

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 180**

51 Int. Cl.:

A61K 35/35 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2012 PCT/AU2012/001140**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13040649**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2012 E 12833860 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 2744892**

54 Título: **Productos terapéuticos usando células adiposas y secreciones celulares**

30 Prioridad:

**23.09.2011 AU 2011903938
04.04.2012 AU 2012901350
23.08.2012 AU 2012903646**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.07.2019

73 Titular/es:

**CELL IDEAS PTY LTD. (100.0%)
25 Bridge Street
Pymble, NSW 2073, AU**

72 Inventor/es:

**VESEY, GRAHAM;
WEBSTER, REBECCA ANNE y
LILISCHKIS, RICHARD**

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 721 180 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

Productos terapéuticos usando células adiposas y secreciones celulares

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición congelada que comprende células de la progenie de cultivo de células sometidas a múltiples pases de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo y secreciones de células derivadas de tejido adiposo, en la que dichas secreciones comprenden medios clarificados y/o concentrados de cultivo de células derivadas de tejido adiposo que han surgido como células de la progenie o una línea celular de cultivo anterior para su uso en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en un trastorno inflamatorio, una lesión de ligamentos y una lesión de tendón, o alivio del dolor asociado con un trastorno inflamatorio, una lesión de ligamentos o una lesión de tendón, en un sujeto mamífero, en el que la composición se administra a un sujeto después de descongelar la composición. En los métodos de la divulgación, las composiciones se administran a un sitio en un paciente alejado del sitio afectado por el trastorno o afección inflamatoria. La invención también se refiere al uso de dichas composiciones en composiciones farmacéuticas y métodos para el tratamiento o prevención de enfermedades en un animal de cría intensiva, en el que dicha administración es por inyección subcutánea o intramuscular. La invención también se refiere a la composición para su uso en el tratamiento del dolor en un sujeto, siendo el tratamiento por inyección subcutánea o inyección intramuscular. La invención también se refiere a una composición para su uso en el tratamiento del dolor neuropático en un sujeto. La descripción también se refiere a métodos, agentes y composiciones mejorados para la crioconservación de células.

Antecedentes de la invención

El tejido adiposo contiene una población celular de grandes adipocitos llenos de lípidos, y una población de células no adipocitarias, que comprende células asociadas con diversas fibras conectivas y células asociadas con capilares y vasos sanguíneos más grandes. También se cree que la población de células no adipocitarias comprende una población de células madre adultas derivadas de tejido adiposo y, por consiguiente, ha habido interés en usar tejido adiposo como fuente de células madre aisladas para diversas aplicaciones terapéuticas.

En general, los métodos para obtener presuntas células madre derivadas de tejido adiposo implican agotar los adipocitos de las células no adipocitarias derivadas de tejido adiposo, lo que requiere digerir el tejido adiposo con enzimas tal como colagenasa, y después separar las células liberadas mediante centrifugación de la muestra digerida. Durante la centrifugación, las células no adipocitarias derivadas de tejido adiposo se separan de los adipocitos para formar un sedimento, mientras que los adipocitos que contienen lípidos flotan. La fracción de células no adipocitarias se utiliza entonces como fuente de células madre de tejido.

El documento de patente WO 2005/035742 A2 se refiere a métodos para preparar y usar composiciones que comprenden poblaciones de células madre, métodos para tratar y prevenir una lesión o enfermedad usando las composiciones de células madre y kits que comprenden composiciones de células madre.

El documento de patente WO 2003/040346 A2 proporciona células y métodos basados en el uso de células estromales para apoyar la proliferación de células madre embrionarias o adultas no diferenciadas *in vitro*.

Blaber et al. Journal of Translational Medicine 2012, 10:172 describe el análisis de los perfiles de secreción *in vitro* de poblaciones de células derivadas de tejido adiposo e informa que el uso de poblaciones mixtas de células adiposas no parece inducir estrés celular y da como resultado perfiles de secreción mejorados.

Los presentes inventores han descrito anteriormente el uso de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo que comprende adipocitos para la preparación de una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio o el alivio del dolor asociado con un trastorno inflamatorio en un sujeto, y para el tratamiento y alivio de dolor de afecciones tales como un cartílago o trastornos óseos. Esto se describe en la Patente Australiana N.º 2009201915 y en la Publicación Internacional N.º WO2010/020005. Los presentes inventores también han descrito anteriormente el uso de secreciones de células derivadas de tejido adiposo para la preparación de composiciones para su uso en el tratamiento de diversas afecciones y enfermedades, incluyendo el alivio del dolor asociado con dichas afecciones.

Las generaciones de cría selectiva de animales para ciertos rasgos deseables, tales como rápido crecimiento, conversión eficiente de la alimentación y acumulación de masa muscular en animales criados para la producción de

- carne, o calidad y volumen de leche en animales lecheros, también han dado como resultado razas modernas de animales que a menudo son propensos a una mayor incidencia de afecciones de salud perjudiciales que los animales de cría menos intensiva o seleccionados, tales como poblaciones salvajes. La incidencia clínica o el efecto de dichos rasgos perjudiciales se pueden exacerbar por la forma en que se crían los animales, tal como en las operaciones de cría intensiva. Las razas modernas de cerdos, criadas en condiciones intensivas, por ejemplo, son propensas a debilidad en las patas, tal como osteocondrosis (OCD), artritis, un alto riesgo de infección bacteriana clínica y subclínica, todos los cuales tienen el potencial de afectar perjudicialmente al bienestar general del animal y, por lo tanto, afectar negativamente a la explotación agrícola.
- 10 Sigue existiendo la necesidad de métodos mejorados para el tratamiento de afecciones inflamatorias, lesiones de ligamentos y tendones y composiciones para su uso en las mismas. Sigue existiendo la necesidad de métodos mejorados para el tratamiento y prevención de afecciones perjudiciales asociadas con la cría intensiva de animales. Sigue existiendo la necesidad del tratamiento del dolor en un sujeto y composiciones para su uso en el mismo.

15 Resumen de la invención

- Los métodos descritos previamente para el tratamiento de trastornos inflamatorios utilizando suspensiones de células derivadas de tejido adiposo y composiciones libres de células muestran la administración de la composición o suspensión en el área afectada, tal como la inyección intraarticular en el caso de una articulación artrítica. Sorprendentemente, el inventor ha identificado ahora que no se requiere la administración directa de la composición terapéutica en el área afectada. El inventor ha identificado sorprendentemente que la administración remota de una composición que comprende secreciones de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo o de una composición que comprende una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o de una combinación de la misma, también puede ser eficaz en el tratamiento de dichas afecciones.

- 25 Los inventores han identificado sorprendentemente que pueden usarse células madre congeladas, tales como células madre mesenquimales, tales como células madre derivadas de tejido adiposo, como agentes terapéuticos en el tratamiento de diversas afecciones. Sorprendentemente, dichas células congeladas pueden usarse sin la necesidad de cultivar las células después de la recuperación del almacenamiento congelado. Los inventores también han identificado que el almacenamiento de células en presencia de secreciones derivadas de células mejora la viabilidad y el potencial de proliferación de las células madre crioconservadas, incluidas las células derivadas de tejido adiposo.

- Por consiguiente, en una primera forma de realización de la invención se proporciona una composición congelada que comprende células de la progenie de cultivo de células sometidas a múltiples pases de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo y secreciones de células derivadas de tejido adiposo, en la que dichas secreciones comprenden medios clarificados y/o concentrados de cultivo de células derivadas de tejido adiposo que han surgido como células de la progenie o una línea celular de cultivo anterior para su uso en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en un trastorno inflamatorio, una lesión de ligamentos y una lesión de tendón, o alivio del dolor asociado con un trastorno inflamatorio, una lesión de ligamentos o una lesión de tendón, en un sujeto mamífero, en el que la composición se administra a un sujeto después de descongelar la composición. En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos comprende agregados de células y/o comprende trozos de tejido adiposo. En una forma de realización, la suspensión celular comprende adipocitos. En una forma de realización, la suspensión celular está sustancialmente libre de adipocitos. En una forma de realización, las secreciones de células derivadas de tejido adiposo comprenden un líquido portador seleccionado de medio de cultivo celular y agua destilada. En una forma de realización, una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o una combinación de secreciones de células derivadas de tejido adiposo y una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos comprende un líquido portador que es un medio de cultivo celular, tal como DMEM.

- En una forma de realización, el trastorno o afección inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en osteoartritis, enfermedad de la babilla, malformaciones cervicales, una lesión de tendón y una lesión de ligamento. En una forma de realización, el trastorno inflamatorio es dermatitis atópica. En una forma de realización, el trastorno o afección inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, dolor de espalda y esclerosis múltiple. En una forma de realización, el trastorno o afección inflamatoria es una enfermedad impulsada por el sistema inmune. En una forma de realización, el uso de la composición es en un método que comprende la administración de secreciones de células derivadas de tejido adiposo. En una forma de realización, el uso de la composición es en un método que comprende la administración de una suspensión de células derivadas de tejido

adiposo. En una forma de realización, la administración es administración subcutánea. En una forma de realización, la administración es la administración intramuscular. En una forma de realización, la administración es en la grupa, el brazo o las nalgas. En una forma de realización, la administración es en el cuello del sujeto, tal como la nuca del sujeto, tal como el cogote cuando el sujeto es un perro o un gato.

5

En un aspecto de la divulgación que se describe en el presente documento, se proporciona un método para tratar una enfermedad o afección articular en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende (i) secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o (ii) una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o (iii) una combinación de (i) y (ii), en el que dicha administración a dicho sujeto se encuentra en un sitio alejado del sitio de dicha afección. En un aspecto el sujeto es un sujeto mamífero. En un aspecto, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos comprende agregados de células y/o comprende trozos de tejido adiposo. En un aspecto, las secreciones de células derivadas de tejido adiposo comprenden un líquido portador seleccionado de medio de cultivo celular y agua destilada. En un aspecto, una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o una combinación de secreciones de células derivadas de tejido adiposo y una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos comprende un líquido portador que es un medio de cultivo celular, tal como DMEM. En un aspecto, el tratamiento comprende administrar una composición farmacéutica que comprende una suspensión de células derivadas de tejido adiposo a dicho mamífero mediante inyección subcutánea. En un aspecto, la suspensión celular administrada por vía subcutánea está sustancialmente libre de adipocitos. En un aspecto, la suspensión celular administrada por vía subcutánea comprende adipocitos.

En un aspecto, el sujeto mamífero es un animal equino, felino, canino, bovino o porcino. En un aspecto el sujeto es un ser humano. En un aspecto el sujeto es un ave de corral.

25

En un aspecto, la administración es administración subcutánea. En un aspecto, la administración es administración intramuscular. En un aspecto, la administración es en la grupa, el brazo o las nalgas. En un aspecto, la administración es en el cuello del sujeto, tal como la nuca del sujeto, tal como el cogote cuando el sujeto es un perro o un gato.

30

En un aspecto adicional de la divulgación que se describe en el presente documento, se proporciona un método para el tratamiento o prevención de una enfermedad en un animal de cría intensiva, comprendiendo el método administrar al animal una composición farmacéutica que comprende (i) secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o (ii) una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o (iii) una combinación de secreciones de células derivadas de tejido adiposo y una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, en el que dicha administración es por inyección subcutánea o inyección intramuscular.

En un aspecto, la enfermedad de un animal de cría intensiva es una enfermedad ortopédica del desarrollo. En una forma de realización, la enfermedad de un animal de cría intensiva se selecciona del grupo que consiste en debilidad en las patas, cojera, artritis, enfermedades del desarrollo e infección bacteriana. En una forma de realización, la enfermedad del desarrollo es osteocondrosis (OCD).

En un aspecto, la composición farmacéutica se administra a un animal antes de la aparición de los síntomas clínicos de la enfermedad. En un aspecto, el animal de cría intensiva es un cerdo y la composición farmacéutica se administra antes de la aparición de los síntomas clínicos de la enfermedad ortopédica del desarrollo, tal como osteocondrosis.

En un aspecto, el animal de cría intensiva se selecciona del grupo que consiste en cerdos, vacas, ovejas y aves de corral,

50

En un aspecto, el animal de cría intensiva es una hembra de cría. En un aspecto, el animal de cría intensiva es una hembra preñada. En un aspecto, el animal es una cerda preñada. En un aspecto, la cerda preñada tiene síntomas clínicos de osteocondrosis o artritis.

55

En un aspecto, la administración es administración subcutánea. En un aspecto, la administración es administración intramuscular. En un aspecto, la administración es en el cuello del sujeto, tal como la nuca del sujeto.

Las siguientes formas de realización se aplican a todos los aspectos de la presente invención en el presente

documento, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

En una forma de realización, las secreciones de células derivadas de tejido adiposo se preparan a partir de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo. En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo está sustancialmente libre de adipocitos. En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo comprende además adipocitos. En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo comprende adipocitos maduros. En una forma de realización, las secreciones de células derivadas de tejido adiposo se preparan por cultivo de suspensión de células derivadas de tejido adiposo. En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo está sustancialmente libre de adipocitos.

10 En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo comprende además adipocitos. En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos comprende agregados de células y/o comprende trozos de tejido adiposo.

En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo se prepara mediante un método que comprende la eliminación de (i) parte del contenido de adipocitos o (ii) sustancialmente todo el contenido de adipocitos durante la preparación de la suspensión de células derivadas de tejido adiposo.

15

En una forma de realización, las secreciones de células derivadas de tejido adiposo son una preparación concentrada. En una forma de realización, la preparación concentrada está concentrada en comparación con las secreciones de células de acuerdo como se recogen inicialmente de las suspensiones de células derivadas de tejido adiposo o cultivo de las mismas. En una forma de realización, las secreciones de células derivadas de tejido adiposo son una preparación concentrada entre aproximadamente 2 veces y aproximadamente 20 veces. En una forma de realización, las secreciones de células derivadas de tejido adiposo son una preparación concentrada aproximadamente 10 veces.

20

En una forma de realización, las secreciones de células derivadas de tejido adiposo son de origen bovino, canino, porcino o equino. En una forma de realización, las secreciones de células derivadas de tejido adiposo son de origen humano.

25

En una forma de realización, las secreciones de células derivadas de tejido adiposo se derivan de tejido adiposo autólogo al sujeto o animal receptor. En una forma de realización, las secreciones de células derivadas de tejido adiposo se derivan de tejido adiposo alogénico al sujeto o animal receptor. En una forma de realización, las secreciones de células derivadas de tejido adiposo se derivan de tejido adiposo xenogénico al sujeto o animal receptor.

30

En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, comprende adipocitos maduros.

35

En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos es de origen bovino, canino, porcino o equino. En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos se deriva de tejido adiposo autólogo al sujeto o animal receptor. En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos se deriva de tejido adiposo alogénico al sujeto o animal receptor. En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos se deriva de tejido adiposo xenogénico al sujeto o animal receptor.

40

45

En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos es una suspensión de células obtenida por expansión celular en cultivo.

En una forma de realización, las secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o una composición farmacéutica de las mismas, se almacenan congeladas antes de la administración.

50

En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o una composición farmacéutica de la misma, se almacena congelada antes de la administración.

55

En una forma de realización, las secreciones de células derivadas de tejido adiposo en combinación con una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o una composición farmacéutica de las mismas, se almacenan congeladas antes de la administración. En una forma de realización, las secreciones celulares en dicha combinación son una preparación concentrada. En una forma de realización, la

preparación se concentra entre 2 y 20 veces en comparación con las secreciones antes de la concentración.

En un aspecto de la divulgación, el método comprende además (i) descongelar secreciones de células derivadas de tejido adiposo congelado, o (ii) descongelar una suspensión de células derivadas de tejido adiposo congelada, que
5 comprende opcionalmente adipocitos, o (iii) descongelar una combinación congelada de secreciones de células derivadas de tejido adiposo y una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o (iv) descongelar una composición farmacéutica congelada de cualquiera de (i), (ii) o (iii), antes de la administración al sujeto o animal receptor.

10 En un aspecto, las secreciones congeladas, la suspensión celular, una combinación de las mismas, o la composición farmacéutica de las mismas, se administran al sujeto o animal receptor inmediatamente después de la descongelación, tal como aproximadamente 10 minutos después de la descongelación, o aproximadamente 20 minutos después de la descongelación o aproximadamente 30 minutos después de la descongelación o en aproximadamente una hora de descongelación o en aproximadamente dos horas de descongelación.

15 En un aspecto, el método comprende además combinar (i) una composición que comprende secreciones de células derivadas de tejido adiposo y (ii) una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, antes de administrar dicha combinación al sujeto o animal receptor. En un aspecto, dicha combinación se produce las 2 horas anteriores a dicha administración. En un aspecto, una o ambas de dichas
20 composiciones que comprenden secreciones de células derivadas de tejido adiposo y dicha suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, se almacenan congeladas antes de dicha combinación. En un aspecto adicional, la composición que comprende secreciones de células derivadas de tejido adiposo y dicha suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, se mezclan entre sí antes de que la composición se congele.

25 En una forma de realización de la invención, la composición farmacéutica para su uso es una composición veterinaria y el sujeto es un animal no humano.

En una forma de realización adicional de la invención que se describe en el presente documento, se proporciona el
30 uso de (i) secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o (ii) una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o (iii) una combinación de (i) y (ii), para la preparación de una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en un trastorno inflamatorio, una lesión de ligamento y una lesión de tendón, o aliviar el dolor asociado con un trastorno inflamatorio, una lesión de ligamento o una lesión de tendón, en un sujeto mamífero, en el que la composición es
35 adecuada para administración a un sitio de dicho sujeto alejado del sitio de dicha afección.

En otra forma de realización que se describe en el presente documento, se proporciona el uso de (i) secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o (ii) una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o (iii) una combinación de (i) y (ii), para la preparación de una composición farmacéutica
40 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección articular en un sujeto mamífero, en el que la composición es adecuada para administración a un sitio de dicho sujeto alejado del sitio de dicha afección. En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos comprende agregados de células y/o comprende trozos de tejido adiposo. En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo está sustancialmente libre de adipocitos. En una forma de
45 realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo comprende adipocitos.

En una forma de realización adicional que se describe en el presente documento, se proporciona el uso de (i) secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o (ii) una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o (iii) una combinación de (i) y (ii), para la preparación de una composición
50 farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad en un animal de cría intensiva, en el que la composición es adecuada para inyección subcutánea o inyección intramuscular.

En otra forma de realización que se describe en el presente documento, se proporciona una composición que comprende (i) secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o (ii) una suspensión de células derivadas de
55 tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o (iii) una combinación de (i) y (ii), para su uso en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en un trastorno inflamatorio, una lesión de ligamento y una lesión de tendón, o aliviar el dolor asociado con un trastorno inflamatorio, una lesión de ligamento o una lesión de tendón, en la que la composición se administra a un sitio en un sujeto alejado del sitio afectado por la afección. En una forma de realización, la composición es una composición inyectable. En una forma de realización,

la administración es por inyección subcutánea o inyección intramuscular.

En otra forma de realización que se describe en el presente documento, se proporciona una composición que comprende (i) secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o (ii) una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o (iii) una combinación de (i) y (ii), para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección articular en un sujeto mamífero, en la que dicha composición se administra a un sitio de dicho sujeto alejado del sitio de dicha afección. En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos comprende agregados de células y/o comprende trozos de tejido adiposo. En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo está sustancialmente libre de adipocitos. En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo comprende adipocitos.

En una forma de realización que se describe en el presente documento, se proporciona una composición que comprende (i) secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o (ii) una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o (iii) una combinación de (i) y (ii), para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad en un animal de cría intensiva, en la que, en dicho tratamiento o prevención la composición se administra por inyección subcutánea o inyección intramuscular.

En otra forma de realización de la invención que se describe en el presente documento, se proporciona una composición farmacéutica que comprende (i) secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o (ii) una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o (iii) una combinación de (i) y (ii), junto con un vehículo, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, la composición que comprende secreciones de células derivadas de tejido adiposo comprende además adipocitos. La composición es una composición congelada.

En otro aspecto de la divulgación que se describe en el presente documento, se proporciona un kit que comprende (a) una composición farmacéutica seleccionada del grupo que consiste en (i) una composición que comprende secreciones derivadas de tejido adiposo, (ii) una composición que comprende una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, y (iii) una combinación de (i) y (ii); y (b) instrucciones para el uso de dicho kit en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en un trastorno inflamatorio, una lesión de ligamento y una lesión de tendón, o aliviar el dolor asociado con un trastorno inflamatorio, una lesión de ligamento o una lesión de tendón, en el que dicho tratamiento comprende la administración de dicha composición farmacéutica a un sitio en un sujeto alejado del sitio afectado por la afección.

