negativas para CD34, CD45 y KRT14 (opcionalmente antes o después del cultivo) pueden utilizarse para evaluar el grado de células NBDS frente a tipos de células contaminantes. "Applications of Flow Cytometry in Stem Cell Research and Tissue Regeneration", 5 Krishan, Krishnamurthy, and Totey eds., Wiley-Blackwell, 2010). Por ejemplo, las células NBDS aisladas se pueden preparar a) obteniendo uno o más folículos pilosos vitales; b) liberando células del folículo piloso (por ejemplo, mediante el uso de enzimas, o cultivando células en crecimiento fuera del folículo piloso); y c) clasificando las células (por ejemplo, mediante citometría de flujo o a través del uso de perlas magnéticas) para obtener una población de células NBDS aisladas. En ciertas formas de realización, las células en cualquier fase del proceso pueden cultivarse 10 opcionalmente como se describe anteriormente (por ejemplo, las células pueden cultivarse durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 o 20 pases como se ha descrito anteriormente, y las células resultantes se aíslan adicionalmente, por ejemplo, mediante citometría de flujo o perlas magnéticas.

En las formas de realización preferidas, las células NBDS aisladas son al menos un 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o un 15 100% positivas para uno o más de los marcadores positivos descritos anteriormente, y/o al menos un 80%, 90%, 95%, o un 98% negativas para uno de los marcadores negativos descritos anteriormente.

En las formas de realización preferidas (y utilizando cualquiera de las técnicas descritas en el presente documento), las células NBDS aisladas tienen menos del 15%, 10%, 5% o el 1% de queratinocitos dentro de la población celular 20 y/o menos del 15%, 10%, 5% o 1% de melanocitos dentro de la población celular. Sin embargo, en formas de realización adicionales, la población de células NBDS aisladas se deriva de una población de células dérmicas (preferiblemente de folículos pilosos) que tienen algunos tipos de células contaminantes, incluyendo, por ejemplo, al menos el 1, 5, 10, 0,01%, 0,1 %, o el 1% de queratinocitos en la población celular, y/o al menos el 5, 10, 0,1%, 0,1% de melanocitos.

25 "Lesiones en los tendones" como se utiliza en el presente documento, debe entenderse que se refieren a una amplia diversidad de afecciones diferentes relacionadas con un tendón que dan como resultado, o pueden eventualmente dar como resultado dificultades en la utilización adecuada del tendón (y estructuras asociadas con el tendón, tales como hueso y músculo). Las lesiones en los tendones pueden incluir lesiones traumáticas (por ejemplo, debido a 30 una lesión deportiva, sobrecarga o una intervención médica o quirúrgica), lesiones de origen genético y enfermedades (que pueden ser causadas por cualquiera de las anteriores. Las lesiones representativas en los tendones incluyen, pero sin limitación, tendinopatías, tendinosis, tendinitis, tenosinovitis, partenonitis, paratenonitis con tendinosis y microdesgarros de un tendón. Los tendones representativos que pueden tratarse incluyen, por ejemplo, a) el tendón de Aquiles (por ejemplo, tendinopatía de Aquiles de porción media; paratendinopatía de 35 Aquiles; tendinopatía de Aquiles insercional; bursitis retrocalcánea; bursitis calcánea superficial; b) Tendones del hombro (por ejemplo, tendinopatía bicipital indiferencia; tendinopatía del manguito rotador; c) Tendones del codo (por ejemplo, epicondilitis media o lateral o codo de tenista) d) Mano y muñeca: (por ejemplo, tendinopatía del flexor/extensor; tenosinovitis del flexor/extensor; enfermedad de De Quervain; y contractura de Dupuytren; e) 40 tendopatías isquiotibiales y patelares con o sin microdesgarros; y f) fascitis plantar con o sin microdesgarros.

40 PREPARACIÓN DE NBDS

Como se ha indicado anteriormente, la presente descripción métodos para aislar células NBDS. En un aspecto, tales métodos comprenden las etapas de (a) preparar cabello vital; y (b) cultivar el cabello vital de manera que se pueda 45 obtener una población de células NBDS. Con respecto a la etapa (a), se puede utilizar una amplia diversidad de métodos para obtener cabello vital, incluyendo, por ejemplo, métodos quirúrgicos para retirar una diversidad de folículos pilosos (junto con la piel), o arrancando uno o más folículos pilosos directamente de un sujeto.