En otro aspecto que se describe en el presente documento, se proporciona un kit que comprende (a) una composición farmacéutica seleccionada del grupo que consiste en (i) una composición que comprende secreciones derivadas de tejido adiposo, (ii) una composición que comprende una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, y (iii) una combinación de (i) y (ii); y (b) instrucciones para el uso de dicho kit en el tratamiento de una enfermedad o afección articular en un sujeto mamífero, en el que dicho tratamiento comprende la administración de dicha composición farmacéutica a un sitio en un sujeto alejado de la articulación afectada por la enfermedad o afección articular. En un aspecto, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos comprende agregados de células y/o comprende trozos de tejido adiposo. En un aspecto, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo está sustancialmente libre de adipocitos. En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo comprende adipocitos.

En otro aspecto que se describe en el presente documento, se proporciona un kit que comprende (a) una composición farmacéutica seleccionada del grupo que consiste en (i) una composición que comprende secreciones derivadas de tejido adiposo, (ii) una composición que comprende una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, y (iii) una combinación de (i) y (ii); y (b) instrucciones para el uso de dicho kit en el tratamiento o prevención de enfermedad en un animal de cría intensiva, en el que, en dicho tratamiento o prevención la composición se administra por inyección subcutánea o inyección intramuscular.

En un aspecto, el kit comprende una o más composiciones congeladas. En un aspecto, el kit comprende instrucciones para combinar una composición que comprende secreciones derivadas de tejido adiposo y una composición que comprende una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, antes de la administración de una composición combinada. En un aspecto, el kit comprende además uno o más dispositivos de inyección, tal como una o más jeringas. En un aspecto, el dispositivo de inyección contiene una composición del kit.

En otro aspecto que se describe en el presente documento, se proporciona un método para aliviar el dolor en un sujeto mamífero, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende (i) secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o (ii) una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o (iii) una combinación de (i) y (ii), en el que dicha administración a dicho sujeto es por inyección intramuscular o por inyección subcutánea o por una forma apropiada de administración en o cerca de un sitio del dolor. En un aspecto, el dolor está asociado con una afección seleccionada del grupo que consiste en un trastorno inflamatorio, una lesión de ligamento y una lesión de tendón. En un aspecto, el dolor está asociado con la osteoartritis, enfermedad de la babilla, malformaciones cervicales, una lesión de tendón o una lesión de ligamento. En un aspecto el dolor está asociado con dermatitis atópica. En un aspecto, el dolor se asocia con artritis reumatoide, dolor de espalda o esclerosis múltiple. En un aspecto, el dolor está asociado con una afección seleccionada del grupo que consiste en debilidad en las patas, cojera, artritis, enfermedades del desarrollo e infección bacteriana. En un aspecto, el dolor está asociado con osteocondrosis (OCD). En un aspecto, el dolor está asociado con una lesión por quemadura. En una forma de realización, el dolor es dolor en el cuello o en el hombro, trastorno asociado a latigazo, o síndrome de dolor regional complejo. En un aspecto, el dolor es dolor de espalda. En un aspecto, el dolor es el dolor de espalda baja. En un aspecto, el dolor es el dolor asociado con un trastorno ciático. En un aspecto, el tratamiento es de dolor para el cual no hay una afección clínica causante discernible. En un aspecto, el tratamiento es de dolor para el que no existe una afección clínica causante discernible en la parte o región del cuerpo en la que el sujeto experimenta el dolor. En un aspecto, el dolor es el dolor neuropático. En un aspecto, el dolor neuropático es el dolor para el que no existe una afección clínica causante discernible. En un aspecto, la forma apropiada de administración es la inyección. En un aspecto, la forma apropiada de administración es la aplicación tópica. El dolor neuropático puede estar localizado en un área del cuerpo o puede experimentarse en múltiples sitios del cuerpo del sujeto. Cuando se experimenta en múltiples sitios, la intensidad del dolor puede ser similar en múltiples sitios o puede ser diferente en múltiples sitios. En un aspecto, el dolor neuropático es dolor facial neuropático. En un aspecto, el dolor es dolor facial neuropático y la administración a dicho sujeto es mediante inyección en la mandíbula o la encía. En un aspecto, la inyección en la mandíbula o la encía es en sitio original del dolor. En un aspecto, el dolor está asociado con una enfermedad articular o un trastorno articular y la composición se administra a un sitio en dicho sujeto que está alejado de dicha articulación. En un aspecto, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos comprende agregados de células y/o comprende trozos de tejido adiposo.

En otra forma de realización de la invención que se describe en el presente documento, se proporciona el uso de (i) secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o (ii) una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o (iii) una combinación de (i) y (ii), para la preparación de una composición farmacéutica para su uso en el alivio del dolor en un sujeto mamífero, en el que la composición farmacéutica es adecuada para administración a dicho sujeto por inyección intramuscular o por inyección subcutánea o por una forma apropiada de administración, tal como administración tópica, en o cerca de un sitio del dolor.

En otra forma de realización que se describe en el presente documento, se proporciona una composición que comprende (i) secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o (ii) una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o (iii) una combinación de (i) y (ii), para su uso en el alivio del dolor en un sujeto mamífero, en la que la composición farmacéutica se administra a dicho sujeto por inyección intramuscular o por inyección subcutánea o por una forma apropiada de administración, tal como administración tópica, en o cerca de un sitio del dolor.

En otro aspecto de la divulgación que se describe en el presente documento, se proporciona un kit que comprende (a) una composición farmacéutica seleccionada del grupo que consiste en (i) una composición que comprende secreciones derivadas de tejido adiposo, (ii) una composición que comprende una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, y (iii) una combinación de (i) y (ii); y (b) instrucciones para el uso de dicho kit en el alivio del dolor en un sujeto mamífero, en la que la composición farmacéutica se administra a dicho sujeto por inyección intramuscular o por inyección subcutánea o por una forma apropiada de administración, tal como administración tópica, en o cerca de un sitio del dolor.

En una forma de realización adicional de la invención que se describe en el presente documento, proporciona una composición que comprende células derivadas de tejido adiposo y secreciones de células derivadas de tejido adiposo. En una forma de realización, las células son células adherentes. En una forma de realización, las células son células madre mesenquimales. La composición es una composición congelada. En una forma de realización, las secreciones de células derivadas de tejido adiposo comprenden medio clarificado procedente del cultivo de células derivadas de tejido adiposo. En una forma de realización, las secreciones de células derivadas de tejido adiposo son una preparación concentrada de medio de cultivo de células derivadas de tejido adiposo. En una forma de

realización, las secreciones de células derivadas de tejido adiposo es una preparación concentrada entre 2 veces y 20 veces. En una forma de realización, la composición comprende además adipocitos. En una forma de realización, las células son células de la progenie del cultivo de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo. En una forma de realización, las células comprenden una línea celular obtenida por cultivo de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo. En una forma de realización, las células de la progenie son de pases múltiples de células derivadas de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo. En una forma de realización, el pase múltiple comprende cinco o más pases. En una forma de realización, el pase múltiple comprende diez o más pases. En una forma de realización, la composición comprende células de una línea celular derivada de tejido adiposo que se ha congelado múltiples veces.

10

En un aspecto adicional de la divulgación que se describe en el presente documento proporciona un método para la criopreservación de una célula almacenada, comprendiendo el método combinar dicha célula con una composición que comprende secreciones de células y almacenar dicha combinación en un estado congelado. En un aspecto, el método es para la criopreservación de una línea celular. En un aspecto, antes de dicho almacenamiento, la combinación se mantiene a temperatura ambiente durante hasta una hora. En un aspecto dicha célula almacenada es una célula adherente. En un aspecto la célula almacenada es una célula madre mesenquimal. En un aspecto, la célula almacenada es una célula derivada de tejido adiposo. En un aspecto, la línea celular es una línea celular derivada de tejido adiposo. En un aspecto, la composición que comprende secreciones de células comprende medio clarificado del cultivo de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo. En un aspecto, el cultivo de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo es el cultivo de células de la progenie de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo. En un aspecto, la composición que comprende secreciones de células comprende medio concentrado del cultivo de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo. En un aspecto, la composición que comprende secreciones de células comprende media del cultivo de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo concentrado entre 2 veces y 20 veces. En un aspecto, la línea celular se ha sometido a pases varias veces. En un aspecto, la línea celular se ha sometido a pases más de cinco veces. En un aspecto, la línea celular se ha sometido a pases más de diez veces. En un aspecto, la línea celular se ha sometido a pases más de quince veces. En un aspecto, la línea celular se ha congelado varias veces.

Se entenderá que las formas de realización descritas en el presente documento se aplican igualmente a todos y cada uno de los aspectos de la invención descritos en el presente documento, simplemente no se repiten en cada aspecto de la invención por razones de brevedad.

El resumen de la invención descrito anteriormente no es limitante y otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de las formas de realización preferidas, así como a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Proliferación de células después de la congelación. Las células que no se han sometido a pases y se congelaron sin secreciones (gráfico de la izquierda) y con secreciones (gráfico de la derecha) y se tiñeron con el ensayo ERD Click-iT que identifica las células en proliferación. Las células en proliferación aparecen en el cuadrante superior derecho.

Figura 2: Recuperación de células después de la congelación. Las células que se han cultivado hasta que se había alcanzado una duplicación celular acumulativa de aproximadamente 13 veces se congelaron sin secreciones (imagen superior) y con secreciones (imagen inferior), después se descongelaron y se cultivaron durante 72 horas.

Figura 3: Mediciones del volumen de la pata de un modelo de ratón con artritis inducida por anticuerpo de colágeno (CAIA) tratado por vía intramuscular con secreciones de SVF+adipocitos (■) o control con vehículo (*).

Figura 4: Mediciones del tamaño del tobillo de un modelo de ratón con artritis inducida por anticuerpo de colágeno (CAIA) tratado por vía intramuscular con secreciones de SVF+adipocitos (■) o control con vehículo (*).

Figura 5: Puntuaciones de artritis clínica de un modelo de ratón con artritis inducida por anticuerpo de colágeno (CAIA) tratado por vía intramuscular con secreciones de SVF+adipocitos (■) o control con vehículo (*).

Figura 6: Mediciones del volumen de la pata de ratones CAIA tratados IV con células o células con secreciones concentradas. Células (■); células más secreciones (*).

Figura 7: Resultados del área bajo la curva del volumen de la pata de ratones CAIA tratados IV con células o células con secreciones concentradas.

Figura 8: Mediciones del tamaño del tobillo de ratones CAIA tratados IV con células o células con secreciones concentradas. Células (■); células más secreciones (●).

Figura 9: Resultados de área bajo la curva del tamaño del tobillo de ratones CAIA tratados IV con células o células con secreciones concentradas.

5 **Figura 10: Puntuaciones de artritis clínica** de ratones CAIA tratados IV con células o células con secreciones concentradas. Células (■); células más secreciones (●).

Figura 11: Resultados de área bajo la curva de la puntuación de artritis clínica de ratones CAIA tratados IV con células o células con secreciones concentradas.

10 Abreviaturas

DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco.
SVC	células vasculares estromales.
SVF	fracción vascular estromal.
15 OCD	osteocondrosis.
MSC	célula(s) madre mesenquimal(es).

Definiciones

20 En el contexto de la presente invención, se entenderá que la referencia a una composición que comprende "secreciones derivadas de tejido adiposo" significa una composición que incluye uno o más factores liberados de las células del tejido adiposo. El material utilizado en la preparación de la composición que comprende las secreciones puede incluir o no adipocitos.

25 El término "farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento en el contexto de diversos componentes relevantes para la invención, tales como vehículos, diluyentes, crioconservantes, pretende abarcar no solo dichos componentes que son adecuados para la administración a un sujeto humano, sino también aquellos adecuados para la administración a un sujeto mamífero no humano. En formas de realización particulares, el componente farmacéuticamente aceptable es adecuado para la administración a un sujeto mamífero no humano. En
30 formas de realización particulares, el componente farmacéuticamente aceptable es adecuado para la administración a un sujeto humano. En formas de realización particulares, el componente farmacéuticamente aceptable es adecuado para la administración a un sujeto mamífero no humano y a un sujeto humano.

Los términos "tratar", "tratamiento", "terapia" y similares en el contexto de la presente memoria descriptiva se refieren al alivio de los síntomas y/o la causa subyacente de la afección o enfermedad, tal como un trastorno
35 inflamatorio, lesión de ligamento, o lesión de tendón o una enfermedad de un animal de cría intensiva. En ciertas formas de realización, un tratamiento ralentizará, retrasará o detendrá la progresión de un trastorno o los síntomas del trastorno o lesión, o revertirá la progresión del trastorno o lesión, al menos temporalmente. Por lo tanto, en el contexto de esta invención, la palabra "tratamiento" o derivaciones de la misma, tal como "tratar", cuando se usa en
40 relación con una aplicación terapéutica, incluye todos los aspectos de una terapia, tal como el alivio del dolor asociado con la afección que se está tratando, el alivio de la gravedad de la afección que se está tratando, la mejora en uno o más síntomas de la afección que se está tratando, etc. Se entenderá que el uso de la palabra "tratamiento" o derivados de la misma, significa que el sujeto que se está "tratando" puede experimentar uno cualquiera o más de los beneficios mencionados anteriormente.

45 El término "prevenir" y similares, en el contexto de la "prevención" de la enfermedad, se refiere al impedimento de la progresión de los síntomas o la causa subyacente de la enfermedad. Se entenderá que puede producirse la prevención completa de una enfermedad, de manera que la enfermedad no se produce en un animal o sujeto tratado. Igualmente, se entenderá que el término incluye prevención parcial, tal como el hecho de que una
50 enfermedad no progrese al estado típico observado en un animal o sujeto que no se ha tratado.

A lo largo de esta memoria descriptiva, la referencia a "un" elemento no excluye el plural, a menos que el contexto determine lo contrario. De manera similar, la referencia a "una forma de realización" no excluye la característica de la forma de realización descrita que se aplica en combinación con una o más formas de realización descritas, a menos
55 que el contexto determine lo contrario.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento incluye en su significado una cantidad no tóxica pero suficiente de un compuesto o composición para su uso en la invención para proporcionar el efecto terapéutico deseado. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro dependiendo de factores tales

como la especie que se está tratando, la edad y el estado general del sujeto, las comorbilidades, la gravedad de la afección que se trata, el agente particular que se administra y el modo de administración, etc. Por lo tanto, para cualquier caso dado, un experto en la técnica puede determinar una "cantidad eficaz" apropiada utilizando solo métodos de rutina.

5

En el contexto de esta memoria descriptiva, el término "que comprende" significa que incluye, pero no necesariamente que incluye únicamente. Además, las variaciones de la palabra "que comprende", tales como "comprender" y "comprende", tienen significados correspondientemente variados. Por lo tanto, el término "que comprende" y variaciones del mismo, se usan en un significado inclusivo en lugar de exclusivo, de manera que

10

opcionalmente pueden estar presentes integrantes o características adicionales en una composición, método, etc., que se describe como que comprende el integrante A, o que comprende el integrante A y B, etc.

En el contexto de esta memoria descriptiva, el término "aproximadamente" se entenderá que indica las tolerancias habituales que un experto en la materia asociaría con el valor dado.

15

En el contexto de esta memoria específica, cuando se establece un intervalo para un parámetro, se entenderá que el parámetro incluye todos los valores dentro del intervalo establecido, incluidos los puntos finales establecidos del intervalo. Por ejemplo, se entenderá que un intervalo de "5 a 10" incluye los valores 5, 6, 7, 8, 9 y 10, así como cualquier subintervalo dentro del intervalo establecido, tal como que incluye el subintervalo de 6 a 10, de 7 a 10, de 6 a 9, de 7 a 9, etc., e incluye cualquier valor e intervalo entre los integrantes que sea razonable en el contexto del intervalo establecido, tal como 5,5, 6,5, 7,5, 5,5 a 8,5 y 6,5 a 9, etc.

20

En el contexto de esta memoria descriptiva, el término "pluralidad" significa cualquier número mayor de uno.

25

Debe observarse que la referencia en el presente documento al uso de los métodos descritos y las composiciones de la invención en el tratamiento o la terapia se entenderá que es aplicable a aplicaciones humanas y no humanas, tales como veterinarias. Por lo tanto, se entenderá que, salvo que se indique lo contrario, una referencia a un paciente, sujeto o individuo significa un ser humano o no humano, tal como un individuo de cualquier especie de importancia social, económica, agrícola o de investigación, incluyendo, pero sin limitación, miembros de las

30

clasificaciones de ovinos, bovinos, equinos, porcinos, felinos, caninos, primates, roedores, especialmente los miembros domesticados o criados en estas clasificaciones, tales como ovejas, vacas, caballos, cerdos y perros.

Cuando se describen ejemplos de diversas formas de realización de la invención en el presente documento, generalmente irán precedidos por términos apropiados que incluyen "tal como" o "por ejemplo", o "que incluye". Se entenderá que los ejemplos se describen como posibilidades inclusivas, tal como para fines de ilustración o comprensión y no se proporcionan como limitantes, a menos que el contexto indique lo contrario.

35

La composición farmacéutica a la que se hace referencia en el presente documento también puede denominarse un medicamento cuando está destinado para uso terapéutico. Por lo tanto, se entenderá que cuando se describe la invención que incluye el uso de una composición de componentes descritos para la preparación de una composición farmacéutica para un propósito terapéutico pretendido, esa descripción significa igualmente el uso para la preparación de un medicamento para el propósito terapéutico pretendido, a menos que el contexto indique lo contrario.

40

45 Descripción detallada de las formas de realización preferidas

Los presentes inventores han identificado que, sorprendentemente, la administración remota de una composición que comprende secreciones de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo puede ser eficaz en el tratamiento de diversas afecciones que incluyen enfermedades inflamatorias y trastornos de los huesos y las articulaciones, incluyendo lesiones de ligamentos y lesiones de tendones. Los inventores también han identificado sorprendentemente que la administración remota de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o de una combinación de secreciones derivadas de tejido adiposo y una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, puede ser eficaz en el tratamiento de dichas afecciones. Los métodos descritos previamente para el tratamiento de dichas afecciones han descrito la administración del agente terapéutico en un sitio de enfermedad o dolor por aplicación directa, tal como la inyección intraarticular en el caso de una enfermedad articular. Por lo tanto, la presente divulgación pertenece a métodos para tratar dichas afecciones mediante la administración remota de (i) una composición que comprende secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o (ii) una composición que comprende una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o (iii) una combinación de (i) y (ii), a

50

55

un sujeto que lo necesita. La invención también proporciona el uso de (i) secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o (ii) una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o (iii) una combinación de (i) y (ii), para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en un trastorno inflamatorio, una lesión de ligamento y una lesión de tendón, o aliviar el dolor asociado con un trastorno inflamatorio, una lesión de ligamento, una lesión de tendón, dolor neuropático, o una lesión por quemadura, el medicamento adecuado para administración remota a un sujeto.

Como se describe en el presente documento, el inventor ha identificado sorprendentemente que la administración de tal agente terapéutico no necesariamente tiene que ser una administración directa del agente al sitio lesionado o afectado, tal como una articulación. Mediante la administración del agente terapéutico, tal como por inyección subcutánea o inyección intramuscular, el inventor ha identificado que se pueden tratar o prevenir diversas enfermedades. En el caso de una enfermedad que afecta a una articulación, la descripción en el presente documento de la administración como remota simplemente significa que no se administra directamente en la articulación, sino que se administra típicamente mediante inyección subcutánea o inyección intramuscular. Por lo tanto, el sitio de administración por inyección subcutánea o inyección intramuscular puede o no estar particularmente distante de la articulación afectada. La divulgación también pertenece a métodos para el tratamiento o prevención de una enfermedad en un animal de cría intensiva, comprendiendo el método la administración por inyección subcutánea o inyección intramuscular de (i) una composición que comprende secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o (ii) una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o (iii) una combinación de (i) y (ii).

El inventor ha identificado que las composiciones alogénicas y xenogénicas pueden usarse en el tratamiento y además que las composiciones terapéuticas pueden almacenarse congeladas antes de su uso. En otras formas de realización, la invención se refiere al uso de composiciones de la invención en los métodos divulgados en el presente documento. De esta manera, pueden estar disponibles los productos terapéuticos denominados "ya elaborados" o "listos para usar" ofrecen ventajas, tales como el suministro, la facilidad de uso, menos molestias para el paciente, y un menor requisito de habilidades técnicas, en comparación con un agente terapéutico derivado de un paciente autólogo. Por lo tanto, la presente invención permite la preparación del agente terapéutico antes del contacto con el paciente, de tal forma que un producto que comprende secreciones de células derivadas de tejido adiposo o una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, puede estar disponible sin la necesidad de anestesiarse a un sujeto o animal para la extracción de tejido adiposo. De manera similar, cuando el agente terapéutico es una combinación de secreciones de células derivadas de tejido adiposo y una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, esa combinación puede ponerse a disposición del usuario, tal como un médico, veterinario o agricultor de antemano, o las composiciones separadas de secreciones celulares y de una suspensión de células pueden suministrarse, preparando el usuario la combinación poco antes de la administración. Tal como se describe en el presente documento, las secreciones celulares, la suspensión celular o la combinación pueden almacenarse, por ejemplo, a -20°C hasta que se requiera su uso. Como alternativa, las secreciones celulares, la suspensión celular o la combinación pueden almacenarse a una temperatura más baja, tal como en un congelador de -70°C a -90°C, o en almacenamiento de nitrógeno líquido, ya sea en la fase de vapor o en la fase líquida, hasta que se requiera para su uso. Las composiciones que comprenden células se almacenarán típicamente en nitrógeno líquido. En una forma de realización preferida, la composición que comprende secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o la suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o la combinación de secreciones de células derivadas de tejido adiposo y suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, se almacena en la fase líquida de almacenamiento de nitrógeno líquido. En una forma de realización, las secreciones de células derivadas de tejido adiposo son una preparación concentrada. En una forma de realización, la preparación concentrada está concentrada en comparación con las secreciones de células de acuerdo como se recogen inicialmente de las suspensiones de células derivadas de tejido adiposo o cultivo de las mismas. En una forma de realización, las secreciones de células derivadas de tejido adiposo son una preparación concentrada entre aproximadamente 2 veces y aproximadamente 20 veces. En una forma de realización, las secreciones de células derivadas de tejido adiposo son una preparación concentrada aproximadamente 10 veces.

Sin desear quedar ligado por ningún mecanismo de acción propuesto, se propone que las secreciones de células derivadas del tejido adiposo comprendan citocinas, tales como citocinas antiinflamatorias, que pueden migrar a una fuente de lesión o enfermedad y allí realizan una mejora en la afección subyacente, o alivio del dolor asociado con la afección. De manera similar, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, cuando se inyecta por vía subcutánea o intramuscular opera entonces para secretar diversos factores celulares, tales como las citocinas, que pueden migrar al sitio de la lesión o enfermedad, ya sea clínica o subclínica,

logrando de este modo una mejoría de la afección subyacente o la prevención de la aparición clínica, por ejemplo, en un animal de cría intensiva. Como se describe en los Ejemplos en el presente documento, el método también es eficaz para mejorar la cojera de un individuo tratado y puede proporcionar beneficios en la mejora del rendimiento, como lo demuestra la mejor agilidad y movilidad de los individuos tratados.

5

Tejido adiposo

Las secreciones celulares de la invención son secreciones de células derivadas de tejido adiposo. Las suspensiones celulares de la invención son suspensiones de células derivadas de tejido adiposo. El tejido adiposo puede ser tejido adiposo humano o tejido adiposo animal de mamífero. El ser humano o animal puede estar vivo o muerto, siempre que todavía haya células viables dentro del tejido adiposo. El tejido adiposo puede comprender tejido adiposo "blanco" o tejido adiposo "marrón".

El tejido adiposo puede originarse a partir de cualquier fuente en el cuerpo que sea accesible. La grasa subcutánea, por ejemplo, es fácilmente accesible solo con heridas superficiales o mediante el uso de técnicas de "cirugía laparoscópica". Por ejemplo, el tejido adiposo puede ser tejido extraído utilizando técnicas de liposucción, o tejido adiposo que se extrae con tejido reproductivo cuando se castra un animal macho o hembra. El tejido adiposo puede aclararse con un medio de cultivo tisular o una solución isotónica tamponada para eliminar las células sanguíneas adherentes, y puede recortarse o procesarse de manera gruesa para eliminar grandes vasos sanguíneos o elementos del tejido conectivo antes de generar una suspensión de células derivadas del tejido adiposo.

El tejido adiposo se puede derivar de un animal maduro o de un animal juvenil.

En formas de realización particulares, el mamífero es un animal de compañía, tal como un animal doméstico canino o felino, o un animal de trabajo. En otras formas de realización particulares, el mamífero es un animal de granja o animal de carreras seleccionado de un caballo, burro, asno, vaca, búfalo, oveja, cabra, camello o cerdo.

Suspensión de células derivadas de tejido adiposo

Las secreciones de células derivadas de tejido adiposo y, por lo tanto, las composiciones que comprenden dichas secreciones, se preparan preferiblemente obteniendo o preparando primero una suspensión de células derivadas de tejido adiposo. Como se describe en el presente documento, los métodos y kits de la divulgación, y las composiciones para su uso de la invención pueden comprender secreciones de células derivadas de tejido adiposo, una suspensión de células derivadas de tejido adiposo o una combinación de las secreciones de células y la suspensión de células. La suspensión de células derivadas de tejido adiposo puede o no comprender adipocitos.

El término "suspensión de células derivadas de tejido adiposo", como se usa en el presente documento, abarca células aisladas de tejido adiposo o pequeños agregados o trozos de tejido adiposo, o una mezcla de dos o más de: células aisladas, agregados pequeños y trozos de tejido adiposo. La suspensión celular se puede obtener mediante disociación mecánica del tejido adiposo usando técnicas que están fácilmente disponibles en la técnica. Se puede utilizar cualquier método adecuado para la disociación mecánica del tejido adiposo, por ejemplo, troceando tejido adiposo con cuchillas, o con tijeras, o forzando el tejido adiposo a través de tamices o mallas con un tamaño de poro suficiente para romper el tejido en células aisladas o trozos pequeños de tejido adiposo, o una combinación de estas técnicas. Pueden formarse pequeños agregados de tejido adiposo cuando las células derivadas de tejido adiposo disociadas se vuelven a asociar en conjuntos más grandes, por ejemplo, al reposar en un medio. Los trozos pequeños o agregados de tejido adiposo pueden tener menos de diez milímetros de diámetro, menos de cinco milímetros de diámetro, menos de un milímetro de diámetro máximo, menos de 500 μm de diámetro máximo o menos de 250 μm de diámetro máximo.

La suspensión de células derivadas de tejido adiposo se puede filtrar a través de una malla o tamiz para eliminar los agregados celulares o trozos de tejido que sean mayores que el tamaño de poro de malla o tamiz.

Se pueden usar enzimas proteolíticas para promover la disociación del tejido adiposo en una suspensión de células derivadas de tejido adiposo. Las enzimas que son adecuadas para tal uso son bien conocidas en la técnica, e incluyen, pero sin limitación, tripsina y colagenasa. Es habitual eliminar y/o de otro modo desactivar las enzimas proteolíticas antes de usar el extracto de células derivadas del tejido adiposo, ya que estas enzimas pueden no ser compatibles con un uso *in vivo* deseado de las células. Las enzimas proteolíticas pueden usarse en combinación con técnicas para la disociación mecánica del tejido adiposo para generar una suspensión de células derivadas de tejido adiposo.

Se puede usar una técnica de disociación mecánica sin usar una o más enzimas proteolíticas. La técnica utilizada de esta manera puede usarse para generar rápidamente una suspensión de células derivadas de tejido adiposo.

- 5 La suspensión celular puede estar suspendida en un líquido. El líquido se puede añadir al tejido adiposo antes, durante o después de la disociación del tejido adiposo. El líquido puede comprender un medio que es capaz de mantener la supervivencia de las células del tejido adiposo durante al menos 24 horas en condiciones de cultivo apropiadas. El líquido puede comprender una solución isotónica tamponada, tal como una solución salina tamponada con fosfato o con HEPES, que es capaz de mantener la supervivencia de las células del tejido adiposo durante al menos una hora. El líquido puede comprender un medio de cultivo tisular. El líquido puede comprender suero o componentes séricos que soportan o prolongan la supervivencia de las células del tejido adiposo en la suspensión celular. El suero o los componentes séricos pueden ser suero o componentes séricos autólogos.

- 15 En algunas formas de realización, la suspensión celular puede no tener líquido añadido, pero en su lugar, las células se suspenden en un líquido que se forma durante la disociación del tejido.

- La preparación de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo puede comprender una etapa de centrifugación. La centrifugación de células aisladas o pequeños agregados o trozos de tejido adiposo suspendidos en un líquido, tal como un medio, es de aproximadamente 500 g durante 10 minutos, o durante un tiempo suficiente y con una fuerza g suficiente para generar un sedimento celular que comprenda células no adipocitarias derivadas de tejido adiposo, por encima de las cuales se encuentra una capa de medio, flotando por encima de la cual, a su vez, se encuentra una capa que comprende los adipocitos viables, y flotando en la parte superior se encuentra una capa de lípido que se deriva de adipocitos rotos. Después de la centrifugación, en ciertas formas de realización, la capa lipídica y la capa media se descartarán y las células retenidas se mezclarán, dejando una suspensión de células derivadas de tejido adiposo que comprende adipocitos viables y células no adipocitarias derivadas de adiposo. En otras formas de realización, solo se retendrá la capa que comprende los adipocitos viables. En otras formas de realización, la capa que comprende adipocitos puede eliminarse y, por lo tanto, no incluirse en la suspensión de células derivadas de tejido adiposo. Esto ocurre típicamente cuando se prepara una suspensión de células derivadas de tejido adiposo que está sustancialmente libre de adipocitos. Una suspensión celular a la que se hace referencia en el presente documento como sustancialmente libre de adipocitos significa que la suspensión celular se ha agotado significativamente de adipocitos en comparación con el material de partida, tal como mediante la eliminación de la fracción de adipocitos después de la centrifugación. Se entenderá que sustancialmente libre de adipocitos cuando, se usa en relación con una suspensión celular incluye la ausencia completa de adipocitos y también incluye la situación en la que se ha producido una retención mínima de adipocitos en el material. En otras formas de realización, solo parte del contenido de adipocitos del tejido adiposo puede eliminarse en la preparación de la suspensión de células derivadas de tejido adiposo. En este caso, la suspensión celular resultante comprenderá adipocitos, pero en una proporción reducida con respecto a otros componentes retenidos, tal como las células madre, en comparación con la proporción en el material de partida. En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo comprende al menos un 10% de adipocitos en volumen. En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo comprende entre un 10% y un 30% de adipocitos en volumen.

- 45 Se puede usar una etapa de centrifugación o múltiples etapas de centrifugación, por ejemplo, para proporcionar etapas de separación de células adicionales. En otras formas de realización, la preparación de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo no incluye una etapa de centrifugación.

- La suspensión de células derivadas de tejido adiposo puede o no comprender adipocitos viables. Cuando están presentes, los adipocitos pueden retener cantidades detectables de lípidos en su citoplasma, y pueden separarse de las células no adipocitarias derivadas de tejido adiposo en base a la diferente densidad proporcionada por el lípido. Los lípidos pueden detectarse utilizando técnicas de microscopía óptica, incluida la microscopía de contraste de fase, o tiñendo una muestra de células con un colorante lipófilo tal como Oil Red O. Los adipocitos que retienen el lípido en su citoplasma son considerablemente más frágiles que otras células derivadas de tejido adiposo, y por consiguiente, cuando se deseen adipocitos viables, deben evitarse las técnicas para disociar el tejido que dañen o destruyan una gran proporción de los adipocitos. La disociación ultrasónica del tejido adiposo o las técnicas en las que se agita vigorosamente el tejido adiposo, por ejemplo, es poco probable que proporcionen una suspensión celular que contenga grandes cantidades de adipocitos viables. La viabilidad de los adipocitos se puede determinar fácilmente utilizando técnicas fácilmente disponibles, tales como los ensayos de viabilidad celular LIVE/DEAD (Molecular Probes).

La suspensión de células derivadas de tejido adiposo puede comprender tanto adipocitos como células no adipocitarias derivadas de tejido adiposo. Las células no adipocitarias derivadas de tejido adiposo incluyen típicamente células de la fracción vascular estromal, incluidas las células madre mesenquimales. Las células de la fracción vascular estromal típicamente sedimentan en las condiciones de centrifugación descritas en el presente documento de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo.

En formas de realización que comprenden tanto adipocitos como células no adipocitarias derivadas de tejido adiposo, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo puede prepararse convenientemente mediante métodos que comprenden una etapa de centrifugación, como se describe en el presente documento, en la que se recoge tanto la capa de células adipocitarias como las células no adipocitarias derivadas de tejido adiposo sedimentadas. Como alternativa, en estas formas de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo puede prepararse disociando tejido adiposo como se describe en el presente documento sin una etapa de centrifugación.

La suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, puede almacenarse en condiciones apropiadas. Las condiciones de almacenamiento típicamente permiten la retención de la viabilidad celular de algunas o todas las células en la suspensión celular, tal como más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90% o más que 95%.

Cuando la suspensión de células derivadas de tejido adiposo se almacena congelada, puede estar en cualquier líquido portador apropiado para la congelación de células. Como ejemplo ilustrativo pero no limitativo, las células pueden suspenderse en un medio de cultivo, que puede contener suero o estar libre de suero, tal como DMEM, RPMI, medio esencial mínimo, o en suero antes de la congelación.

Cuando la suspensión de células derivadas de tejido adiposo se almacena congelada, típicamente también comprende un crioprotector, por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO) o glicerol, a una concentración apropiada, tal como del 5% al 10%. Como se describe en el presente documento, las secreciones celulares tales como las obtenidas o derivadas del cultivo celular de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, también se pueden usar como crioprotectores para el almacenamiento celular. Dichas secreciones, opcionalmente clarificadas y u opcionalmente concentradas, pueden combinarse con una población celular destinada al almacenamiento congelado, tal como células mesenquimales, tal como células derivadas de tejido adiposo, incluida una línea celular resultante del cultivo de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo. La combinación se puede mantener a una temperatura adecuada, tal como la temperatura ambiente, por ejemplo, aproximadamente de 18° a 25°C, antes de congelarla durante un tiempo adecuado, tal como hasta aproximadamente una o dos horas, para permitir la interacción entre las secreciones y las células, por ejemplo, aproximadamente 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos o dos horas. En las formas de realización preferidas, la combinación se mantiene a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos.

Los constituyentes de la suspensión celular, tales como el medio líquido y el crioprotector, son típicamente farmacéuticamente aceptables a las concentraciones utilizadas. Esto tiene la ventaja de que la suspensión de células derivadas de tejido adiposo se puede administrar a un sujeto o animal receptor después de descongelar con un mínimo procesamiento posterior a la descongelación.

La suspensión celular se congela típicamente en condiciones controladas para minimizar el daño celular, por ejemplo, mediante congelación lenta, típicamente a una velocidad de aproximadamente 1°C/min, tal como por colocación en un dispositivo de congelación programable, o en un contenedor aislado en un congelador de -70°C a -90°C. Para el almacenamiento, las células congeladas típicamente se transfieren entonces al almacenamiento de nitrógeno líquido.

Un método y dispositivo de procesamiento celular que se puede usar para la preparación de suspensiones de células derivadas de tejido adiposo se describe en la solicitud pendiente junto con la presente WO2012122603 A1.

Suspensiones de células derivadas de tejido adiposo bovino

Las suspensiones de células derivadas de tejido adiposo, y por lo tanto, las secreciones de células derivadas de tejido adiposo, pueden derivarse de cualquier fuente apropiada. El tejido adiposo bovino es una de estas fuentes. El inventor ha descrito previamente métodos de la invención para la preparación de suspensiones de células derivadas de tejido adiposo de fuentes bovinas, particularmente de tejido base de cola bovino, ya que se encontró que ese material era refractario a los métodos estándar apropiados para muchas otras fuentes de tejido adiposo, tal como

humana, canina, equina, de ratón y de rata. Esto se describe en la solicitud pendiente junto con la presente WO2012122604 A1.

Por ejemplo, cuando la presente invención utiliza material derivado de tejido adiposo bovino, puede prepararse una suspensión de células derivadas de tejido adiposo bovino para su uso como una composición terapéutica o para su uso en la preparación de secreciones de células derivadas de tejido adiposo de acuerdo con método que comprende:

- 10 - exponer una muestra de tejido adiposo bovino a una solución de enzima proteolítica para generar una suspensión celular;
- centrifugar la suspensión de células para formar un sedimento celular, una capa lipídica libre sobre una capa celular flotante que comprende adipocitos y una capa intermedia entre el sedimento celular y la capa celular flotante, estando dicha capa intermedia agotada de células con respecto al sedimento celular y la capa celular flotante; y
- 15 - eliminar la capa lipídica libre y la capa intermedia y mezclar el sedimento celular y la capa celular flotante para formar una suspensión de células derivadas de tejido adiposo que comprende adipocitos.

En los métodos de la divulgación y las composiciones para su uso de la invención donde se desea una suspensión celular que no comprende adipocitos, la capa de células flotantes que comprende adipocitos también puede eliminarse y desecharse en la forma de realización del método anterior.

El método puede comprender etapas adicionales en la preparación de suspensiones de células derivadas de tejido adiposo como se expone en otra parte de esta memoria descriptiva, en particular la sección anterior titulada "Suspensión de células derivadas de tejido adiposo". Estas etapas adicionales incluyen, por ejemplo, disociar mecánicamente el tejido y la suspensión a través de un medio o tampón, etc.

La capa intermedia eliminada puede retenerse ya que típicamente incluye secreciones derivadas de tejido adiposo. Como la concentración de las secreciones en la capa intermedia eliminada es típicamente baja en comparación con la concentración de las secreciones producidas a partir del cultivo celular posterior de suspensiones de células derivadas de tejido adiposo, como se describe a continuación, las secreciones de células recolectadas de células cultivadas se usan típicamente en los métodos de la divulgación, y composiciones para su uso de la invención.

En ciertas formas de realización, la solución de enzima proteolítica comprende colagenasa. La colagenasa se usa típicamente a una concentración final de aproximadamente el 0,2% p/v o aproximadamente el 0,25% p/v o mayor. En ciertas formas de realización, la exposición del tejido adiposo bovino a la enzima proteolítica se realiza en condiciones que dan como resultado una digestión incompleta del tejido adiposo, tal como las que dan como resultado la presencia de cantidades significativas de tejido adiposo intacto. Típicamente, por ejemplo, puede haber trozos de tejido adiposo presentes que sean del mismo tamaño que antes de comenzar la digestión. En formas de realización del método cualesquiera entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 80% del tejido adiposo puede no ser digerido.

En ciertas formas de realización, las células pueden someterse a múltiples etapas de centrifugación o lavado, por ejemplo, para eliminar el exceso de lípidos libres.

Como se describe con más detalle en la siguiente sección, una suspensión de células derivadas de tejido adiposo que puede ser de cualquier origen de especie, tal como se menciona en el presente documento, por ejemplo, bovino, porcino, canino, felino, equino, humano, etc., o una alícuota del mismo, se puede usar en la preparación de una composición que comprende secreciones de las células derivadas de tejido adiposo.

50 Composiciones que comprenden secreciones derivadas de tejido adiposo

Una composición que comprende secreciones de células derivadas de tejido adiposo puede prepararse a partir de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo mediante cualquier manera apropiada. Como se señala en el presente documento, los componentes líquidos formados durante la preparación de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo incluyen típicamente secreciones derivadas de tejido adiposo, representando de este modo una forma de realización de una composición que comprende dichas secreciones. En esta forma, la composición que comprende las secreciones derivadas de tejido adiposo puede recogerse en cualquier fase apropiada en la preparación de una suspensión celular, tal como mediante la recogida de la capa líquida intermedia entre el sedimento celular y la capa celular flotante después de la centrifugación del material derivado de tejido

adiposo. En esta forma de realización, el material recogido que comprende las secreciones puede incluir o no adipocitos.

Típicamente, la composición se genera mediante la exposición de un medio a la suspensión de células derivadas de tejido adiposo que comprende adipocitos. La exposición del medio a la suspensión de células derivadas de tejido de adipocitos puede ser para cualquier momento y condiciones apropiados, de acuerdo con lo establecido por el operador. La exposición del medio a la suspensión de células derivadas de tejido de adipocitos no requiere condiciones que permitan la unión de la célula a un sustrato. En estas formas de realización, la composición que comprende secreciones derivadas de tejido adiposo puede generarse exponiendo un medio a la suspensión de células derivadas de tejido adiposo durante cualquier periodo de tiempo apropiado, tal como al menos 6 horas, al menos 8 horas, al menos 10 horas, o al menos 12 horas, seguido de la eliminación de la suspensión celular del medio, o viceversa, por ejemplo, mediante centrifugación o filtración. En una forma de realización, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo puede exponerse a bajas condiciones de oxígeno, tales como menos del 10% de oxígeno, menos del 5% de oxígeno o menos del 1% de oxígeno. La eliminación de la suspensión celular y el medio entre sí puede dar como resultado la eliminación completa o incompleta de las células. Por lo tanto, el medio, que comprende las secreciones derivadas de tejido adiposo, puede incluir o no adipocitos después de la eliminación de la suspensión celular. En ciertas formas de realización, la composición se genera exponiendo un medio a la suspensión de células derivadas de tejido adiposo durante no más de 12 horas, no más de 18 horas o no más de 24 horas. En ciertas formas de realización, la composición puede generarse exponiendo un medio a la suspensión de células derivadas de tejido adiposo durante un periodo de tiempo más largo, tal como cualquier periodo de tiempo entre aproximadamente 1 y 15 días, por ejemplo, durante aproximadamente 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días o 15 días. Típicamente, la suspensión se mantiene en una incubadora durante 5 a 10 días y después se recogen las secreciones. La exposición del medio a las células puede o no estar en condiciones que permitan la unión de la célula a un sustrato. Típicamente, cuando la exposición del medio a las células dura más de aproximadamente 1 día, las condiciones permitirán la unión de las células al sustrato.