Una vez que se ha obtenido el cabello vital, se puede cultivar en condiciones que permiten, y preferiblemente, 50 promueven el crecimiento de células NBDS. En formas de realización preferidas, este cultivo es en condiciones en las que se permite que proliferen células de tipo fibroblasto. En formas de realización preferidas, la etapa de cultivo se realiza con medio sin suero. Después de varios pases (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 10 o más pases), las células cultivadas se analizan como se ha descrito anteriormente para determinar si hay una cantidad suficiente de células NBDS, y si las células se han aislado suficientemente de las células contaminantes.

55 En otros aspectos, se proporcionan métodos que comprenden las etapas de (a) preparar cabello vital; (b) escindir el cabello preparado en la etapa (a) para retirar el bulbo del folículo piloso (que contiene la cápsula de la vaina dérmica y la papila dérmica); (c) aislar el tejido de la vaina dérmica no bulbar; y (d) cultivar el tejido aislado de la vaina dérmica no bulbar para producir células NBDS.

- Para preparar un cabello vital (o "vivo"), se obtiene típicamente una muestra de un sujeto dado (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano, caballos, cerdos, gatos, perros, conejos, cobayas, ratas o ratones). La muestra se puede obtener de una diversidad de sitios (por ejemplo, para seres humanos, del área occipital del cuero cabelludo, el pecho o el muslo, y para caballos de la melena o la cola). La muestra se puede obtener a través de una biopsia u otro medio adecuado (por ejemplo, "arrancándola" o por disección). Preferiblemente, se seleccionan los folículos pilosos en la fase anágena de desarrollo, aunque también se pueden utilizar otras fases de desarrollo (por ejemplo, la fase catágena).
- 10 Una vez que la muestra se obtiene del sujeto, la muestra se separa entonces para aislar el folículo piloso, típicamente utilizando un micromanipulador y un bisturí, aunque también se pueden utilizar otros instrumentos tales como agujas. En ciertas formas de realización, el folículo piloso aislado como se muestra en la Figura 1A puede escindirse adicionalmente por encima de la porción bulbar de la raíz del cabello (es decir, por encima de las células de las papilas dérmicas y la cápsula de la vaina dérmica), pero por debajo de la base del canal de la glándula sebácea, con el fin de obtener una vaina dérmica aislada (véase la Figura 1B). La estructura representada en la
- 15 Figura 1B se puede separar en al menos dos componentes separados, como se muestra en las Figuras 1C y 1D. La Figura 1C representa la fibra capilar y la vaina radicular interna asociada, y la vaina radicular externa que contienen predominantemente queratinocitos, y la Figura 1D es la vaina dérmica que contiene células NBDS (también conocida como la vaina de tejido conectivo).
- 20 La vaina dérmica (Figura 1D), en ciertas formas de realización, puede separarse adicionalmente, por ejemplo, cortando longitudinalmente, o usando técnicas tal como digestión enzimática (por ejemplo, con enzimas de digestión de colágeno tales como colagenasa, dispasa y leupeptina).
- 25 Las células NBDS que contienen la vaina dérmica, o las células NBDS separadas, se pueden cultivar entonces en un medio (con o sin suero) que promueva la proliferación celular (véase, por ejemplo, la Figura 3). Los medios adecuados incluyen, por ejemplo, DMEM/Hams F12 complementado con factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), suero fetal de ternero/bovino y antibióticos. Como alternativa, las células se pueden replicar en un proceso sin suero, en el que se utilizan diversas combinaciones de medios libres de suero y complementos. Los ejemplos de medio
- 30 libre de suero incluyen complementos de suero que contienen X-Vivo™ y TheraPEAK™ FGM-CD™ y/o extracto de plaquetas de origen humano. Después de 3 a 5 días, se añade típicamente medio de proliferación fresco al medio de cultivo. Posteriormente, el medio se puede cambiar cada 2 a 4 días. Cuando el cultivo ha alcanzado aproximadamente del 80 al 90% de confluencia, las células se desprenden del matraz de cultivo a través de tripsinización y se siembran en un matraz de cultivo tisular más grande. Esta etapa se repite para una serie de pases
- 35 (por ejemplo, 2, 4 o 6) hasta obtener aproximadamente de 5 a 100 millones de células.

Una vez obtenido el número deseado de células, las células se lavan varias veces, se tripsinizan y se resuspenden en medio de transporte celular (CTM), que está compuesto por lactato de ringer, albúmina de suero humano al 10% (HAS) y dimetilsulfóxido al 5% (DMSO). Las células se cuentan y se ajustan para proporcionar la concentración final de 20 millones de células/ml y se almacenan en nitrógeno líquido.