La composición puede comprender moléculas derivadas de células que se liberan de las células después de la muerte celular o la ruptura de las células de tejido adiposo. La composición puede comprender secreciones de células de la suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos. La exposición de un medio a una suspensión de células derivadas de tejido adiposo puede ser a una temperatura de 4°C a 50°C, más típicamente a una temperatura de 10°C a 40°C y mucho más típicamente a una temperatura de 20°C a 37°C.

Para una suspensión típica de células derivadas de tejido adiposo, se disocian 5 g de tejido adiposo y se suspenden en 50 ml de DMEM que contiene un 10% de suero autólogo. La suspensión de células derivadas de tejido adiposo típicamente comprende de 100.000 a 1.000.000 de células no adipocitarias por cada gramo de material fuente de tejido adiposo. El número de adipocitos por gramo de material de fuente de tejido adiposo es típicamente entre 100.000 y 5.000.000.

El término "medio", como se usa en el presente documento, pretende abarcar composiciones que soportan la supervivencia de al menos algunas células en una suspensión de células derivadas de tejido adiposo durante al menos una hora. El medio puede ser un medio de cultivo tisular, tal como DMEM, RPMI o medio esencial mínimo, opcionalmente complementado con suero. El medio puede ser una solución isotónica tamponada, tal como una solución salina tamponada con fosfato o una solución salina tamponada de Hank, siempre que el medio sea adecuado para la administración a un sujeto. El medio puede ser líquido que se forma durante la disociación del tejido adiposo. El medio puede complementarse opcionalmente con factores que promuevan la supervivencia o el acoplamiento celular y la división celular, tal como insulina, progesterona y selenio, o el suero o los componentes séricos. En ciertas formas de realización, el medio debe ser adecuado para una composición farmacéutica, que es aceptable para uso *in vivo*. Dichos medios estarán sustancialmente libres de pirógenos u otras impurezas que puedan ser perjudiciales para los humanos o los animales. Los medios farmacéuticamente aceptables están disponibles comercialmente. La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas u otras reacciones adversas inaceptables cuando se administran a un animal o un ser humano.

La preparación de una composición que comprende secreciones derivadas de tejido adiposo puede incluir una etapa de lisis de la suspensión de células derivadas de tejido adiposo que comprende adipocitos. Un lisado que comprende secreciones celulares puede prepararse mediante cualquier método adecuado. En una forma de realización ejemplar, una suspensión de células derivadas de tejido adiposo puede exponerse a un medio, tal como

se describe anteriormente. Las células de la suspensión pueden lisarse entonces por cualquier medio adecuado, tal como por alteración mecánica (por ejemplo, agitación vigorosa o agitación), alteración ultrasónica, descongelación por congelación, liofilización o la adición de uno o más agentes capaces de inducir la lisis celular, típicamente la lisis de adipocitos. Dichos agentes de lisis se conocen en la técnica e incluyen urea, dodecil sulfato de sodio y Triton x 100. Después de una etapa de lisis, la preparación puede centrifugarse o filtrarse para ayudar a eliminar los residuos celulares, o puede usarse sin una etapa de aclaración, en cuyo caso la composición que comprende las secreciones derivadas de tejido adiposo también puede incluir residuos celulares. En algunos casos, el lisado celular puede eliminarse del agente de lisis por precipitación del lisado celular. Cuando la etapa de lisis da como resultado una lisis celular incompleta, la composición que comprende las secreciones derivadas de tejido adiposo también pueden comprender células derivadas de adiposo, tales como adipocitos.

En ciertas formas de realización, la preparación de las secreciones derivadas de tejido adiposo comprende cultivar la suspensión celular que comprende adipocitos en condiciones apropiadas para formar un cultivo de células adherentes, tal como un cultivo de células adherentes confluentes; recoger sobrenadante del cultivo de células adherentes y eliminar células de dicho sobrenadante para formar una composición que comprende secreciones derivadas de tejido adiposo. La eliminación de las células del sobrenadante para dejar una composición que comprende secreciones derivadas de tejido adiposo puede ser una eliminación completa o puede ser una eliminación parcial. En este último caso, la composición que comprende secreciones derivadas de tejido adiposo puede incluir también adipocitos.

Antes de comenzar el cultivo de las células, la suspensión de células derivadas de tejido adiposo se puede volver a suspender en un volumen deseado de un tampón apropiado, tal como DMEM, RPMI o medio esencial mínimo. La suspensión celular, o una alícuota de la misma, se puede añadir a un matraz de cultivo tisular estéril e incubarse en condiciones apropiadas, típicamente hasta que las células adherentes hayan alcanzado la confluencia. El cultivo celular está preferiblemente en presencia de suero estéril. La concentración del suero en el cultivo puede ser cualquier concentración adecuada que ayude al cultivo de células derivadas de tejido adiposo, tal como, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente el 5% v/v a aproximadamente el 30% v/v, tal como aproximadamente el 10% v/v, o aproximadamente el 15% v/v o aproximadamente el 20% v/v. El suero puede ser cualquier suero apropiado para el cultivo de células derivadas de tejido adiposo, tal como un suero de ternera fetal comercial, o un suero preparado de forma interna, tal como por métodos conocidos en la técnica. El suero puede ser autólogo, habiéndose preparado a partir del mismo individuo del que se obtuvo el tejido adiposo, o puede ser alogénico. En otras formas de realización, el suero puede ser xenogénico, tal como el uso de suero de ternera en el cultivo de células derivadas de tejido adiposo obtenidas de una fuente canina. Típicamente, las células se cultivan a 37°C con el 5% de CO₂. En una forma de realización adicional, las células se cultivan en condiciones hipóxicas.

Durante el cultivo, las células derivadas de tejido adiposo secretan citocinas que incluyen moléculas antiinflamatorias, moléculas proinflamatorias, quimiocinas, factores de crecimiento y otras moléculas de señalización celular en el medio. El sobrenadante en el cultivo comprende, por lo tanto, secreciones derivadas de tejido adiposo.

En ciertas formas de realización, el cultivo se puede congelar y liofilizar, dando como resultado una preparación liofilizada que incluye células y las secreciones. La rehidratación de la preparación liofilizada lisará la mayoría de las células, lo que dará como resultado la liberación de citocinas adicionales. Típicamente, la rehidratación se llevará a cabo utilizando un volumen de fluido que sea menor que el volumen original de las células derivadas de tejido adiposo, tal como un volumen de fluido que es entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 veces menor que el volumen original, más típicamente aproximadamente 10 veces menos que el volumen original de las células derivadas de tejido adiposo que da como resultado una composición que está 10 veces concentrada. La composición puede filtrarse entonces para eliminar los residuos celulares que dan como resultado una composición que contiene citocinas concentradas. Esto proporciona un método preferido para producir grandes volúmenes de secreciones concentradas.

En otras formas de realización determinadas, el sobrenadante puede recogerse del cultivo en cualquier momento apropiado, aunque típicamente para un cultivo de células adherentes, se recogerá cuando las células hayan alcanzado la confluencia, tal como después de aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días. Las células, los desechos celulares y cualquier tejido adiposo restante se pueden eliminar del sobrenadante, tal como, por filtración. En una forma de realización, la filtración puede ser a través de una malla de 20 micrómetros. Si se desea, se pueden llevar a cabo varias etapas de filtración, tal como a través de dos o más filtros de tamaño de malla decreciente. Típicamente, la preparación resultante de las secreciones derivadas de tejido adiposo se esteriliza por filtración, tal como, a través de un filtro de 0,22 micrómetros. La composición esterilizada se puede usar inmediatamente, o se puede dividir en alícuotas para su uso o para su almacenamiento. Típicamente, si se

almacena, la composición se almacena congelada a -20°C. La composición contiene secreciones de las células derivadas del tejido adiposo.

Una composición que comprende secreciones derivadas de tejido adiposo también puede comprender adipocitos.

- 5 Cuando están presentes, los adipocitos pueden permanecer en el tejido adiposo original usado en la preparación de las secreciones o pueden añadirse a la composición que comprende las secreciones.

10 Como se describe anteriormente, la preparación de secreciones de células derivadas de tejido adiposo se puede hacer cultivando una suspensión de células derivadas de tejido adiposo y la posterior recolección y filtración de sobrenadante, con o sin las etapas adicionales descritas anteriormente, tal como la esterilización por filtración, la liofilización y la concentración.

15 Una composición que comprende las secreciones, que puede ser un sobrenadante recogido que comprende secreciones, puede liofilizarse, por ejemplo, y rehidratarse posteriormente en un volumen deseado de un líquido apropiado. Típicamente, el líquido apropiado será farmacéuticamente aceptable. El líquido apropiado puede ser agua destilada.

20 Opcionalmente, los cultivos de células derivadas de tejido adiposo confluentes, después de la recolección del sobrenadante, pueden someterse a pases en nuevas matraces de cultivo tisular y cultivarse de nuevo hasta confluencia en condiciones apropiadas. El pase continuo de las células puede llevarse a cabo para la preparación de secreciones derivadas de tejido adiposo. Por ejemplo, el sobrenadante puede recogerse de matraces en cualquier número de pases deseado, por ejemplo, de matraces en el pase número tres al pase cinco. Los sobrenadantes recolectados se pueden agrupar de acuerdo con se desee, por ejemplo, para obtener una mayor cantidad de secreciones. Con etapas adicionales, tales como etapas de concentración, de esta manera se puede preparar una
25 preparación de secreción de células derivadas de tejido adiposo de mayor concentración.

Composiciones farmacéuticas y otras composiciones de la invención

30 En las formas de realización de la invención, la composición derivada de tejido adiposo, que contiene secreciones de células de tejido adiposo, o la suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, se usa para la preparación de una composición farmacéutica. De acuerdo con una forma de realización, la invención proporciona (i) una composición que comprende secreciones derivadas de tejido adiposo o (ii) una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos o (iii) una combinación de (i) y (ii) para la preparación de una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una afección
35 seleccionada del grupo que consiste en un trastorno inflamatorio, una lesión de ligamento y una lesión de tendón en un sujeto, o para su uso en el alivio del dolor asociado con un trastorno inflamatorio, una lesión de ligamento, una lesión de tendón, dolor neuropático o lesión por quemadura, en la que el tratamiento comprende la administración remota de la composición farmacéutica al sujeto.

40 La composición farmacéutica también puede denominarse un medicamento. Típicamente, la administración remota es la administración subcutánea o la administración intramuscular. Típicamente, la composición farmacéutica también comprende uno o más de un diluyente, excipiente o adyuvante portador farmacéuticamente aceptable.

45 En otra forma de realización, la invención proporciona el uso de (i) una composición que comprende secreciones derivadas de tejido adiposo o (ii) una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o (iii) una combinación de (i) y (ii), para la preparación de una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad en un animal de cría intensiva, en la que la composición farmacéutica es adecuada para inyección subcutánea o inyección intramuscular.

50 En otra forma de realización, la invención proporciona el uso de (i) una composición que comprende secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o (ii) una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o (iii) una combinación de (i) y (ii), para la preparación de una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección articular en un sujeto mamífero, en el que la composición es adecuada para administración a un sitio de dicho sujeto alejado del sitio de dicha afección.

55 En otra forma de realización, la invención proporciona el uso de (i) secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o (ii) una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o (iii) una combinación de (i) y (ii), para la preparación de una composición farmacéutica para su uso en el alivio del dolor en un sujeto mamífero, en el que la composición farmacéutica es adecuada para administración a dicho sujeto

por inyección intramuscular o por inyección subcutánea o por una forma apropiada de administración, tal como por administración tópica, en o cerca de un sitio del dolor.

Por lo tanto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas o medicamentos que comprenden (i) 5 secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o (ii) una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o (iii) una combinación de (i) y (ii). La composición farmacéutica puede proporcionarse como parte de un kit, por ejemplo, incluyendo componentes adicionales útiles en el tratamiento previsto, tal como, por ejemplo, instrucciones escritas, o puede proporcionarse como un único elemento, tal como un solo vial o alícuota de la composición.

10

De acuerdo con una forma de realización adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende secreciones derivadas de tejido adiposo, junto con un vehículo, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. En ciertas formas de realización, la composición que comprende secreciones derivadas de tejido adiposo comprende además adipocitos. En ciertas formas de realización, la composición está 15 libre de células. En ciertas formas de realización, la composición se prepara exponiendo un medio u otro líquido a una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que puede o no comprender adipocitos maduros. La composición farmacéutica tiene propiedades terapéuticas, tal como para el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en un trastorno inflamatorio, una lesión de ligamento y una lesión de tendón en un sujeto, o para aliviar el dolor asociado con una afección seleccionada del grupo que consiste en un trastorno inflamatorio, una 20 lesión de ligamento, una lesión de tendón, dolor neuropático y una lesión por quemadura. La composición farmacéutica tiene propiedades terapéuticas adecuadas para el tratamiento o la prevención de enfermedades en un animal de cría intensiva. Dichas enfermedades incluyen debilidad en las patas, cojera, artritis, enfermedades del desarrollo e infección bacteriana. En una forma de realización, la enfermedad del desarrollo es osteocondrosis (OCD). En una forma de realización, la enfermedad del desarrollo es un quiste óseo. En una forma de realización, la 25 enfermedad del desarrollo es una enfermedad ortopédica del desarrollo.

En aspectos de la divulgación, el tejido adiposo se toma de un sujeto individual, y la composición farmacéutica se administra al mismo individuo, y por lo tanto, las secreciones derivadas de tejido adiposo o la suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o una combinación de los mismos, y es una 30 preparación puramente autóloga.

En aspectos, el tejido adiposo se toma de uno o más sujetos individuales y la composición farmacéutica se administra a un sujeto diferente de la misma especie, y por lo tanto, las secreciones derivadas de tejido adiposo o la suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o combinación de los 35 mismos, y es una preparación alogénica. En formas de realización, el tejido adiposo se toma de un individuo de una especie diferente al que se pretende que sea un receptor de la composición terapéutica. Por ejemplo, una composición que comprende secreciones o células o una combinación de ambas preparadas a partir de tejido bovino puede ser para la administración a un individuo de una especie diferente, tal como un ser humano, felino, porcino o canino. En formas de realización donde la composición que comprende secreciones derivadas de tejido 40 adiposo o una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, es para su uso en un individuo diferente de la misma especie que el material de origen o para su uso en un individuo de una especie diferente como material de origen, la composición puede estar típicamente desprovista de células del sistema inmunitario para minimizar la posibilidad de respuesta inmunitaria del huésped (receptor) a la composición o enfermedad de injerto contra huésped.

45

En las formas de realización de la invención, la composición farmacéutica se prepara a partir de más de una fuente de tejido adiposo, tal como a partir de diferentes preparaciones tomadas del mismo individuo o de diferentes preparaciones tomadas de diferentes individuos. El agrupamiento puede comprender combinar múltiples 50 suspensiones de células derivadas de tejido adiposo, tal como en una etapa de cultivo agrupado, o el agrupamiento puede comprender combinar múltiples composiciones de secreciones derivadas de tejido adiposo, tal como puede obtenerse a partir de cultivos separados o etapas de exposición.

La composición farmacéutica se puede administrar al paciente sujeto en un sitio remoto del área afectada. En este contexto, "remoto" significa que la administración no es una aplicación directa de las secreciones celulares o la 55 suspensión celular o una combinación de las mismas en el sitio de la inflamación u otra lesión o enfermedad que se está tratando, donde dicho sitio es identificable. Como ilustración, en el caso del tratamiento de una articulación artrítica, la administración, como se describe previamente en la técnica involucró la inyección de suspensiones de células derivadas de tejido adiposo o secreciones de células derivadas de tejido adiposo directamente en la articulación afectada. Dicha administración requiere un alto grado de habilidad por parte del médico o clínico tratante

- para garantizar la precisión adecuada. El manejo de la extremidad o articulación afectada requerida en dicha administración también aumenta la angustia que experimenta el paciente, ya sea humano o no humano. Al proporcionar la administración remota de las secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o la suspensión de células derivadas de tejido adiposo, o una combinación de las mismas, la presente divulgación ofrece métodos mejorados, y la presente invención ofrece composiciones para su uso en el tratamiento de dichas enfermedades.
- 5 Por ejemplo, la administración remota puede ser por inyección subcutánea, tal como en el cogote de un animal (por ejemplo, un gato o un perro) que está siendo tratado, o por inyección intramuscular. Como un ejemplo adicional, la administración a un perro por inyección intramuscular puede realizarse en el muslo del perro. Como un ejemplo adicional, la administración a un bovino por inyección intramuscular puede ser en el pliegue caudal.
- 10 Cuando las composiciones terapéuticas para su uso de la invención se administran para tratar o prevenir una enfermedad de un animal de cría intensiva, la administración es por inyección subcutánea o inyección intramuscular. Debido a la naturaleza de la afección que se trata en tal animal, la descripción de la administración como "remota" puede no ser apropiada. Por ejemplo, la administración de la composición terapéutica de la invención a un animal de
- 15 cría intensiva puede ser para el tratamiento o la prevención de la debilidad en las patas generalizada o localizada, osteocondrosis. Como se describe en el presente documento, la administración de la composición terapéutica a tales animales es mediante inyección subcutánea o inyección intramuscular.
- 20 Cuando las composiciones terapéuticas de la invención se administran para el tratamiento del dolor para el que no existe una causa clínica discernible, o para el dolor neuropático que puede tener o no una causa clínica discernible, la composición puede administrarse al sujeto por cualquier medio apropiado, tal como por inyección o por aplicación tópica, cuyos medios pueden estar en o cerca de un sitio del dolor o pueden estar alejados de un sitio del dolor. El dolor neuropático puede ser experimentado por un sujeto en múltiples sitios del cuerpo. El tratamiento de tal dolor puede ser por administración en un sitio, tal como un sitio de dolor original, cuyo sitio también puede estar alejado de
- 25 otro sitio de dolor experimentado por el sujeto. En un ejemplo, el dolor es el dolor neuropático. El dolor neuropático puede estar localizado en un área del cuerpo o puede experimentarse en múltiples sitios del cuerpo del sujeto. Cuando se experimenta en múltiples sitios, la intensidad del dolor puede ser similar en múltiples sitios o puede ser diferente en múltiples sitios. Un ejemplo de dolor neuropático es el dolor facial neuropático. En los métodos de la divulgación, el dolor facial neuropático en un sujeto puede tratarse mediante la administración de una composición
- 30 de la invención al sujeto mediante inyección en la mandíbula o la encía. La inyección en la mandíbula o la encía de tal paciente puede comprender la administración en el sitio original del dolor o puede ser la administración en un sitio secundario del dolor.
- 35 Como se muestra en los Ejemplos, las composiciones de la invención y los métodos de la divulgación también son eficaces para aliviar el dolor y la formación de ampollas asociadas con quemaduras. Cuando las composiciones para su uso de la invención se administran para el tratamiento de una lesión por quemadura, o para aliviar el dolor asociado con una quemadura de la piel, la composición se administra típicamente por aplicación tópica, tal como en forma de crema, gel o loción.
- 40 Una composición farmacéutica para su uso de la invención puede suministrarse al usuario como una solución congelada. Como se describe en el presente documento, por ejemplo, las secreciones celulares, la suspensión celular o la combinación pueden almacenarse a aproximadamente -20°C hasta que se requiera su uso. Como alternativa, las secreciones celulares, la suspensión celular o la combinación pueden almacenarse a una temperatura más baja, por ejemplo, en un congelador de -70°C a -90°C , o en almacenamiento de nitrógeno líquido,
- 45 ya sea en la fase de vapor o en la fase líquida, hasta que se requiera para su uso. Las composiciones que comprenden células se almacenarán típicamente en nitrógeno líquido. En una forma de realización preferida, la composición que comprende secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o la suspensión de células derivadas de tejido adiposo y suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, se almacena en la fase líquida de almacenamiento de nitrógeno líquido. En una forma de realización preferida, una composición que comprende células se almacena en combinación con secreciones celulares obtenidas de un cultivo de células derivadas de tejido adiposo. En otra forma de realización preferida, una composición que comprende células se almacena en una composición que comprende medios clarificados y/o
- 50 concentrados de un cultivo de células derivadas de tejido adiposo. Se entenderá que el cultivo de células derivadas de tejido adiposo incluye el cultivo de células recién obtenidas del tejido adiposo, así como el cultivo de células que han surgido como células de progenie o una línea celular del cultivo anterior. Durante el uso, tal como por el médico tratante, clínico, veterinario, técnico, asistente o agricultor, la composición se administra típicamente al sujeto o animal tan pronto como sea posible después de la descongelación. La composición farmacéutica puede almacenarse, como alternativa, por ejemplo, en hielo o en un refrigerador o en un envase frío, de aproximadamente
- 55

2°C a 5°C durante un corto tiempo entre la descongelación y la administración. En este contexto, un tiempo corto típicamente no será más de varias horas, tal como no más de media hora, o no más de una hora, o no más de aproximadamente dos horas. Como los crioprotectores son típicamente tóxicos para las células y pueden causar pérdida de viabilidad si se mantienen descongelados, la composición, particularmente cuando comprende células viables, se inyecta típicamente al animal receptor tan pronto como sea posible después de la descongelación.

Se había considerado previamente que una suspensión almacenada (por ejemplo, congelada) que comprende células madre mesenquimales requiere un periodo de tiempo en condiciones de cultivo celular apropiadas antes de su uso en un entorno terapéutico, por ejemplo, para ayudar en la recuperación celular. El inventor ha identificado sorprendentemente que el cultivo de una suspensión celular previamente congelada, tal como una suspensión de células derivadas de tejido adiposo que comprende opcionalmente adipocitos, no se requiere antes del uso de la suspensión de células en un entorno terapéutico. Como se describe en el presente documento, los beneficios de la administración de tal suspensión celular son evidentes cuando la suspensión celular se administra después de la descongelación y sin el cultivo celular intermedio. Como se demuestra en los Ejemplos en el presente documento, el almacenamiento de células en presencia de secreciones de células derivadas de tejido adiposo proporciona beneficios adicionales. Por ejemplo, las células congeladas almacenadas en presencia de secreciones, opcionalmente una preparación de secreciones clarificada y/o concentrada, demuestran una eficacia terapéutica superior cuando se utilizan después de la recuperación del almacenamiento en comparación con las células congeladas almacenadas en ausencia de secreciones.

Una composición farmacéutica para su uso de la invención puede suministrarse en una forma "lista para usar". En dichas formas de realización, el usuario típicamente requiere solo la descongelación a una temperatura aceptable para la administración antes de que se administre la composición. En dichas formas de realización, la composición puede suministrarse en dosis medidas previamente, tal como una dosis medida previamente o predeterminada adecuada para un sujeto o animal receptor determinado, por ejemplo, predeterminada sobre la base de la especie receptora, o sobre la base del individuo receptor, tal como una raza de perro pequeña, en comparación con una raza de perro grande, o un animal juvenil en comparación con un animal adulto. La dosis medida previamente puede ser, como alternativa o adicionalmente, sobre la base de la enfermedad o afección que se trata o que se pretende prevenir. Una forma lista para usar de la composición puede comprender la composición suministrada con o en un dispositivo inyectable, tal como una jeringa. El dispositivo inyectable puede ser capaz de administrar una sola aplicación a un receptor individual o puede ser capaz de administrar una o varias aplicaciones a múltiples receptores. El dispositivo inyectable puede ser ajustable, por ejemplo, para permitir la administración de un intervalo de diferentes dosis.

En formas de realización en las que la composición farmacéutica comprende una combinación de secreciones de células derivadas de tejido adiposo y una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, la composición puede suministrarse al usuario como una combinación o como composiciones separadas para su combinación por el usuario. Se entenderá que la referencia a un "usuario" en este contexto significa la persona que realmente administra la composición terapéutica al sujeto o animal receptor y también significa un miembro del equipo o grupo que está realizando esa administración. Por ejemplo, el usuario puede ser cualquier persona que esté ayudando en la aplicación de los métodos de divulgación, tal como un médico, un médico, un veterinario, un agricultor, una enfermera clínica, una enfermera veterinaria, un asistente técnico o un empleado de granja.

45 **Trastornos inflamatorios**

La composición farmacéutica puede administrarse para el tratamiento de un trastorno inflamatorio y/o para aliviar el dolor asociado con un trastorno inflamatorio en un sujeto.

La inflamación puede surgir como respuesta a una lesión o estimulación anormal causada por un agente físico, químico o biológico. Una reacción de inflamación puede incluir las reacciones locales y los cambios morfológicos resultantes, la destrucción o eliminación del material dañino, y las respuestas que conducen a la reparación y la curación. El término "inflamatorio" cuando se usa en referencia a un trastorno se refiere a un proceso patológico que es causado por, resultante de, o que da como resultado una inflamación que es inapropiada o que no se resuelve de la manera normal. Los trastornos inflamatorios pueden ser sistémicos o localizados en determinados tejidos u órganos.

Se sabe que la inflamación se produce en muchos trastornos que incluyen, pero sin limitación: Respuesta inflamatoria sistémica (SIRS); enfermedad de Alzheimer (y afecciones y síntomas asociados incluyendo:

neuroinflamación crónica, activación glial; aumento de la microglía; formación de placa neurítica; y respuesta a la terapia); esclerosis lateral amiotrófica (ALS), artritis (y afecciones y síntomas asociados incluyendo, pero sin limitación, inflamación articular aguda, artritis inducida por antígenos, artritis asociada con tiroiditis linfocítica crónica, artritis inducida por colágeno, artritis juvenil; artritis reumatoide, osteoartritis, pronóstico y artritis inducida por estreptococos, espondiloartropatías, artritis gotosa), asma (y afecciones y síntomas asociados, incluyendo: asma bronquial; enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias; enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma juvenil y asma ocupacional); enfermedades cardiovasculares (y afecciones y síntomas asociados, incluyendo aterosclerosis; miocarditis autoinmune, hipoxia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad de la arteria coronaria, cardiomiopatía y disfunción de las células cardíacas, incluyendo: activación de células de músculo liso aórtico; apoptosis de células cardíacas; e inmunomodulación de la función de las células cardíacas; diabetes y afecciones asociadas, incluyendo diabetes autoinmune, diabetes dependiente de insulina (tipo 1), periodontitis diabética, retinopatía diabética, y nefropatía diabética); inflamaciones gastrointestinales (y afecciones y síntomas relacionados, incluyendo enfermedad celíaca, osteopenia asociada, colitis crónica, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal y colitis ulcerosa); úlceras gástricas; inflamaciones hepáticas tales como virus y otros tipos de hepatitis, cálculos biliares de colesterol y fibrosis hepática, infección por VIH y afecciones asociadas, incluyendo respuestas degenerativas, respuestas neurodegenerativas, y enfermedad de Hodgkin asociada al VIH, síndrome de Kawasaki y enfermedades y afecciones asociadas, incluyendo síndrome del ganglio linfático mucocutáneo, linfadenopatía cervical, lesiones de la arteria coronaria, edema, fiebre, aumento de los leucocitos, anemia leve, descamación de la piel, erupción, enrojecimiento de la conjuntiva, trombocitosis; trastornos inflamatorios de la piel, incluyendo dermatitis, tales como dermatitis atópica y afecciones asociadas; esclerosis múltiple, nefropatías y enfermedades y afecciones asociadas, incluyendo nefropatía diabética, enfermedad renal en fase terminal, glomerulonefritis aguda y crónica, nefritis intersticial aguda y crónica, nefritis lúpica, síndrome de Goodpasture, supervivencia a hemodiálisis y lesión renal por isquemia-reperusión, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades y afecciones asociadas, incluyendo neurodegeneración aguda, inducción de IL-1 en el envejecimiento y enfermedad neurodegenerativa, IL-1 indujo la plasticidad de las neuronas hipotalámicas y la hipersensibilidad al estrés crónico, oftalmopatías y enfermedades y afecciones asociadas, incluyendo retinopatía diabética, oftalmopatía de Graves, y uveítis, osteoporosis y enfermedades y afecciones asociadas, incluyendo pérdida ósea alveolar, femoral, radial, vertebral o de la muñeca o incidencia de fractura, pérdida ósea posmenopáusica, incidencia de masa, de fractura o tasa de pérdida ósea, otitis media (adulto o pediátrica), pancreatitis o ascitis pancreática, enfermedad periodontal y enfermedades y afecciones asociadas, incluyendo de inicio adulto, temprano y diabética; enfermedades pulmonares, incluyendo enfermedad pulmonar crónica, sinusitis crónica, enfermedad de la membrana hialina, hipoxia y enfermedad pulmonar en SIDS; reestenosis de injertos coronarios u otros injertos vasculares; reumatismo incluyendo artritis reumatoide, cuerpos de Aschoff reumáticos, enfermedades reumáticas y miocarditis reumática; tiroiditis incluyendo tiroiditis linfocítica crónica; infecciones del tracto urinario incluyendo prostatitis crónica, síndrome de dolor pélvico crónico y urolitiasis, trastornos inmunológicos, incluyendo enfermedades autoinmunes, tal como alopecia aerata, miocarditis autoinmune, enfermedad de Graves, oftalmopatía de Graves, liquen escleroso, esclerosis múltiple, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, enfermedades de la tiroides (por ejemplo, bocio y bocio linfomatoso (tiroiditis de Hashimoto, bocio linfadenóide), trastornos del sueño y síndrome de fatiga crónica y obesidad (no diabética o asociada a diabetes), resistencia a enfermedades infecciosas, tal como leishmaniasis, lepra, enfermedad de Lyme, carditis de Lyme, malaria, malaria cerebral, meningitis, nefritis tubulointersticial asociada a la malaria), que son causadas por bacterias, virus (por ejemplo, citomegalovirus, encefalitis, virus de Epstein-Barr, virus de inmunodeficiencia humana, virus de la influenza) o protozoos (por ejemplo, Plasmodium falciparum, tripanosomas), respuesta al traumatismo, incluyendo traumatismo cerebral (incluyendo ictus e isquemias, encefalitis, encefalopatías, epilepsia, lesión cerebral perinatal, convulsiones febriles prolongadas, SIDS y hemorragia subaracnoidea), bajo peso al nacer (por ejemplo, parálisis cerebral), lesión pulmonar (lesión pulmonar hemorrágica aguda, síndrome de Goodpasture, reperusión isquémica aguda), disfunción del miocardio, causada por contaminantes ocupacionales y ambientales (por ejemplo, susceptibilidad al síndrome del aceite tóxico silicosis), traumatismo por radiación, y eficiencia de las respuestas de cicatrización de heridas (por ejemplo, quemaduras o heridas térmicas, heridas crónicas, heridas quirúrgicas y lesiones de la médula espinal), septicemia, hipotiroidismo, dependencia del oxígeno, anomalía craneal, menopausia de inicio temprano, respuesta de un sujeto al trasplante (rechazo o aceptación), respuesta de la fase aguda (por ejemplo, respuesta febril), respuesta inflamatoria general, respuesta a dificultad respiratoria aguda, respuesta inflamatoria sistémica aguda, cicatrización de heridas, adhesión, respuesta inmunoinflamatoria, respuesta neuroendocrina, desarrollo y resistencia de la fiebre, respuesta en la fase aguda, respuesta al estrés, susceptibilidad a la enfermedad, estrés por movimientos repetitivos, codo de tenista, problemas de ligamentos y tendones, y manejo y respuesta del dolor.

En formas de realización particulares, el trastorno inflamatorio es un trastorno inflamatorio relacionado con las articulaciones, tal como artritis.

Los métodos de la divulgación y las composiciones de la invención pueden usarse para el tratamiento de lesiones de ligamentos y lesiones de tendones o para el alivio del dolor asociado con tales lesiones. Las lesiones de los ligamentos y las lesiones de los tendones, en algunas formas, pueden clasificarse como trastornos inflamatorios.

- 5 Algunas lesiones de ligamentos y lesiones de tendones pueden no considerarse trastornos inflamatorios. Para evitar dudas, las lesiones de ligamentos y lesiones de tendones contempladas en esta invención pueden ser aquellas que son trastornos inflamatorios o están asociadas con los mismos y aquellas que pueden no considerarse trastornos inflamatorios.
- 10 Los métodos de la divulgación y las composiciones de la presente invención se pueden usar junto con otros tratamientos, tales como aquellos para enfermedades inflamatorias. Como se demuestra en la Patente Australiana N.º 2009201915 y en la Publicación Internacional N.º WO2010/020005, la administración de una composición que comprende células derivadas de tejido adiposo, cuya composición comprende adipocitos, directamente en una articulación afectada por enfermedades inflamatorias, tal como osteoartritis, proporciona beneficios terapéuticos para el paciente y se asocia con una mejoría en la articulación. La presente divulgación ofrece además un tratamiento complementario, por el cual, por ejemplo, un régimen de tratamiento puede iniciarse mediante la administración de la composición que comprende células derivadas de tejido adiposo, cuya composición comprende adipocitos, en la articulación afectada, y que va seguida del curso de tratamiento menos invasivo que utiliza la administración remota de la presente invención.

- 20 La presente divulgación también puede ofrecer ventajas como tratamiento complementario para la artritis y otras enfermedades inflamatorias en combinación con tratamientos establecidos. Por ejemplo, un efecto secundario del tratamiento a largo plazo de afecciones inflamatorias que utilizan AINE es la insuficiencia renal. La presente divulgación ofrece una alternativa al uso continuado de AINE en pacientes con signos de insuficiencia renal. Como alternativa, el uso de la composición de la presente invención en combinación con AINE puede permitir que los AINE se usen en una dosis reducida, retrasando de este modo el inicio de la insuficiencia renal.

La composición para su uso de la presente invención se puede usar en combinación con cualquier terapia conocida para enfermedades inflamatorias, incluyendo el uso con cualquiera de cartrophen, metacam, previcox, tramadol. Los métodos de la presente divulgación y las composiciones de la presente invención se pueden usar junto con medicamentos a base de hierbas, tales como valeriana, aceite de romero y hojas de yuca.

- 30 La presente invención permite la preparación de secreciones celulares por adelantado, de manera que un producto que comprende las secreciones de células derivadas de tejido adiposo puede estar disponible sin la necesidad de anestesiarse a un sujeto para la extracción de tejido adiposo. La presente invención permite la preparación de composiciones que comprenden (i) secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o (ii) una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o (iii) una combinación de (i) y (ii), por adelantado a la necesidad de tratamiento. Como se describe en el presente documento, las secreciones celulares u otras composiciones de la invención se pueden almacenar, por ejemplo, a -20°C o menos, hasta que se requiera su uso.

Animales de cría intensiva

- 45 Como resultado de la selección intensiva de animales de granja durante muchas generaciones para obtener rasgos deseables, tales como crecimiento rápido, gran masa muscular y conversión eficiente de alimento en animales criados para la producción de carne (por ejemplo, cerdos y ganado) y calidad y volumen de la leche en los animales lecheros, las razas modernas de animales de granja a menudo tienen una mayor prevalencia de susceptibilidad a enfermedades y afecciones agudas y crónicas que las poblaciones salvajes o de cría menos intensiva. La incidencia y la gravedad de la manifestación de dichas enfermedades y afecciones pueden agravarse por la manera en que se cría un animal. Los animales criados en condiciones de cría intensiva, tal como en granjas de cerdos o en ganaderías densamente pobladas, son típicamente susceptibles a una mayor incidencia de enfermedad y afecciones de crecimiento potencialmente perjudiciales que los animales criados en condiciones menos intensivas, tal como una situación de corral o de cría al aire libre. Sin embargo, debido a la selección intensiva, como se describe anteriormente, incluso los animales criados en operaciones de corral o al aire libre pueden tener una mayor susceptibilidad o prevalencia de condiciones de salud perjudiciales. En el contexto de la invención, por lo tanto, se entenderá que la referencia a animales de cría intensiva o condiciones de cría intensiva incluye animales criados intensivamente que pueden criarse en operaciones densamente pobladas, por ejemplo, con disponibilidad limitada para el movimiento individual, y también incluye animales criados intensivamente en operaciones menos densamente pobladas, tal como cuando un individuo tiene acceso a un corral o al aire libre.

La identificación por el inventor de que las composiciones terapéuticas de la invención son eficaces cuando se administran por vía subcutánea o intramuscular es propicia para los métodos de la divulgación y las composiciones de la invención que tienen efectos beneficiosos en las operaciones de cría y la cría de animales particularmente intensiva, tal como la explotación intensiva de cerdos, ganado, ovejas o aves de corral. Si bien un agente terapéutico para una enfermedad localizada, tal como una articulación artrítica, puede administrarse mediante inyección intraarticular en la articulación afectada, dicha administración requiere un alto grado de habilidad por parte del operador, así como causar potencialmente dolor al animal manipulando la articulación afectada y, por lo tanto, requiriendo la restricción del animal que se está tratando. En contraste, la inyección subcutánea o la inyección intramuscular tienen un requisito de habilidad inferior por parte del operador, generalmente no requerirá el manejo de la extremidad afectada, y típicamente solo requiere una restricción mínima del animal que se está tratando. Con la ausencia de requisitos para un alto grado de habilidades del operador, en comparación con la inyección intraarticular, por ejemplo, la administración de las composiciones de la invención se puede llevar a cabo como parte de un tratamiento agrícola de rutina o un programa preventivo. En tal enfoque, a los animales se les puede administrar las composiciones de la invención al mismo tiempo que los animales se están tratando para otras afecciones, o al mismo tiempo que los animales se someten a procedimientos de rutina asociados con la cría de animales o la empresa en crecimiento, tal como vacunación, etiquetado de orejas, tatuajes, sección parcial de la cola o castración.

Las generaciones de animales de reproducción selectiva de una especie particular para un rasgo deseable han contribuido al aumento de la prevalencia de ciertas características no deseadas en la población. Como ejemplo, los cerdos han sido seleccionados durante muchos años por su rápido crecimiento, su gran masa muscular y su eficiente conversión alimenticia. Sin embargo, esto ha conducido a una prevalencia mucho mayor de problemas esqueléticos, de articulaciones y de cartílago que en una población salvaje. Estos problemas pueden exacerbarse en una operación agrícola donde el animal tiene espacio limitado para moverse. Los cambios asociados con las estructuras cartilaginosas pueden denominarse debilidad en las patas u osteocondrosis (OCD). El término "debilidad en las patas" también se usa a veces para describir una mala conformación de las patas o para describir una condición clínica asociada con cojera o rigidez. Puede surgir debido a cambios anormales en el cartílago articular y las placas de crecimiento (epifisarias), que son responsables del crecimiento de los huesos tanto en longitud como en diámetro. Los mecanismos exactos que causan estos cambios no se entienden completamente. Se cree que surgen debido a la presión y el estrés total que se ejerce sobre estos tejidos de rápido crecimiento, lo que reduce el suministro de oxígeno y causa un crecimiento anormal y la consistencia del cartílago. Aunque se cree que la disminución del suministro de sangre a través de una deficiencia de los vasos sanguíneos contribuye a tales problemas. El daño al cartílago tiende a ser progresivo e irreversible, reemplazándose el cartílago dañado por tejido fibroso.

El acortamiento y la flexión de los huesos cerca de las articulaciones y en las extremidades de los huesos largos pueden seguir al daño del cartílago. Las placas epifisarias débiles también tienen una tendencia a fracturarse y el cartílago que cubre las superficies articulares puede partirse y formar fisuras. En los cerdos modernos, dichos cambios en el cartílago se producen desde los dos meses de edad. Estos cambios potencialmente perjudiciales generalmente no son clínicamente evidentes en una fase temprana. En las empresas de reproducción, no es infrecuente que del 20% al 30% de los verracos y las cerdas jóvenes se eliminen debido a la debilidad en las patas y las deformidades de las patas. Por lo tanto, dichas afecciones, incluyendo OCD, pueden tener serias consecuencias económicas y éticas potenciales para la empresa agrícola. Actualmente no existe un tratamiento específico para la OCD. En fases avanzadas, la OCD también puede conducir a artritis y cojera permanente.

Las composiciones de la presente invención son beneficiosas para el crecimiento, reparación y maduración del hueso y el cartílago. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona métodos para el tratamiento o la prevención de trastornos del hueso y del cartílago en un animal, incluida la debilidad en las patas u OCD. Como la OCD puede provocar artritis en un animal afectado, los métodos de la divulgación y las composiciones de la invención también pueden ser eficaces para prevenir la aparición de o reducir la gravedad o la incidencia de la artritis en un animal con riesgo de artritis. En aspectos preferidos el animal es un cerdo. Como se describe anteriormente, estas condiciones comienzan a una edad temprana y, en las primeras etapas de desarrollo, típicamente no están asociadas con ningún síntoma clínico. En los métodos de la divulgación, la composición terapéutica puede administrarse a un animal que presenta síntomas clínicos de una enfermedad articular o a un animal que no presenta síntomas clínicos de una enfermedad articular.