PREPARACIÓN DE COMPOSICIONES QUE CONTIENEN CÉLULAS NBDS

- Como se ha indicado anteriormente, las células NBDS (y células NBDS aisladas) pueden estar contenidas dentro de
- 45 composiciones con otros ingredientes, tales como, por ejemplo, suero, plasma, plasma rico en plaquetas, albúmina (por ejemplo, albúmina humana), fibrina y/o ácido hialurónico. También se pueden utilizar otros productos disponibles comercialmente para preparar composiciones adecuadas, incluyendo, por ejemplo, TISSEEL y COSEAL (disponibles en Baxter), TISSUCOL, BERIPLAST, QUIXIL, TACHOSIL y EVICEL. También se pueden utilizar otras
- 50 composiciones a base de polímeros, incluyendo, por ejemplo, polietilenglicoles, ácidos polilácticos y policaprolactonas. En formas de realización preferidas, la composición se proporciona en una o dos partes (por ejemplo, en una jeringa de doble cilindro que mezcla componentes) que fluye libremente y es inyectable.

También pueden incluir otros ingredientes con estas composiciones incluyendo, por ejemplo, componentes de la matriz extracelular (por ejemplo, glucosaminoglicanos (GAG), sulfato de heparina, sulfato de condroitina, sulfato de queratina, ácido hialurónico, elastina, fibronectinas y lamininas), citocinas y quimiocinas (por ejemplo, factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) y sus isoformas, factor de crecimiento insulínico (IGF) y sus isoformas, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), proteína relacionada con la hormona paratiroidea, factor de crecimiento de hepatocitos/factor de dispersión (HGF/SF), proteína estimulante de macrófagos (MSP), factor de crecimiento epidérmico (EGF), interleucina 6 (IL-6), factor 1 derivado de células

estromales (SDF-1), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y/o diversos agentes terapéuticos (por ejemplo, agentes analgésicos, agentes antiinflamatorios y agentes inmunomoduladores).

5 MÉTODOS PARA TRATAR LESIONES EN LOS TENDONES UTILIZANDO CÉLULAS NBDS

También se proporcionan métodos para tratar o prevenir lesiones en los tendones, que comprenden la etapa de administrar a un sujeto una composición que comprende células NBDS (incluyendo composiciones con células NBDS aisladas como se describe anteriormente). Típicamente, las células se administran por inyección, aunque en
10 diversas formas de realización, en la medida en que se emplee un método quirúrgico, las células pueden proporcionarse directamente en una herida abierta. Los ejemplos representativos de los métodos adecuados de inyección incluyen una jeringa estándar, así como dispositivos especializados tales como los descritos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 12/153.248 y la Pub. PCT WO/2013/113121.

15 Se puede tratar o prevenir una amplia diversidad de lesiones en los tendones utilizando las células NBDS (y las células NBDS aisladas) y los métodos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, se pueden tratar las roturas o desgarros de los tendones de accidentes o lesiones, daños causados por cirugías o reparación. Además, también se pueden tratar otras lesiones crónicas, incluyendo, por ejemplo, tendinopatías tales como tendinitis o tendinosis, tenosinovitis y avulsión.

20 Se pueden tratar una amplia diversidad de tendones con las células NBDS (y las células NBDS aisladas) y las composiciones proporcionadas en el presente documento. Por ejemplo, en una forma de realización se tratan los tendones que se han lesionado debido a una enfermedad y/o traumatismo (por ejemplo, por un trauma médico o quirúrgico u otra lesión). Los tendones pueden romperse y/o pueden tener desgarros completos o parciales (o

25 microdesgarros). Los ejemplos de lesiones asociadas a los tendones incluyen, pero sin limitación, tendinopatías, tendinosis, tendinitis, tenosinovitis, partenonitis, paratenonitis con tendinosis y microdesgarros de un tendón. Los tendones representativos que pueden tratarse incluyen, por ejemplo, a) el tendón de Aquiles (por ejemplo, tendinopatía de Aquiles de porción media; paratendinopatía de Aquiles; tendinopatía de Aquiles insercional; bursitis retrocalcánea; bursitis calcánea superficial: b) Tendones del hombro (por ejemplo, tendinopatía bicipital indiferencia; tendinopatía del manguito rotador: c) Tendones del codo (por ejemplo, epicondilitis media o lateral o codo de tenista)
30 d) Mano y muñeca: (por ejemplo, tendinopatía del flexor/extensor; tenosinovitis del flexor/extensor; enfermedad de De Quervain; y contractura de Dupuytren; e) tendopatías isquiotibiales y patelares con o sin microdesgarros; y f) fascitis plantar con o sin microdesgarros.

35 Se puede tratar un gran número de especies con células NBDS (y células NBDS aisladas) y las composiciones proporcionadas en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, mamíferos tales como seres humanos, caballos, cerdos, perros, gatos, conejos, cobayas, ratas y ratones.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben entenderse como limitantes del alcance de la invención.

40

Ejemplo 1

Muestreo tisular

45 Una biopsia de piel del área occipital del cuero cabelludo se obtiene de un sujeto de la siguiente manera. Brevemente, una vez que se ha seleccionado un área apropiada del cuero cabelludo, se afeita con cortadoras de pelo, asegurando que queden pelos incipientes. Después, el área de la biopsia se desinfecta a fondo y se anestesia. Una vez que la anestesia ha surtido efecto, se extrae suavemente una biopsia de perforación de 4-10 mm del sitio
50 de la biopsia y se cierra la incisión con suturas que se pueden extraer 12-14 días después. La biopsia de piel luego se envasa en condiciones asépticas en un tubo de biopsia pre-etiquetado que contiene medio de transporte de biopsia, compuesto por DMEM/Hams F12 con antibióticos.

Ejemplo 2

55 Aislamiento y cultivo de células NBDS

Se realiza una prueba de esterilidad en el medio en el que se ha transportado la biopsia para garantizar que la muestra esté libre de contaminación, o como alternativa, si la muestra está contaminada, para garantizar que posteriormente se utiliza el medio con antibióticos. Después, la biopsia se lava varias veces para eliminar el medio

de transporte de biopsia y cualquier resto para preparar el tejido para su posterior procesamiento. Los folículos pilosos se procesan en Hams F10 cortando el epitelio de la piel con un bisturí estéril y "arrancando" o diseccionando la totalidad de la unidad del folículo piloso del tejido dérmico circundante utilizando pinzas estériles. El folículo piloso se sujeta con una pinza lo más cerca posible de la superficie de la piel y el folículo se expone tirando del cabello en la unidad del folículo piloso. Los folículos en la fase anágena (fase de crecimiento del ciclo del cabello, indicada por la vaina de la raíz externa visible, y DSC del bulbo piloso) se seleccionan para su procesamiento adicional.

El aislamiento de NBDS se realiza en Hams F10 desprendiendo en primer lugar las células de la cápsula de la vaina dérmica folicular y la papila del resto del folículo piloso utilizando un mini-bisturí fino estéril o aguja, y se desecha. Se retiran las células NBDS que contienen la vaina dérmica, y se prepara el tejido para el cultivo.

Se colocan suavemente entre seis y diez tejidos de la vaina dérmica en gel de ácido hialurónico al 3% y se cubren con medio de cultivo promotor de la proliferación celular tal como, por ejemplo, DMEM/Hams F12 complementado con FGF, FCS al 10% y antibióticos. Después de 3 a 5 días, se añade medio de proliferación fresco al cultivo. Posteriormente el medio se cambia cada 2 a 4 días. Cuando el cultivo ha alcanzado aproximadamente del 80 al 90% de confluencia, las células se desprenden del matraz de cultivo a través de tripsinización y se siembran en matraces de cultivo tisular más grandes. Esta etapa se repite en cuatro pases para obtener aproximadamente 100 millones de células.

Una vez que se obtienen aproximadamente 100 millones de células, las células se lavan con PBS, se tripsinizan y se suspenden de nuevo en medio de transporte celular (CTM: lactato de ringer que contenía albúmina de suero humano al 10% y dimetilsulfóxido al 5%). Las células se sedimentan por centrifugación y se agrupan. El sobrenadante se aspira y el sedimento celular se resuspende en CTM. Se extraen dos muestras de células/alícuotas de la mezcla célula-CTM para el control de calidad y el recuento de células. Después de contar las células, se sedimentan una vez más mediante centrifugación, y el sedimento resultante se suspende de nuevo en CTM para obtener una concentración final de 20 millones de células/ml. Los productos celulares finales se almacenan por debajo de -130 °C en nitrógeno líquido hasta el envío.