Los síntomas clínicos pueden incluir la separación o fractura de los huesos en la placa epifisaria (epifisiólisis) asociada con movimiento repentino, cojera, fracturas repentinas (tales como de las articulaciones de la rodilla y el

codo) que pueden ser más comunes en animales jóvenes, conformación anormal de las patas, marcha anormal, rigidez, dolor. La edad de inicio visible de la OCD puede ser variable, por ejemplo, en los tres meses posteriores a la introducción de cerdas jóvenes en una granja, durante el primer embarazo, en la lactancia o en las primeras dos a tres semanas después del destete.

5

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para reducir la gravedad de la OCD en un animal, comprendiendo el método administrar a dicho animal una composición farmacéutica que comprende (i) secreciones de células derivadas de tejido adiposo, o (ii) una suspensión de células derivadas de tejido adiposo, que comprende opcionalmente adipocitos, o (iii) una combinación de (i) y (ii), en el que la administración es por inyección subcutánea o inyección intramuscular. En aspectos preferidos el animal es un cerdo.

La administración de la composición farmacéutica al animal receptor puede tener lugar cuando el animal se encuentra en cualquier edad adecuada. Para la prevención de la aparición de síntomas clínicos de OCD o para reducir la gravedad de la OCD en un cerdo, el receptor se trata preferiblemente a una edad temprana. Por ejemplo, un cerdo puede tratarse en el momento del destete, o poco después, lo que típicamente tiene lugar en una operación de cría de cerdos cuando los lechones tienen entre aproximadamente dos y cinco semanas de edad. Los cerdos jóvenes pueden ser tratados entre aproximadamente un mes y seis meses de edad, o entre aproximadamente tres meses y seis meses de edad. En las granjas de cerdos, los cerdos experimentan una fase de rápido crecimiento en aproximadamente 12 a 16 semanas de edad. Se prevé que, en un aspecto, la administración de las composiciones de la invención se realice al comienzo de este periodo de crecimiento, por ejemplo, a aproximadamente 8 semanas de edad, o 9 semanas de edad, o 10 semanas de edad, u 11 semanas de edad, o 12 semanas de edad, o 13 semanas de edad.

El animal puede recibir una única administración de la composición de la invención o puede recibir múltiples administraciones, tales como dos, tres, cuatro o más administraciones. Cuando se realizan múltiples administraciones de la composición, típicamente se separarán en aproximadamente uno, dos, tres o cuatro meses en el caso de administración a cerdos jóvenes.

El método de la divulgación también es beneficioso en el tratamiento de la OCD sintomática. En tales casos, el animal receptor típicamente es un animal más mayor, tal como de más de seis meses de edad. En animales más mayores, la administración múltiple de las composiciones de la invención se puede separar en aproximadamente dos a seis semanas, o en aproximadamente uno, dos, tres o cuatro meses o más. La elección del momento de la administración múltiple puede determinarse por el destinatario experto, por ejemplo, puede ser sobre la base de la reaparición o el aumento de la gravedad de los síntomas, el embarazo, el destete, etc.

35

Como se describe anteriormente, las composiciones para su uso de la invención y los métodos de la divulgación encuentran aplicación en la prevención de la aparición de OCD en cerdos y en la reducción de la gravedad de la OCD y otras afecciones ortopédicas del desarrollo en cerdos. Otros mamíferos, incluidos los seres humanos, perros, ganado y caballos, también pueden padecer afecciones ortopédicas del desarrollo, tal como OCD, por ejemplo, a través de la predisposición debido al entorno o la genética. La invención también encuentra aplicación en la prevención de la aparición, o la gravedad de, o en el tratamiento de afecciones ortopédicas del desarrollo, tal como OCD, en dichos animales.

Como se describe en el presente documento, las composiciones de la invención también son capaces de tratar enfermedades articulares, artritis y afecciones inflamatorias en mamíferos afectados. Las composiciones de la invención también son útiles para aliviar el dolor en sujetos mamíferos. El mamífero puede ser cualquier mamífero tal como un ser humano, un animal doméstico, un animal de granja, tal como un semental, cría o animal productor, tal como para la producción de carne o productos lácteos. En el tratamiento de la artritis clínicamente relevante, por ejemplo, el animal de granja puede ser un cerdo. El cerdo puede ser un cerdo joven o puede ser una cerda reproductora. Por ejemplo, una cerda preñada clínicamente afectada puede ser tratada para ayudarla a pasar al parto.

Tratamiento del dolor

El inventor ha identificado que las composiciones de la invención son útiles en el tratamiento de sujetos que tienen dolor. Se describen diversos tipos específicos de dolor en el presente documento, incluidos los siguientes.

Afecciones musculoesqueléticas dolorosas distintas de la artritis.

Las afecciones musculoesqueléticas dolorosas son comunes, con una prevalencia de aproximadamente el 30%. Para afecciones musculoesqueléticas distintas de la artritis, el pronóstico es generalmente bueno; la mayoría de las personas se recuperan en unas pocas semanas después del inicio de los síntomas. Sin embargo, una minoría significativa no se recupera y desarrolla un dolor crónico o de larga duración, definido como un dolor que dura más de 3 meses. Para estos pacientes el pronóstico es malo y la recuperación es lenta. Un enfoque importante de la investigación contemporánea es la identificación temprana de pacientes que corren un alto riesgo de un mal resultado. Un hallazgo común de esta investigación es que la alta intensidad temprana del dolor es un factor de riesgo para la recuperación tardía y el desarrollo de dolor crónico.

10 La causa más frecuente de dolor musculoesquelético crónico es el dolor lumbar. Más de 1 millón de australianos tienen una discapacidad asociada con sus problemas de espalda y es la razón principal por la que los australianos abandonan el mercado laboral. Otras condiciones comunes pero menos frecuentes de dolor crónico incluyen: dolor de cuello y hombro, trastorno asociado al latigazo cervical (WAD) y síndrome de dolor regional complejo (CRPS).

15 El **dolor de espalda** es una afección de salud extremadamente común, difícil de manejar y costosa. En Australia, el dolor de espalda se asocia con costes de aproximadamente \$ 9 billones/año. Más del 85% del dolor lumbar es dolor lumbar "no específico" (NSLBP) en el sentido de que no se puede identificar de manera fiable una fuente estructural del dolor. Las dianas terapéuticas plausibles son tejidos inervados e incluyen el disco, la articulación facetaria y la articulación sacroilíaca, sin embargo, otros tejidos, tales como el músculo y el ligamento, también pueden estar involucrados. Hasta el 15% del dolor lumbar es una radiculopatía en la que el pinzamiento de la raíz nerviosa causa síntomas que incluyen dolor de espalda y piernas. Se cree que el dolor asociado con la radiculopatía se asocia con un proceso inflamatorio local. Los tratamientos para el dolor radicular incluyen consejos para mantenerse activo, analgesia como AINE, inyección epidural de corticosteroides e inyecciones perirradiculares de corticosteroides transforaminales.

25

Dolor de cuello y hombros

El **trastorno asociado con latigazo cervical** (WAD) son lesiones en el cuello causadas por la transferencia de energía por aceleración-deceleración que son resultado más comúnmente de un accidente de vehículo motorizado.

30 Como ocurre con la mayoría de las afecciones musculoesqueléticas dolorosas, el pronóstico de las nuevas lesiones típicamente es bueno en las primeras semanas o meses, pero después de 3 meses, las tasas de recuperación disminuyen notablemente y una proporción significativa de pacientes desarrolla un trastorno asociado con latigazo cervical crónico (WAD). Se sabe que la intensidad alta del dolor es un predictor o un mal resultado. El latigazo es en gran parte resistente a los tratamientos conservadores.

35

Síndrome de dolor regional complejo

El síndrome de dolor regional complejo (CRPS) es una complicación de un traumatismo menor, normalmente en una extremidad, que se caracteriza por dolor incapacitante, hinchazón, cambios de color y temperatura, y desmineralización ósea en la extremidad. En Australia, a un promedio de 5000 personas se les diagnostica CRPS cada año. El traumatismo menor más común es la fractura de muñeca. La incidencia de CRPS después de la fractura de muñeca es del 5-7%. El pronóstico es malo y las opciones de tratamiento a menudo son altamente invasivas, tienen perfiles significativos de efectos secundarios y son solo moderadamente eficaces. Se piensa que la causa principal de CRPS es una respuesta inflamatoria aberrante a la lesión tisular y los pacientes con CRPS

45 expresan un equilibrio más proinflamatorio en comparación con aquellos sin la afección.

Dolor neuropático

El inventor ha identificado que las composiciones de la invención son útiles en el tratamiento de sujetos con dolor para los que no existe una causa clínica discernible, tales como algunas formas de dolor neuropático. El dolor neuropático se refiere a un grupo de trastornos dolorosos caracterizados por dolor debido a una disfunción o enfermedad del sistema nervioso a nivel periférico, a nivel central, o ambos. Es una entidad compleja con muchos síntomas y signos que fluctúan en número e intensidad a lo largo del tiempo. Los tres componentes comunes del dolor neuropático son el dolor constante y neurálgico; ataques paroxísticos espontáneos; e hipersensibilidad.

55

El dolor neuropático puede ser muy incapacitante, grave e intratable, causando angustia y sufrimiento a los individuos, incluida disestesia y parestesia. Los déficits sensoriales, tal como la pérdida parcial o compleja de la sensación, también se ven con frecuencia. Además, existen importantes consecuencias psicológicas y sociales relacionadas con el dolor neuropático crónico, que contribuyen a una reducción de la calidad de vida.

El dolor neuropático es bastante común en la práctica médica general. En algunas formas, el dolor neuropático no está asociado con ninguna afección clínica causante discernible. Como ejemplo, se demuestra en el presente documento que las composiciones de la invención son eficaces para aliviar el dolor facial neuropático. En algunas formas, el dolor neuropático está asociado con una afección clínica discernible. La prevalencia de la neuralgia trigeminal es de 2,1 a 4,7 personas por cada 100.000 habitantes, y la neuropatía diabética dolorosa tiene lugar en el 11% al 16% de los diabéticos tipo 1, así como en los diabéticos tipo II, y la neuralgia postherpética se encuentra en aproximadamente 34 personas por cada 100.000 habitantes. El tratamiento del dolor neuropático no es fácil. Los pacientes con dolor neuropático no siempre responden a analgésicos estándar, tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y, en cierta medida, el dolor neuropático es resistente a los opiáceos. Los agentes farmacológicos mejor estudiados y más utilizados para el tratamiento del dolor neuropático son los antidepresivos y los anticonvulsivos, los cuales pueden tener efectos secundarios graves.

Una composición de la invención puede administrarse a un sujeto para el tratamiento de tal dolor en cualquier sitio apropiado. La administración típicamente puede ser usando un tipo apropiado de inyección o puede ser por aplicación tópica. Por ejemplo, una inyección puede ser subcutánea, intramuscular, o directamente en un sitio accesible en o cerca de un sitio del dolor. Como este tipo de dolor puede manifestarse en múltiples áreas del cuerpo del sujeto, por ejemplo, dolor en la mandíbula y dolor en las extremidades u hombros, la administración puede ser en o cerca de un sitio del dolor y lejos de otro sitio afectado por el dolor. Típicamente, cuando se producen múltiples sitios de dolor en un paciente, la administración se realiza en o cerca de un sitio identificado como un sitio original o primario del dolor. Como ilustración de este tratamiento, los ejemplos en el presente documento muestran el tratamiento del dolor facial neuropático mediante inyección en la encía del sujeto. A un sujeto que se está tratando se le puede administrar una aplicación única de una composición de la invención, tal como una inyección única, o se pueden administrar múltiples aplicaciones, tales como inyecciones múltiples.

La invención se describirá ahora con más detalle, solamente a modo de ilustración, con respecto a los siguientes ejemplos. Los ejemplos pretenden servir para ilustrar esta invención y no deben interpretarse como limitantes de la generalidad de la divulgación de la descripción a lo largo de esta memoria descriptiva.

30 Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación de un extracto libre de células

Preparación del tejido adiposo

Se recogió una muestra de 10 g de tejido adiposo por escisión de la almohadilla de grasa inguinal de un perro. El tejido adiposo se aclaró con una solución salina y después se trocó finamente con unas tijeras y se mezcló con 20 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma). Se añadió colagenasa (Sigma) para producir una concentración final del 0,05% p/v y la muestra se incubó a 37°C durante 30 minutos. Al final de los 30 minutos, el tejido adiposo se digirió parcialmente y consistió en una mezcla de partículas de grasa parcialmente digeridas, células vasculares estromales liberadas (SVC) y adipocitos liberados. Después, la muestra se centrifugó a 500 g durante 15 minutos. Se pudieron ver cuatro capas distintas dentro de la muestra centrifugada: una pequeña capa (2 mm de espesor) de lípido libre en la superficie, debajo de la cual había una capa blanca de 20 mm de espesor de tejido adiposo y adipocitos, y después una gran capa transparente de DMEM y después un sedimento de células no adipocitarias derivadas de tejido adiposo. La pequeña capa de lípido se eliminó cuidadosamente con una pipeta pasteur. Después se insertó cuidadosamente una pipeta pasteur nueva a través de los adipocitos y se eliminó el DMEM transparente sin alterar el tejido adiposo flotante, los adipocitos o las células sedimentadas. Esto dio como resultado una muestra que contenía solamente las piezas flotantes de tejido adiposo y los adipocitos suspendidos en un pequeño volumen de DMEM y las células sedimentadas. Los trozos de tejido adiposo y los adipocitos y las células sedimentadas se mezclaron suavemente con una pipeta pasteur y se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 ml. Los trozos de tejido adiposo y las células se lavaron entonces en DMEM para eliminar la colagenasa de la siguiente manera. Se añadió DMEM a un volumen final de 14 ml y la muestra se centrifugó a 500 g durante 10 minutos. Esto dio lugar a tres capas distintas: trozos flotantes de tejido adiposo y adipocitos, DMEM y células no adipocitarias derivadas de tejido adiposo sedimentadas. El DMEM se eliminó cuidadosamente insertando una pipeta pasteur a través de los adipocitos teniendo cuidado de no alterar los trozos de tejido adiposo, los adipocitos o las células sedimentadas.

Cultivo de tejido

Los trozos flotantes de tejido adiposo y adipocitos y las células sedimentadas se resuspendieron suavemente en 10 ml de DMEM y se transfirieron a un matraz de cultivo tisular de 300 ml. Se añadieron un volumen de 30 ml de DMEM y 10 ml de suero estéril autólogo y después el matraz se incubó a 37°C con el 5% de CO₂. El matraz se examinó a diario por microscopía. Las células se unieron y su aspecto similar a los fibroblastos se produjo entre los días 3 y 6.

5 Las células unidas se volvieron confluentes entre los días 5 y 10.

Recolección de secreciones celulares libres de células

Una vez que las células se encontraban confluentes en la base del matraz, se recogió el sobrenadante y el tejido adiposo suspendido y las células se eliminaron por filtración a través de una malla de 20 micrómetros. La solución se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,22 micrómetros y después se dispensó asepticamente en viales de 10 ml y se almacenó congelada a -20°C. En los siguientes ejemplos, este material puede denominarse "CellFree".

10

Ejemplo 2. Producción de extractos concentrados libres de células caninas

15 Los volúmenes (100 ml) de los extractos libres de células congelados en el Ejemplo 1 se liofilizaron en un liofilizador Telstar Lyobeta durante 2 días. La torta liofilizada resultante se rehidrató con 10 ml de agua destilada. Después, la muestra concentrada se sometió a sonicación en un baño de agua de sonicación durante 20 min. Los volúmenes de 10 ml contenían una mezcla concentrada de citocinas.

20

Ejemplo 3. Administración subcutánea de extractos libres de células de tejido adiposo canino a perros artríticos

En este ejemplo, se investigó la seguridad y la eficacia de las inyecciones subcutáneas de las secreciones celulares caninas preparadas de acuerdo con el Ejemplo 1 anterior, en el tratamiento de la osteoartritis en perros. Cinco perros recibieron inyecciones subcutáneas en el codo una vez por semana durante cuatro semanas a una tasa de 0,3 ml/10 kg de peso corporal. Los perros en este ensayo tenían una edad predominantemente avanzada (>10 años) y tenían una diversidad de trastornos de las articulaciones y los huesos, incluida osteoartritis del codo, displasia crónica de cadera, enfermedad de la babilla y malformaciones cervicales. Individualmente, los perros en este ensayo recibieron cada uno un rango de medicamentos para el tratamiento de sus afecciones (Tabla 1). La medicación existente se detuvo mientras se realizaba el ensayo. Los perros fueron evaluados por sus veterinarios tratantes habituales, y fueron observados por sus dueños para detectar cambios anecdóticos, tales como cambios en el comportamiento, movilidad y signos evidentes de dolor. El ensayo se resume en la **Tabla 1**.

25

30

35 **Tabla 1: Administración subcutánea de extractos libres de células de tejido adiposo canino a perros artríticos**

Perro/Edad	Afección	Medicación existente	Continuación o interrupción de la medicación	Efectos adversos	Comentarios
Smudge 12 a	OA crónica del codo	Cartrophen mensual	Interrupción	Ninguno observado	OA no se deterioró
Oz 14 a	Displasia crónica de la cadera	Cartrophen mensual	Interrupción	Ninguno observado	OA no se deterioró
Daisy 13 a	Enfermedad de la babilla	Metacam	Interrupción	Ninguno observado	Mejoría notable; menos dolor; mas activo; los dueños propietarios informan mejor que Metacam
Lassie 10 a	OA del codo leve	Ninguno	n/a	Ninguno observado	Moderadamente menos cojo, más móvil; menos dolorido
Versace 10 a	Malformaciones cervicales	Prednisona	Interrupción	Ninguno observado	Gran mejora en la estabilidad y niveles de actividad

No se observaron reacciones adversas con inyecciones repetidas. Los cinco perros no se deterioraron a pesar de que se suspendió su medicación actual. Tres de los cinco perros mostraron una mejora significativa por encima de lo que se vio con su medicación anterior.

40

Ejemplo 4. Administración subcutánea de secreciones concentradas de tejido adiposo canino a perros artríticos

5 Los resultados de los ensayos presentados en el Ejemplo 3 demostraron que no hay efectos adversos asociados con el método de la divulgación y también demostraron que en algunos sujetos tratados la administración remota de las secreciones de células derivadas de tejido adiposo se asoció con una actividad mejorada del sujeto, movilidad mejorada o un grado de dolor aparentemente menor. El inventor razonó que la administración de una dosis más alta de secreciones de células derivadas de tejido adiposo puede proporcionar otras ventajas.

10

Se usó un extracto concentrado libre de células producido como se describe en los Ejemplos 1 y 2 para tratar 9 perros artríticos. Se administró un volumen de 2 ml del extracto libre de células concentrado mediante inyección subcutánea en el cogote. Los perros se examinaron de nuevo después de 10 días por un veterinario. Los resultados se presentan en la **Tabla 2**.

15

Tabla 2: Administración subcutánea de secreciones concentradas de tejido adiposo canino a perros artríticos

Raza	Edad (a)	Afección	Fecha de tratamiento	Resultado
Pastor alemán	10	OA de la cadena	5.8.11	Movilidad mejorada y menos dolor.
Samoyedo	11	Cojera	19.7.11	Movilidad mejorada y menos dolor.
Doberman	10	Malformaciones cervicales	7.7.11	Gran mejora. Perro más estable, activo y con mayor control sobre los movimientos intestinales.
Border Collie	12	OA	5.8.11	Más activo, mejor movilidad y menos dolor.
Pastor alemán	6	OA	30.7.11	Mucho mejor. Más activo, mejor movilidad y menos dolor.
Dogo de Burdeos	3	OA	11.6.11	Más activo, mejor movilidad y menos dolor.
Labrador	12	OA, problemas neurológicos.	8.8.11	Más activo, mejor movilidad y menos dolor.
Cruce de Bullmastiff (principal)	13	Caderas artríticas	1.4.11	Más activo y móvil, sin dolor. El efecto no ha disminuido cuando se evalúa después de 5 meses.
Golden Retriever (Rubio)	12	Codos y cadenas artríticas	28.4.11	Más activo y móvil, sin dolor. El efecto duró 4 meses. El efecto fue de nuevo evidente después de volver a administrar el tratamiento.

Ejemplo 5. Administración subcutánea de extractos libres de células de tejido adiposo canino a perros con dermatitis atópica.

20

Un extracto libre de células preparado como se describe en el Ejemplo 1 se administró mediante inyección subcutánea a tres perros con dermatitis atópica. Se inyectó un volumen de 3 ml en el cogote, una vez a la semana durante 3 semanas. Los tres perros mostraron una mejoría cuando se evaluaron mediante un examen veterinario entre 2 y 4 semanas después del tratamiento, su afección mejoró, y el resultado principal fue la reducción de la inflamación (**Tabla 3**).