Ejemplo 3

30

Preparación y administración de células NBDS en un tendón

Las células se preparan para su uso en una jeringa de dos cámaras. La primera cámara contiene aproximadamente 20 millones de células suspendidas en 1 ml de volumen total. La segunda cámara contiene 1,5 ml de plasma autólogo del paciente (preparado por separado antes de este procedimiento).

La jeringa de dos cámaras se utiliza para inyectar células (con guía de ultrasonidos) en múltiples ubicaciones del tendón a reparar.

Ejemplo 4

Síntesis de colágeno tipo I en estudios de estiramiento tendinoso

En resumen, se descongelan 1,5 ml de células NBDS congeladas (un total de 3 millones de células) mezclando con 0,15 ml de CaCl₂ (solución madre 500 mM). Se añaden 1,5 ml de plasma y la suspensión se transfiere a un molde de colada ovalado. Después de aproximadamente una hora, se formará un gel que se puede retirar del molde. El anillo se coloca entonces en una máquina que puede estirar la estructura anular moldeada en el tiempo. Se pueden tomar medidas en cuanto a las fuerzas de estiramiento que se aplican con el tiempo.

El anillo moldeado también puede retirarse, fijarse en paraformaldehído y teñirse inmunohistoquímicamente para detectar la presencia de una o más proteínas (por ejemplo, colágeno tipo I, colágeno tipo III, Biglicano, Tenascina C, Elastina, Tenomodulina y Decorina).

Como se muestra en la Figura 4, la mezcla en gel de NBDS/plasma se sometió a un estiramiento leve después de 5 días (Figura 4A) y 12 días (Figura 4B). Las muestras se inmunotifieron para la producción de colágeno tipo 1 (con peroxidasa de rábano picante). La Figura 4B es particularmente más oscura (marrón) que la Figura 4A, lo que indica que las células eran positivas para la producción de colágeno, que aumentó después del estiramiento mecánico. Los resultados de estos estudios demuestran claramente que las células NBDS son capaces de producir colágeno y formar estructuras de tipo tendón *in vitro*. En particular, las células dentro del gel moldeado están orientadas de

acuerdo con la dirección del estiramiento (como las células en un tendón normal).

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende células de la vaina dérmica no bulbar aisladas para su uso en un método para tratar o prevenir las lesiones de los tendones.
5
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además suero y/o plasma.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha composición no contiene suero o plasma.
10
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además fibrina, ácido hialurónico, componentes de la matriz extracelular, citocinas, quimiocinas, agentes analgésicos, agentes antiinflamatorios o agentes inmunomoduladores.
15
5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dichos componentes de la matriz extracelular se seleccionan del grupo que consiste en glucosaminoglicanos (GAG), sulfato de heparina, sulfato de condroitina, sulfato de queratina, ácido hialurónico, elastina, fibronectinas y lamininas.
- 20 6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dichas citocinas se seleccionan del grupo que consiste en el factor del crecimiento transformante beta (TGF-beta) y sus isoformas, el factor de crecimiento insulínico (IGF) y sus isoformas, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), proteína relacionada con la hormona paratiroidea, factor de crecimiento de hepatocitos/factor de dispersión (HGF/SF), proteína estimulante de macrófagos (MSP), factor de crecimiento epidérmico (EGF), interleucina 6 (IL-6), factor 1 derivado de células estromales (SDF-1), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).
25
7. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que dicho sujeto es un mamífero seleccionado del grupo que consiste en seres humanos, caballos, perros y gatos.
30
8. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicha lesión del tendón es una rotura, completa, parcial o microdesgarro del tendón.
9. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicha lesión del tendón se selecciona del grupo que consiste en tendinosis, tenosinovitis y avulsión.
35
10. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicho tendón es un tendón de Aquiles, un tendón patelar, un tendón flexor o un tendón extensor.
- 40 11. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior preparada de acuerdo con un método que comprende:
45
- (a) preparar el cabello vital;
 - (b) escindir el cabello preparado en la etapa (a) para retirar el bulbo del folículo piloso;
 - (c) aislamiento del tejido de la vaina dérmica no bulbar; y
 - (d) cultivar el tejido aislado de la vaina dérmica no bulbar para producir células NBDS.
- 50 12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el método de preparación comprende además la etapa de realizar la digestión enzimática de dicho tejido aislado de la vaina dérmica no bulbar, particularmente en la que dicha digestión enzimática se realiza con colagenasa.
13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dicho cabello vital se ha obtenido mediante biopsia del cuero cabelludo occipital de un sujeto.
- 55 14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dicho cabello se ha escindido utilizando un micromanipulador y un bisturí.
- 60 15. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dichas células de la vaina dérmica no bulbar se han cultivado en múltiples pases en medio que contiene suero o medio libre de suero.