25

Tabla 3: Administración subcutánea de extractos libres de células de tejido adiposo canino a perros con dermatitis atópica.

Nombre	Edad	Raza	Afección tratada	Resultado	Comentarios
Gemma	10 años	Cruce de Bullmastiff	Dermatitis atópica	Mejora moderada en la afección de la piel	En general, mucho menos inflamada, todavía hay algunas pápulas;
Topaz	6 años	Pastor alemán	Dermatitis atópica	Mejoría menor en la piel	Lesiones en el vientre, menos inflamado, lesión en la cola costrosa del secador.
BJ	2	Cruce de	Dermatitis	Mejora	Los pies se ven muy bien, la lesión del brazo

	años	Kelpie	atópica	significativa en la afección de la piel	izquierdo ha mejorado mucho, el pelaje generalmente se ve más brillante. La inflamación original a lo largo del vientre, brazo, pecho y patas mejoró.
--	------	--------	---------	---	---

Ejemplo 6. Administración subcutánea de extractos concentrados libres de células de tejido adiposo equino en un caballo con cojera.

- 5 Se preparó un extracto libre de células equinas como se describe en el Ejemplo 1 usando tejido adiposo recogido de la base de la cola de un caballo. El tejido adiposo se procesó exactamente como se describe en el Ejemplo 1, excepto que se añadió suero equino autólogo al matraz de cultivo tisular en lugar de suero canino. El extracto libre de células se concentró por liofilización como se describe en el Ejemplo 2.
- 10 Se administró un volumen de 2 ml del extracto libre de células concentrado mediante inyección subcutánea en el cuello de un caballo de carreras que estaba ligeramente cojo. El caballo había sido tratado previamente con inyecciones intraarticulares de esteroides y ya no respondía a este tratamiento.

El caballo mostró una marcada reducción en la cojera dos días después de la administración del extracto libre de células.

Ejemplo 7: Administración subcutánea de extractos concentrados libres de células de tejido adiposo equino en caballos.

- 20 Se trataron cinco caballos con daño de ligamento suspensorio u osteoartritis de las rodillas en estadio temprano con secreciones equinas concentradas (Ejemplo 6) mediante inyección subcutánea en el cuello dos días antes de la carrera. Todos los caballos demostraron una movilidad mejorada (**Tabla 4**).

Tabla 4: Administración subcutánea de extractos concentrados libres de células de tejido adiposo equino en caballos

25

Fecha	Problema	Efecto
16/8/11	OA de fase temprana en las rodillas	Movilidad mejorada y menos cojo, rindió mejor de lo esperado en la carrera.
19/8/11	Lesión del ligamento suspensorio	Movilidad mejorada y menos cojo, rindió mejor de lo esperado en la carrera (ganó).
19/8/11	Lesión del ligamento suspensorio	Movilidad mejorada y menos cojera.
10/9/11	Lesión del ligamento suspensorio	Movilidad mejorada y menos cojo, rindió mejor de lo esperado en la carrera.
10/9/11	OA de fase temprana en las rodillas	Movilidad mejorada y menos cojo, rindió mejor de lo esperado en la carrera.

Ejemplo 8. Tratamiento de la osteoartritis en perros mediante inyección subcutánea de células derivadas de tejido adiposo alogénicas crioconservadas que incluyen adipocitos.

30 **Procesamiento del tejido adiposo**

- Se recogió una muestra de 10 g de tejido adiposo falciforme de una perra durante un procedimiento de castración de rutina. El tejido adiposo se aclaró con una solución salina y después se troceó finamente con unas tijeras y se mezcló con 20 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma). Se añadió colagenasa (Sigma)
- 35 hasta una concentración final del 0,05% p/v y la muestra se incubó a 37°C durante 90 minutos. Durante la incubación, la muestra se invirtió suavemente a mano cada 15 minutos.

Después del tratamiento con colagenasa, la muestra se filtró asépticamente a través de una malla de acero inoxidable (tamaño de poro de 700 micrones), se transfirió a un tubo de centrifuga de 50 ml y se centrifugó a 500 g

40 durante 15 minutos.

Se pudieron ver cuatro capas distintas dentro de la muestra centrifugada: una pequeña capa (2 mm de espesor) de lípido libre en la superficie, debajo de la cual había una capa blanca de 10 mm de espesor de y adipocitos, y

después una gran capa transparente de DMEM y después un sedimento de células SVF. La pequeña capa de aceite se eliminó cuidadosamente con una pipeta pasteur. Después se insertó cuidadosamente una pipeta pasteur nueva a través de los adipocitos y se eliminó el DMEM transparente sin alterar los adipocitos flotantes, o las células SVF sedimentadas. Esto dio como resultado una muestra que contenía solo los adipocitos flotantes y las células SVF sedimentadas. Las células flotantes y las células sedimentadas se mezclaron suavemente con una pipeta pasteur y se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 ml.

Después, las células se lavaron en DMEM para eliminar la colagenasa. Se añadió DMEM a un volumen final de 14 ml y la muestra se centrifugó a 500 g durante 10 minutos. Esto dio lugar a tres capas distintas: adipocitos flotantes, DMEM y células SVF sedimentadas. El DMEM se eliminó cuidadosamente insertando una pipeta pasteur a través de los adipocitos teniendo cuidado de no alterar los adipocitos o las células sedimentadas.

Las células flotantes y sedimentadas se resuspendieron suavemente en 4 ml de DMEM y se mezclaron con una pipeta pasteur.

15

Expansión y crioconservación de las células

Se transfirieron alícuotas (0,5 ml) de la suspensión celular a un matraz de cultivo tisular T175 que contenía 50 ml de DMEM más un 10% de suero canino y se incubaron en una incubadora de CO₂ a 37°C hasta que estuvo presente una monocapa de células confluentes (6 días). Las células flotantes (adipocitos) todavía tenían una morfología sana en este momento.

Las células se dividieron con 3 ml de TrypLE Express (Invitrogen), se decantaron en tubos de centrifuga de 50 ml y se centrifugaron a 500 x g durante 10 minutos. Las células flotantes y las células sedimentadas se resuspendieron en 2 ml de suero canino más DMSO al 10% y se transfirieron a un criovial. Los crioviales se congelaron en un dispositivo de congelación lenta Mr Frosty (Invitrogen) en un congelador a -80°C durante 24 horas y después se transfirieron a un contenedor dewar de nitrógeno líquido.

Administración de células a perros

30

Se administró a siete perros con osteoartritis una única inyección subcutánea de células en el cogote. El criovial por perro se descongeló a temperatura ambiente y la suspensión celular se extrajo con una jeringa y una aguja hipodérmica. Se inyectaron los 2 ml completos de suspensión celular.

Supervisión de los perros

Los perros se supervisaron durante un periodo de 8 semanas por sus dueños y se examinaron por un veterinario. Seis de los siete perros mostraron una marcada mejoría en su movilidad y una aparente reducción del dolor. El séptimo perro no mejoró, pero no mostró una respuesta negativa.

40

Ejemplo 9. Tratamiento de la osteoartritis en perros mediante inyección subcutánea de células mezcladas con secreciones celulares.

Se retiró un vial de las células crioconservadas como se describe en el Ejemplo 8 del nitrógeno líquido y se mezcló con 5 ml de secreciones caninas calientes (37°C) preparadas como en el Ejemplo 1. Las células y las secreciones se extrajeron entonces en una jeringa y se administraron por vía subcutánea en el cogote del un perro con artritis. El perro respondió bien al tratamiento y mostró una rápida mejoría en la movilidad y una reducción del dolor.

Ejemplo 10. Preparación de células derivadas de tejido adiposo que se habían premezclado con secreciones celulares y después se congelaron.

50

Procesamiento del tejido adiposo

Se recogió una muestra de 10 g de tejido adiposo falciforme de una perra durante un procedimiento de castración de rutina. El tejido adiposo se aclaró con una solución salina y después se troceó finamente con unas tijeras y se mezcló con 20 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma). Se añadió colagenasa (Sigma) hasta una concentración final del 0,05% p/v y la muestra se incubó a 37°C durante 90 minutos. Durante la incubación, la muestra se invirtió suavemente a mano cada 15 minutos.

55

Después del tratamiento con colagenasa, la muestra se filtró asépticamente a través de una malla de acero inoxidable (tamaño de poro de 700 micrones), se transfirió a un tubo de centrifuga de 50 ml y se centrifugó a 500 g durante 15 minutos.

- 5 Las células flotantes y el sobrenadante se desecharon y las células sedimentadas se mezclaron suavemente con una pipeta pasteur y se transfirieron un tubo de centrifuga de 15 ml.

Después, las células se lavaron en DMEM para eliminar la colagenasa. Se añadió DMEM a un volumen final de 14 ml y la muestra se centrifugó a 500 g durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó y las células SVF
10 sedimentadas se resuspendieron suavemente en 4 ml de DMEM y se mezclaron con una pipeta pasteur.

Expansión de las células

Se transfirieron alícuotas (0,5 ml) de la suspensión celular a matraces de cultivo tisular que contenían DMEM más un
15 10% de suero canino y se incubaron en una incubadora de CO₂ a 37°C hasta que estuvo presente una monocapa de células confluentes (7 a 10 días). Las células se dividieron con 3 ml de TrypLE Express (Invitrogen), se decantaron en tubos de centrifuga de 50 ml y se centrifugaron a 500 x g durante 10 minutos. Las células se crioconservaron en este punto, en un dispositivo de congelación lenta Mr Frosty como se describe en el Ejemplo 8, o se colocaron en nuevos matraces de cultivo tisular y se sometieron a pases hasta que se duplicaron
20 aproximadamente 8 o 13 veces. Las células de pase se separaron y se centrifugaron.

Crioconservación de las células

Las muestras de células sedimentadas (sin pase, aprox. 8 duplicados y aprox. 13 duplicados) se dividieron cada una
25 en dos muestras, una se mezcló con las secreciones concentradas, mientras que la otra no. Las células se resuspendieron en suero canino o una mezcla de suero canino más secreciones caninas concentradas que se produjeron de acuerdo con el Ejemplo 1, pero que se habían concentrado diez veces mediante centrifugación en un tubo de filtro de centrifuga Amicon de 3 kDa (Millipore). Las secreciones concentradas se mezclaron con suero canino en una relación de 1 a 1 o en una relación de 1 parte de secreciones concentradas con respecto 10 partes de
30 suero. La suspensión celular se mezcló con el suero y las secreciones y después se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir que las secreciones interactuaran con las células. Después, las suspensiones celulares se transfirieron a crioviales en alícuotas de 2 ml.

Se añadió DMSO a cada criovial para producir una concentración final del 10% y los crioviales se congelaron en un
35 dispositivo de congelación lenta Mr Frosty (Invitrogen) en un congelador a -80°C durante 24 horas y después se transfirieron a un contenedor dewar de nitrógeno líquido para un almacenamiento a largo plazo.

Descongelación de células crioconservadas y análisis de viabilidad celular

40 Los viales se retiraron del nitrógeno líquido y se dejaron descongelar a temperatura ambiente. Los viales se mezclaron por inversión suave y después se eliminó un volumen de 0,1 ml para medir la viabilidad. El volumen de 0,1 ml se colocó en un tubo de citometría de flujo y se mezcló con 0,9 ml de Isoflow (Beckman Coulter) que contenía yoduro de propidio (Sigma Chemical Company, Louisville, EE.UU.) a una concentración de 10 µg/ml y Syto11 (Molecular Probes, Eugene, EE.UU.) a una concentración de 1 µg/ml. Las muestras se analizaron en un citómetro de
45 flujo FACSCan y se registró el porcentaje de Syto11 positivo (células vivas) y yoduro de propidio positivo (células muertas).

Cultivo de células crioconservadas

50 Se colocó un volumen de 1 ml de las muestras descongeladas en un matraz de cultivo de tejidos T75 con DMEM y suero de ternera fetal al 10% y se incubaron a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5% durante 5 días. Después, los matraces se examinaron cada día utilizando un microscopio invertido y se registró el porcentaje de confluencia.

Las muestras de medios de cultivo tisular de los matraces se extrajeron y se analizaron utilizando el ensayo de
55 citocina, quimiocina y factor de crecimiento humano 27-plex de Bio-Plex Pro (Biorad, Hercules, EE.UU.) para ILR1a, G-CSF, VEGF e IL-10. Las muestras de control de medio recién preparado con y sin secreciones se incluyeron como controles.

Evaluación de la viabilidad celular después de la crioconservación

La viabilidad de las células congeladas con las secreciones fue mayor que en las células congeladas sin secreciones (Tabla 5).

5 **Tabla 5: Viabilidad de células de pase (13 duplicados celulares) y sin pase congeladas con y sin secreciones**

Tipo de célula	Viabilidad promedio después de la congelación
Células sin pase y sin secreciones	66,83%
Células sin pase con secreciones	75,70%
Células con pase (13 duplicados celulares) sin secreciones	35,95%
Células con pase (13 duplicados celulares) con secreciones	71,6%

Evaluación de la proliferación después de la congelación utilizando el ensayo EDU Click-iT

Las tasas de proliferación de células descongeladas se evaluaron utilizando el ensayo EDU Click-iT (Life Technologies). Se transfirió un volumen de la suspensión de células descongeladas que contenía aproximadamente 500.000 células a una placa de 6 pocillos. Se añadió un volumen de 2 ml de DMEM más un 10% de suero canino al pocillo. El reactivo EDU se añadió al pocillo para crear una concentración final de 10 μ M. La placa se incubó a 37°C con el 5% de CO₂ en una incubadora de CO₂ a 37°C durante 2 horas. Se recogió el sobrenadante y se dividieron las células adherentes y se combinaron ambos, se lavaron (en PBS más albúmina de suero bovino al 1%; Sigma) y se resuspendieron en 100 μ l de fijador Click-iT y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente para fijar las células. Después, las células se lavaron y se resuspendieron en 100 μ l de agente de permeabilización Click-iT para permeabilizar las células. Las células se marcaron para su detección, mediante incubación (30 min) en el cóctel de reacción Click-iT (500 μ l) que contenía 2,5 μ l de tinte fluorescente AlexaFluor 488. Después de la incubación, las células se lavaron con permeabilización de Click-iT y reactivo de lavado y se analizaron mediante citometría de flujo. Las células se analizaron entonces utilizando un citómetro de flujo FACScan. Las células en proliferación mostraron un aumento en la fluorescencia verde en comparación con las células no proliferantes.

Los resultados del análisis de las células se muestran en la **Figura 1**. La muestra que se había almacenado congelada como células más secreciones mostró una población de células en proliferación igual al 16,8% de las células totales. Las muestras que se habían almacenado congeladas como células sin secreciones mostraron una población de células en proliferación igual a solo el 1,8% de las células totales.

Recuperación de las células después de la congelación

La adición de secreciones a las células antes de congelar las células mejoró la capacidad de las células para sobrevivir al proceso de congelación y para proliferar después de la descongelación. Se observó que las células que se habían cultivado hasta que alcanzaron el doble de células acumulativas de aproximadamente 8 y que se habían congelado con las secreciones se adhirieron al matraz de cultivo tisular más rápidamente y que crecían más rápidamente que las mismas células congeladas sin secreciones. A las 24 horas, las células congeladas con secreciones habían alcanzado un 90% de confluencia, mientras que las células congeladas sin secreciones habían alcanzado solo un 60% de confluencia (Tabla 6).

Tabla 6: Evaluación de las células cultivadas (aproximadamente 8 duplicados de células acumulativas) congeladas con y sin secreciones

Tipo de célula	Confluencia después de 24 horas en cultivo después de la descongelación
Células congeladas sin secreciones	60%
Células congeladas con secreciones	90%

Comparación de citocinas producidas a partir de células congeladas con y sin secreciones

Las células que se habían cultivado a través de aproximadamente 8 duplicados de células acumulativas y que se congelaron con secreciones produjeron una mayor cantidad estadísticamente significativa (prueba t de dos colas) de las citocinas IL1 α , IL-6, IL-8, IL-9, IL-12, IL-13, FGF básico, TNF- α y VEGF que las mismas células congeladas sin secreciones (Tabla 7), tras el cultivo después de la descongelación durante 5 días.

Tabla 7. Comparación de citocinas producidas por células que se habían congelado con o sin secreciones.

Los números son la media de tres repeticiones.

Muestra	IL-1ra	IL-6	IL-8	IL-9	IL-10	IL-12	IL-13	FGF básico	TNF-a	VEGF
Células con secreciones	80	8	17	10	43	91	8	14	20	5166
Células	20	0	0	0	18	38	3	0	1	988
valor p	0,005	0,000	0,006	0,000	0,115	0,016	0,039	0,000	0,001	0,059

Estos conjuntos de datos demuestran que existe un efecto beneficioso al combinar las secreciones con las células antes de congelarlas. Las células que se congelan sin secreciones pierden su capacidad de proliferar y producir citocinas. La inclusión de las secreciones con las células antes de la congelación conserva la capacidad de las células para proliferar y producir citocinas.

Ejemplo 11. Producción de secreciones de células de pase y uso de las secreciones para congelar células.

10 Se aislaron células caninas derivadas de tejido adiposo y se cultivaron como se describe en el Ejemplo 10. Las células se sometieron a pases hasta que las células alcanzaron una duplicación celular acumulativa de aproximadamente 13 veces. El sobrenadante de cultivo tisular de las células se concentró utilizando un tubo de filtro de centrifuga Amicon de 3 kDa (Millipore). Las secreciones concentradas se mezclaron con suero en una relación de 1 a 1. Las células se dividieron, se lavaron y el sedimento celular se resuspendió en la mezcla de suero y secreciones y después se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir que las secreciones interactuaran con las células. Después, las suspensiones celulares se transfirieron a crioviales, se mezclaron con DMSO al 10% y se congelaron como se describe en el Ejemplo 10.

20 Las suspensiones celulares crioconservadas se descongelaron y se cultivaron en matraces de cultivo tisular como se describe en el Ejemplo 10. A las 72 horas, las células congeladas con secreciones habían alcanzado un 90% de confluencia, mientras que las células congeladas sin secreciones habían alcanzado solo un 20% de confluencia (**Figura 2**). Es importante destacar que las células sin secreciones se volvieron senescentes y no alcanzaron más del 20% de confluencia ni siquiera después de 10 días de incubación.

25 Este es un hallazgo importante. Existe la necesidad de poder expandir las células madre mesenquimales y otros tipos de células en el cultivo tisular para producir un gran número de células. Sin embargo, las células madre mesenquimales y otros tipos de células no se pueden cultivar indefinidamente. Después de varias duplicaciones de células, las células se vuelven senescentes y no se multiplicarán más. Esto limita el número de dosis que se pueden producir a partir de un solo cultivo.

30 Para producir un gran número de células a partir de un solo cultivo de partida, es necesario configurar un banco de células de viales crioconservados. Normalmente se crea un banco de doble célula. Se crea un primer conjunto de viales crioconservados y uno de estos viales se descongela entonces y se utiliza para producir un segundo conjunto de viales crioconservados. Cada vez que se produce un lote de producto, uno de estos segundos viales se descongela y se pone en cultivo. Este proceso de banco de células típicamente da como resultado células que no son tan terapéuticamente eficaces como las células recién aisladas. Al combinar las secreciones con las células durante las etapas de congelación, se supera este problema y se permite la producción de un producto congelado terapéuticamente eficaz.

40 Ejemplo 12. Tratamiento del dolor facial neuropático con células autólogas derivadas de tejido adiposo.

Se trató a cuatro pacientes humanos que padecían dolor facial neuropático con una suspensión de células derivadas de tejido adiposo autóloga que comprendía células de la fracción vascular estromal y adipocitos.

45 Se usó liposucción para extraer aproximadamente 200 gramos de tejido adiposo del abdomen y/o muslos de cada paciente. El lipoaspirado se procesó inmediatamente después de la extracción mediante lavado con solución salina estéril y después por digestión añadiendo colagenasa estéril hasta una concentración final del 0,05% p/v. La muestra se incubó a 37°C durante 20 minutos, se filtró a través de una malla de 800 micrómetros y se transfirió a tubos de centrifuga.

50 Los tubos de centrifuga se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos, y se eliminó la capa entre los adipocitos flotantes y las células sedimentadas. El sedimento celular y los adipocitos flotantes se combinaron y se añadió una solución salina esterilizada por filtración hasta que los tubos se llenaron. Las muestras se centrifugaron de nuevo a 400 g durante 10 minutos y se eliminó la capa entre las células sedimentadas y los adipocitos flotantes. La preparación celular resultante se diluyó a un volumen de 10 ml con solución salina estéril y se dispensó en

volúmenes de 2 ml en jeringas estériles.

A los pacientes se les administraron cuatro o cinco inyecciones de 2 ml de volumen en sus encías en el sitio original del dolor.