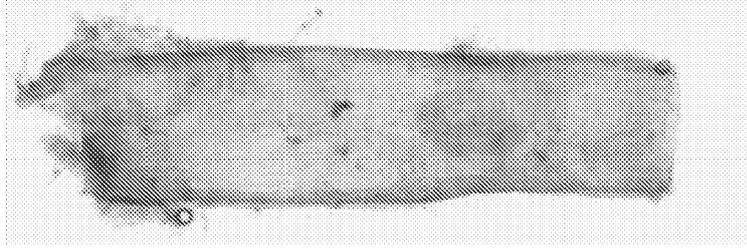


FIG. 1D

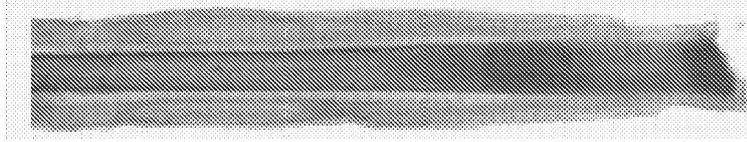


FIG. 1C

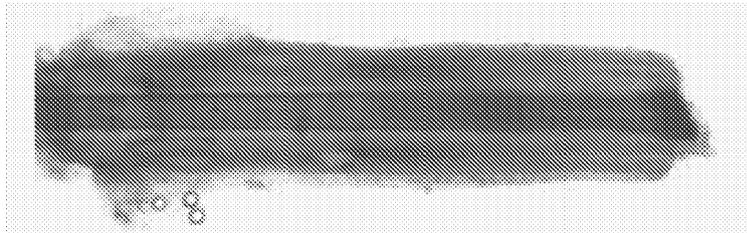


FIG. 1B

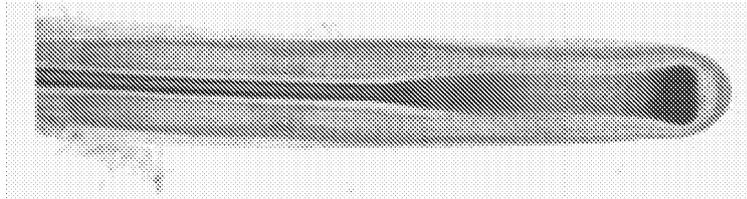


FIG. 1A

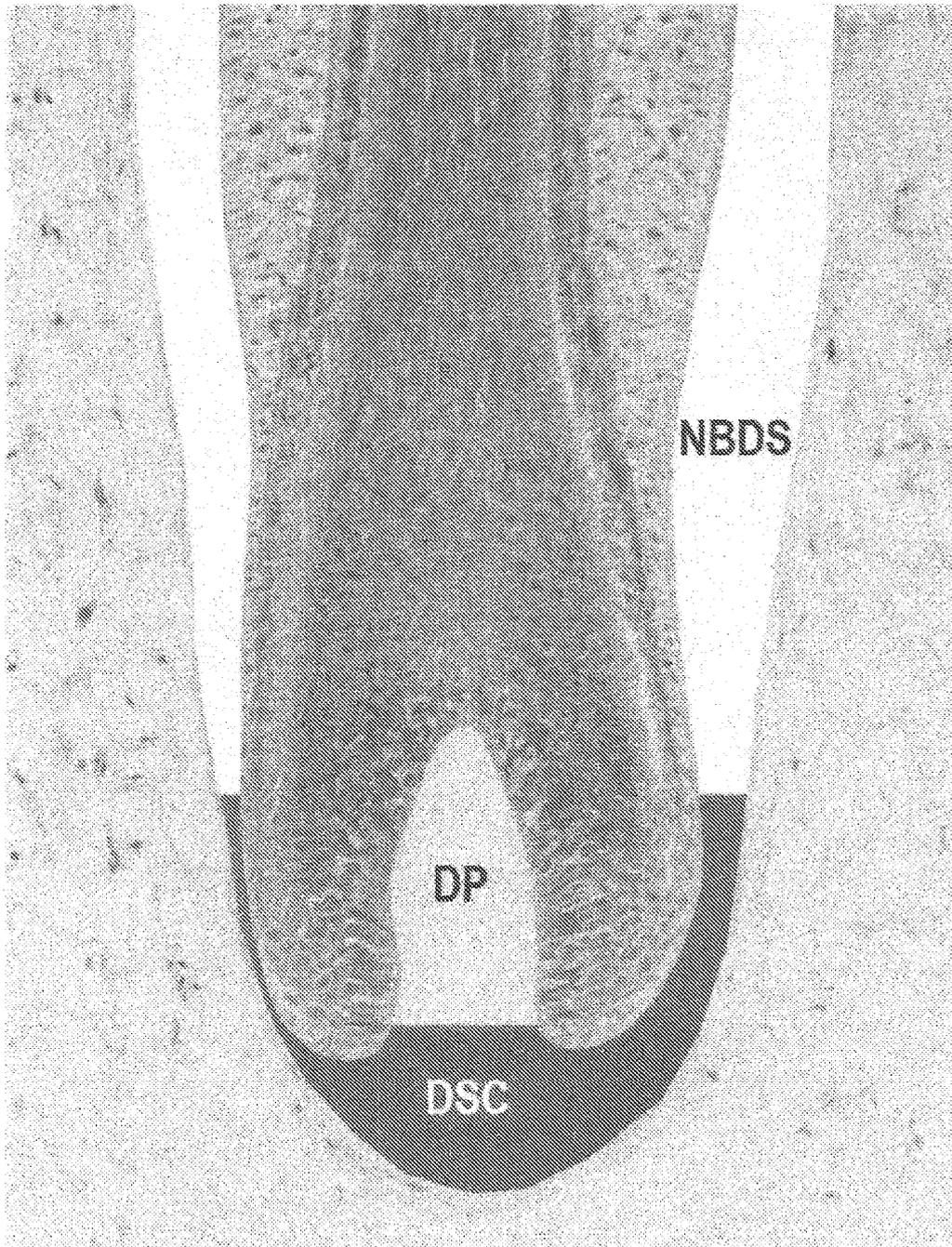


FIG. 2

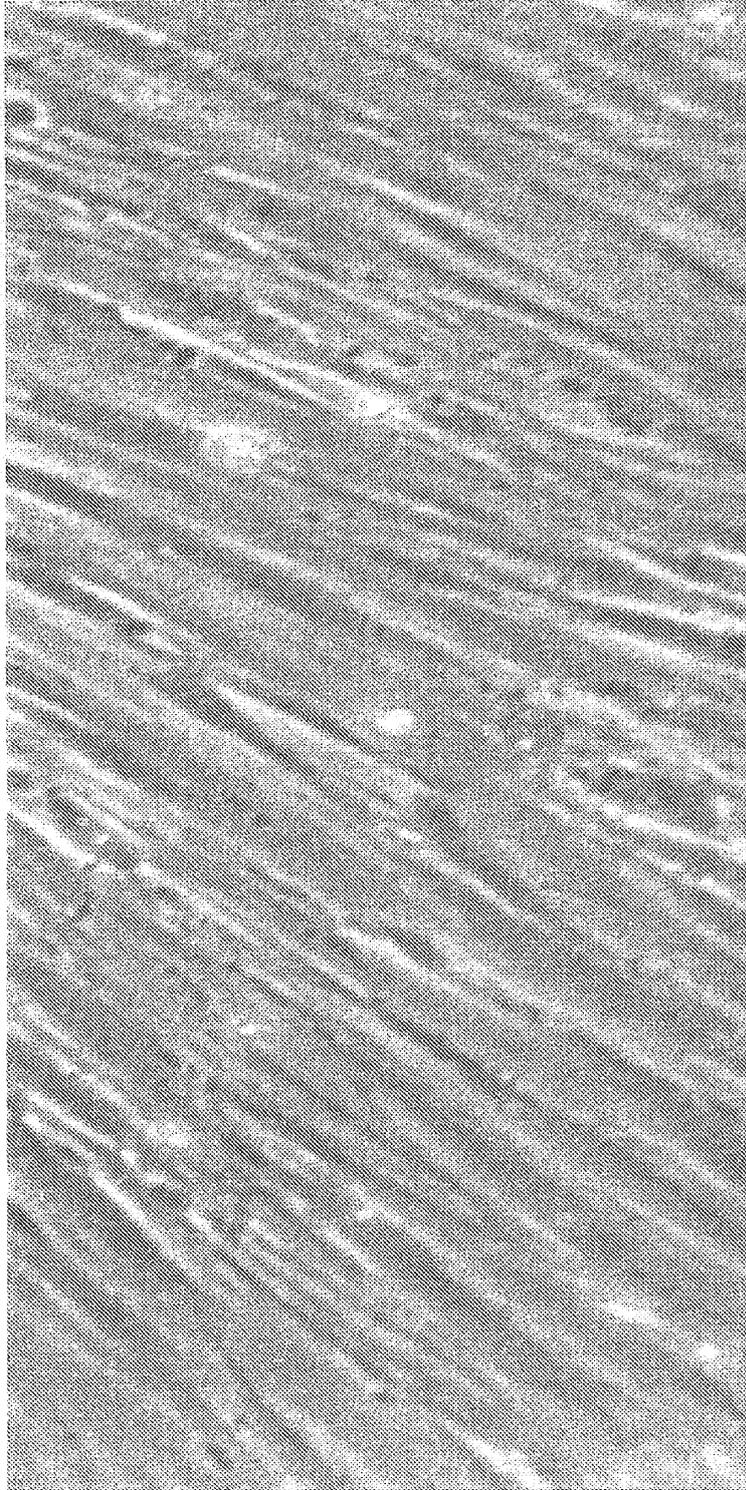


FIG. 3

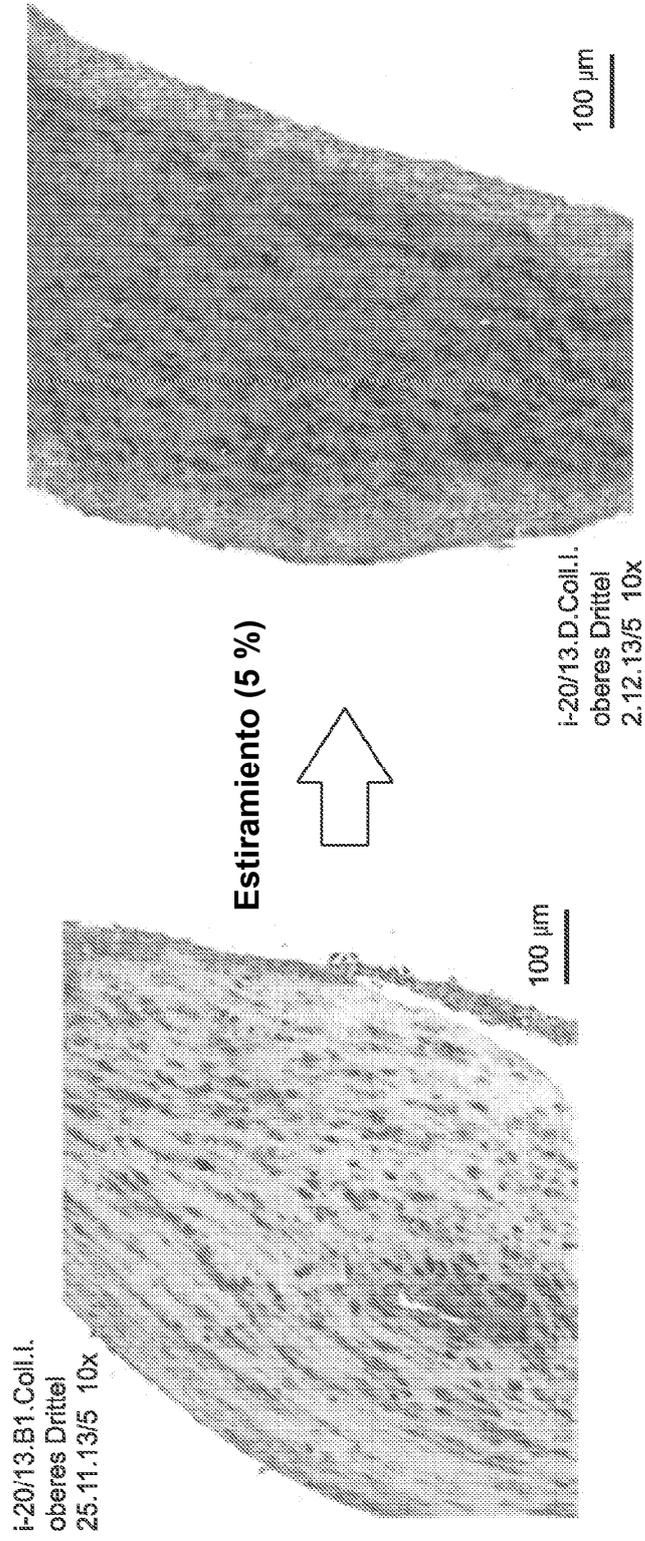


FIG. 4B

FIG. 4A