5

Se realizó el seguimiento de los pacientes entre 4 y 8 semanas después del tratamiento y su nivel de dolor se evaluó mediante una escala analógica visual (0 = sin dolor, 10 = peor dolor imaginable). Los resultados de estas evaluaciones se describen en la **Tabla 8** a continuación.

10 **Tabla 8: Administración células autólogas derivadas de tejido adiposo para el tratamiento del dolor neuropático**

	Afección previa al tratamiento	Afección posterior al tratamiento
Paciente 1	Dolor neurálgico agudo constante durante todo el día, dolor en dientes y mejillas, intensidad del dolor 8.	Al mes después del tratamiento: dos o tres episodios de dolor cada día (2-3 horas cada uno), dolor en los dientes solamente, intensidad del dolor 6-7.
Paciente 2	Dolor en el brazo, hombro, mandíbula, dientes, intensidad del dolor 9.	Dos meses después del tratamiento: sensibilidad leve solamente en dientes, intensidad del dolor 0-1.
Paciente 3	Dolor en dientes, mandíbula y encías, intensidad del dolor 8, se necesita Neurontin 1200 mg y Endep 50 m.	A las 3 semanas después del tratamiento: Neurontin se ha reducido a 100 mg y dolor solo en dientes y encías, intensidad del dolor 4.
Paciente 4	Intensidad del dolor facial 8-9, solo 2 horas de sueño por la noche y se despierta por dolor agudo.	Un mes después del tratamiento: intensidad del dolor facial 2, pero episodio de mayor intensidad del dolor debido al clima frío, duerme 6 horas.

Ejemplo 13. Tratamiento del dolor con la aplicación tópica de secreciones de células derivadas de tejido adiposo bovino.

15

Se recogió una muestra de 10 g de tejido adiposo por escisión de la base de la cola de un novillo de 1 año. El tejido adiposo se aclaró con una solución salina y después se troceó de forma gruesa con tijeras en trozos de aproximadamente 5 mm de diámetro y se mezcló con 20 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma). Se añadió colagenasa (Sigma) para producir una concentración final del 0,2% p/v y la muestra se incubó a 37°C durante 30 minutos. Al final de los 30 minutos, el tejido adiposo se digirió parcialmente y consistió en una mezcla de partículas de grasa parcialmente digeridas, células vasculares estromales liberadas (SVC) y adipocitos liberados.

20

Después, la muestra se lavó para eliminar la colagenasa mediante centrifugación a 500 g durante 15 minutos. Se pudieron ver cuatro capas distintas dentro de la muestra centrifugada: una pequeña capa (2 mm de espesor) de lípido libre en la superficie, debajo de la cual había una capa blanca de 20 mm de espesor de tejido adiposo y adipocitos, y después una gran capa transparente de DMEM/colagenasa y después un sedimento de células no adipocitarias derivadas de tejido adiposo. La pequeña capa de lípido se eliminó cuidadosamente con una pipeta pasteur. Después se insertó cuidadosamente una pipeta pasteur nueva a través de los adipocitos y se eliminó el DMEM transparente sin alterar el tejido adiposo flotante, los adipocitos o las células sedimentadas. Esto dio como resultado una muestra que contenía solamente las piezas flotantes de tejido adiposo y los adipocitos suspendidos en un pequeño volumen de DMEM y las células sedimentadas. Los trozos de tejido adiposo y los adipocitos y las células sedimentadas se mezclaron suavemente con una pipeta pasteur y se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 ml.

35

Los trozos de tejido adiposo y las células se lavaron entonces en DMEM para eliminar la colagenasa de la siguiente manera. Se añadió DMEM a un volumen final de 14 ml y la muestra se centrifugó a 500 g durante 10 minutos. Esto dio lugar a tres capas distintas: trozos flotantes de tejido adiposo y adipocitos, DMEM y células no adipocitarias derivadas de tejido adiposo sedimentadas. El DMEM se eliminó cuidadosamente insertando una pipeta pasteur a través de los adipocitos teniendo cuidado de no alterar los trozos de tejido adiposo, los adipocitos o las células sedimentadas.

40

Cultivo de tejido

45 Las células flotantes y las células sedimentadas se resuspendieron suavemente en 10 ml de DMEM y se transfirieron a un matraz de cultivo tisular de 300 ml. Se añadieron un volumen de 30 ml de DMEM y 10 ml de suero fetal de tercera estéril y después el matraz se incubó a 37°C con el 5% de CO₂. El matraz se examinó a diario por

microscopía. Las células se unieron y su aspecto similar a los fibroblastos se produjo entre los días 3 y 6.

Recolección de secreciones celulares libres de células

- 5 Después de 6 días, el sobrenadante se recogió y el tejido adiposo suspendido y las células se eliminaron por filtración a través de una malla de 20 micrómetros. La solución se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,22 micrómetros y después se dispensó asépticamente en viales de 10 ml y se almacenó congelada a -20°C.

Preparación de crema que contiene secreciones bovinas y una crema placebo

- 10 Se descongeló un vial de las secreciones bovinas y se mezcló con una cantidad igual de BP en crema de base acuosa y se dispensó en tubos de plástico y se almacenó a 4°C hasta su uso.

- Se preparó un segundo lote de crema que no contenía secreciones bovinas como control de placebo. Se mezcló
15 DMEM con una cantidad igual de BP de crema de base acuosa y se dispensó en tubos de plástico.

Tratamiento del dolor por quemadura

- A un hombre de 46 años de edad que accidentalmente se había quemado ligeramente el pulgar y el dedo corazón
20 se le administró un tubo de cada crema. Los tubos se etiquetaron como Crema 1 y Crema 2 y el hombre no sabía qué crema contenía las secreciones o cuál era el placebo. El hombre aplicó la Crema 1 en el dedo corazón y la Crema 2 en el pulgar aproximadamente 30 minutos después de que ocurrieron las quemaduras. El hombre informó que después de 10 minutos ya no había dolor en su pulgar. El dolor en el pulgar no volvió. El dolor en el dedo corazón continuó durante aproximadamente 6 horas. Se formó una ampolla en el dedo corazón, pero no se produjo
25 ninguna ampolla en el pulgar.

La Crema 1 era el placebo y se aplicó al dedo corazón. La Crema 2 contenía las secreciones bovinas y se aplicó al pulgar.

- 30 **Ejemplo 14. Administración intramuscular de secreciones de células humanas derivadas de tejido adiposo a ratones con artritis inducida por anticuerpos de colágeno**

Preparación del tejido adiposo

- 35 Se usó liposucción para extraer aproximadamente 200 gramos de tejido adiposo de un paciente. El lipoaspirado se digirió añadiendo colagenasa estéril a una concentración final del 0,05% p/v. La muestra se incubó a 37°C durante 30 minutos, se filtró a través de una malla de 800 micrómetros y se transfirió a tubos de centrifuga. Los tubos se centrifugaron a 1500 g durante 5 minutos, para obtener las células sedimentadas (fracción vascular estromal; SVF) y adipocitos flotantes. Se pudieron ver cuatro capas distintas dentro de la muestra centrifugada: una pequeña capa de
40 lípido libre en la superficie, debajo de la cual había una capa espesa de tejido adiposo y adipocitos, y después una gran capa transparente de solución salina y un sedimento de células no adipocitarias derivadas de tejido adiposo (SVF). La capa lipídica se aspiró y se descartó. Las fracciones de adipocitos y SVF se recogieron por separado después de la centrifugación. Las fracciones se lavaron por separado con una solución salina y se centrifugaron a 1500 x g durante 5 minutos. El sedimento SVF se resuspendió suavemente en 10 ml de medio de cultivo celular que
45 consistía en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con un suero bovino fetal al 10% y una solución al 1% de penicilina-estreptomina.

- Una porción de 300 µl del sedimento SVF se filtró a través de un tubo cubierto con malla de nylon de 35 µm. Se enumeró una porción de 200 µl de la muestra filtrada y se determinó la viabilidad en tubos TruCount que contenían
50 isoflujo, yoduro de propidio (10 µg/ml) y Syto11 (1 µM) utilizando un citómetro de flujo FACS Scan. Se determinó el número total de células nucleadas viables en el sedimento SVF.

Cultivo de tejidos y recolección de secreciones

- 55 Se sembró un matraz de cultivo T175 cm² con aproximadamente 29 millones de células SVF viables y 30 ml de adipocitos. También se añadió al matraz un volumen de 50 ml de medio de cultivo celular, como se describe anteriormente. El matraz se incubó a 37°C con el 5% de CO₂ durante 72 horas.

Después de la incubación durante 72 horas, el medio acondicionado se recogió del matraz. Esta muestra de medio

acondicionado se centrifugó a 4980 g durante 10 minutos y se almacenó a -80°C . Este medio acondicionado se descongeló, se esterilizó por filtración utilizando un filtro de jeringa de $0,22\ \mu\text{m}$, se dividió en alícuotas y se congeló a -80°C . Un control de vehículo, que contenía DMEM complementado con una solución al 1% de penicilina-estreptomicina, también se esterilizó por filtración utilizando un filtro de jeringa de $0,22\ \mu\text{m}$, se dividió en alícuotas y se congeló a -80°C . Estas muestras en alícuotas recibieron nombres codificados y se enviaron en hielo seco a TetraQ, donde se administraron a ratones que padecían CAIA.

Modelo de ratón de artritis inducida por anticuerpos de colágeno

10 El modelo de artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) es un modelo animal de artritis ampliamente aceptado, que se ha informado en la bibliografía para investigar los mecanismos patógenos implicados en la artritis y para detectar posibles candidatos terapéuticos. El modelo se dirige al colágeno tipo I, uno de los principales constituyentes del cartílago articular. En ratones, la CAIA se induce mediante la administración de un cóctel de 5 anticuerpos de colágeno de tipo II seguidos de una inyección de lipopolisacárido (LPS) tres días después. La administración posterior de LPS después del cóctel de anticuerpos no solo aumenta la gravedad de la artritis a través de la inducción de citocinas proinflamatorias y la activación del componente del complemento, sino que también reduce la cantidad de anticuerpos monoclonales necesarios para inducir la artritis en este modelo. La artritis que se desarrolla en estos ratones se parece mucho a la artritis reumatoide en las personas, incluida la sinovitis con infiltración de células polimorfonucleares y mononucleares, formación de pannus, degradación del cartílago de la fibrosis y erosión ósea. Se observa una hinchazón y un enrojecimiento significativos en las patas de ratones que padecen CAIA. Las manifestaciones clínicas de enrojecimiento e hinchazón de la pata pueden evaluarse para asignar una puntuación de artritis clínica a los ratones en el modelo de CAIA. Pueden usarse las mediciones del resultado del volumen de la pata, el tamaño del tobillo y la puntuación de la artritis clínica para determinar la eficacia de un tratamiento para reducir la gravedad de la artritis en este modelo de CAIA.

25 En el día cero, cada ratón (un total de 12) recibió una inyección intravenosa de $1,5\ \text{mg}$ ($150\ \mu\text{l}$) de un cóctel de 5 anticuerpos del clon anti-colágeno tipo II. Este cóctel contiene 5 anticuerpos monoclonales: Clon A2-10 (IgG2a), F10-21 (IgG2a), D8-6 (IgG2a), D1-2G (IgG2b), y D2-112 (IgG2b) que reconocen los epítomos conservados en diversas especies de colágeno tipo II. El día 3, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de $80\ \mu\text{l}$ ($40\ \mu\text{g}/\text{ratón}$) de LPS. El diseño del ensayo consistió en 2 grupos de 6 ratones. Los ratones recibieron $50\ \mu\text{l}$ de dosis administradas por vía intramuscular (IM) los días 6, 8, 10 y 12 de los siguientes: el grupo 1 recibió secreciones humanas de SVF+adipocitos y el grupo 2 recibió el vehículo de control.

35 Los ratones se monitorizaron durante todo el periodo de prueba (2 semanas) y las mediciones de resultado principales del volumen de la pata, el tamaño del tobillo y la puntuación de la artritis clínica se tomaron los días 0 y 2-13. Las mediciones se tomaron antes de la administración del cóctel de anticuerpos de colágeno (días 0) y LPS (día 3) y antes de la administración del vehículo y las secreciones de SVF+adipocitos humanas. El volumen de la pata se midió utilizando un pletismómetro. El tamaño de la pata se midió usando microcalibres a través del montículo (articulación del tobillo) de cada pata trasera. Los ratones se evaluaron y se puntuaron para determinar la gravedad de la artritis usando una escala estándar (0 - normal; 1 - enrojecimiento leve, leve hinchazón de tobillo o muñeca, enrojecimiento e hinchazón limitados a articulaciones individuales; 2 - hinchazón moderada de tobillo o muñeca, enrojecimiento en más de una articulación, 3 - hinchazón grave que incluye algunos dedos, tobillo o pie; 4 - hinchazón máxima e inflamación, que implica múltiples articulaciones).

45 Análisis de datos

La desviación promedio y estándar (DE) de cada una de las mediciones de resultado principales, volumen de la pata (cm^3), tamaño del tobillo (mm) y puntuación de artritis clínica se calcularon para cada punto de tiempo posterior al tratamiento para ambos grupos de ratones. Se realizó una prueba t de dos colas en las mediciones de resultado primarias en cada punto de tiempo posterior al tratamiento para comparar el efecto de las secreciones de SVF+adipocitos frente al vehículo de control. El criterio de significancia estadística fue $p < 0,05$.

Resultados

55 Los resultados del volumen de la pata para ambos grupos se presentan en la **Figura 3**. Un análisis de los datos en el día 11 reveló una reducción significativa (valor $p = 0,002$) en el volumen de la pata de ratones tratados con secreciones de SVF+adipocitos en comparación con los ratones de vehículo de control.

Las mediciones del tamaño del tobillo para ambos grupos se presentan en la **Figura 4**. Un análisis de los datos en el

día 11 reveló una reducción significativa (valor $p = 0,018$) en el tamaño del tobillo de ratones tratados con secreciones de SVF+ adipocitos en comparación con los ratones de vehículo de control.

Las puntuaciones de artritis clínica para ambos grupos de tratamiento se presentan en la **Figura 5**. Un análisis de los datos en el día 11 reveló una reducción significativa (valor $p = 0,017$) en la puntuación de artritis clínica de ratones tratados IM con secreciones de SVF+adipocitos en comparación con los ratones de vehículo de control.

Los datos muestran claramente que la administración de secreciones por inyección intramuscular tiene un efecto terapéutico en el modelo de ratón de CAIA. El sitio de inyección está alejado del sitio de la enfermedad.

Ejemplo 15. Administración intravenosa de células derivadas de tejido adiposo crioprotectores estándar frente a células crioprotectores con secreciones concentradas en ratones con artritis inducida por anticuerpos de colágeno

15 *Preparación del tejido adiposo*

El tejido adiposo canino se procesó como se describe en el Ejemplo 1 para producir células adherentes caninas. Además, las secreciones caninas que se concentraron 10 veces, utilizando un tubo de filtro de centrifuga Amicon de 3 kDa, a partir de células derivadas de tejido adiposo, se produjeron como se describe en el Ejemplo 1. A partir de estas células y secreciones, los siguientes productos de ensayo se prepararon en crioviales y se crioprotectores en un dispositivo de congelación lenta de Mr Frosty (Invitrogen) en un congelador a -80°C durante 24 horas y después se transfirieron a un contenedor dewar de nitrógeno líquido:

1. 70.000 células crioprotectores en suero canino al 90% y DMSO al 10%
2. 70.000 células crioprotectores en secreciones caninas al 45% (concentrado 10x), suero canino al 45% y DMSO al 10%.

Modelo de ratón de artritis inducida por anticuerpos de colágeno

El modelo de ratón de artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) descrito en el Ejemplo 14 también se usó para investigar los efectos de la administración de los productos de ensayo descritos anteriormente. Se indujo un total de 12 ratones con CAIA como se describe en el Ejemplo 14. El día 6 después de la inducción de CAIA, los productos de ensayo crioprotectores descritos anteriormente se descongelaron a temperatura ambiente inmediatamente antes de la inyección. 6 ratones se inyectaron cada uno por vía intravenosa con 140 μl de células (lo que equivalía a 70.000 células) que se habían crioprotectores en crioprotectores estándar, y los 6 ratones restantes se inyectaron cada uno por vía intravenosa con 140 μl de células (lo que equivalía a 70.000 células) que se habían crioprotectores en una mezcla de crioprotectores que incluía secreciones concentradas.

Los ratones se monitorizaron diariamente a lo largo del ensayo y las mediciones de resultado principales del volumen de la pata, el tamaño del tobillo y la puntuación de la artritis clínica se tomaron los días 0 y 2-12 como se describe en el Ejemplo 14.

Análisis de datos

La desviación promedio y estándar (DE) de cada una de las mediciones de resultado principales, volumen de la pata (cm^3), tamaño del tobillo (mm) y puntuación de artritis clínica se calcularon para cada punto de tiempo posterior al tratamiento para ambos grupos de ratones y se representaron en gráficos. El volumen de la pata Δ , el tamaño del tobillo y la puntuación de la artritis clínica se calcularon restando la puntuación de inducción pre-CAIA de las puntuaciones de inducción post-CAIA y expresando esto como un cambio porcentual. Se determinó el área bajo las curvas del volumen de la pata Δ , el tamaño del tobillo y la artritis clínica para cada grupo. Se usó una prueba t de dos colas para comparar los valores del área bajo la curva (AUC) del volumen de la pata Δ , el tamaño del tobillo y la artritis clínica de ambos grupos.

Resultados

Los resultados del volumen de la pata para ambos grupos de tratamiento se presentan en la **Figura 6**. Un análisis del área bajo la curva de estos datos reveló una reducción significativa en el volumen de la pata de ratones tratados con células y secreciones concentradas en comparación con las células en solitario (**Figura 7**).

Las mediciones del tamaño del tobillo para ambos grupos de tratamiento se presentan en la **Figura 8**. Se observó una reducción significativa en el tamaño del tobillo de los ratones tratados con células y secreciones concentradas cuando se comparó con los ratones que recibieron células en solitario (**Figura 9**)

5 Las puntuaciones de artritis clínica para ambos grupos de tratamiento se presentan en la **Figura 10**. Se observó una reducción significativa en la puntuación de artritis clínica en los ratones tratados con células y secreciones en comparación con los ratones que recibieron células en solitario (**Figura 11**).

Los datos muestran un efecto terapéutico aumentado al combinar las células con las secreciones antes de congelarlas. Los datos muestran claramente que un producto congelado que combina células y secreciones tiene un efecto terapéutico en el modelo de ratón de CAIA. Cuando se administraron células en solitario no hubo efecto terapéutico. Esto se debe a que las células se dañaron durante el proceso de congelación y las células dañadas no secretan las citocinas necesarias para causar el efecto terapéutico. Al congelar las células con secreciones, las células pueden sobrevivir al proceso de congelación y ser completamente funcionales y capaces de secretar las citocinas necesarias para causar el efecto terapéutico.

10
15

Ejemplo 16. Tratamiento del dolor en perros por administración subcutánea de células derivadas de tejido adiposo.

20 Las células congeladas se prepararon de acuerdo con el Ejemplo 10. La suspensión celular se descongeló y se administró por vía subcutánea en el cogote del perro que padecía dolor del nervio ciático. Una semana después del tratamiento, el perro no mostró signos de dolor.

A un segundo perro que padecía una enfermedad de disco intervertebral y se le administró una inyección subcutánea de células en el cogote. Una semana después del tratamiento, el perro no mostró signos de dolor.

25

REIVINDICACIONES

1. Una composición congelada que comprende células de la progenie de cultivo de células sometidas a múltiples pases de una suspensión de células derivadas de tejido adiposo y secreciones de células derivadas de tejido adiposo, en la que dichas secreciones comprenden medios clarificados y/o concentrados de cultivo de células derivadas de tejido adiposo que han surgido como células de la progenie o una línea celular de cultivo anterior para su uso en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en un trastorno inflamatorio, una lesión de ligamentos y una lesión de tendón, o alivio del dolor asociado con un trastorno inflamatorio, una lesión de ligamentos o una lesión de tendón, en un sujeto mamífero, en el que la composición se administra a un sujeto después de descongelar la composición.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el trastorno o afección inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en osteoartritis, enfermedad de la babilla, malformaciones cervicales, una lesión de tendón, una lesión de ligamento, dermatitis atópica, artritis reumatoide, dolor de espalda y esclerosis múltiple.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que las células sometidas a múltiples pases son células adherentes.
4. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que las células sometidas a múltiples pases son células madre mesenquimales.
5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dichas células sometidas a múltiples pases son (i) de una línea celular que se ha sometido a pases más de cinco veces, o (ii) de una línea celular que se ha sometido a pases más de diez veces.
6. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dichas células sometidas a múltiples pases son de una línea celular que se ha congelado varias veces.
7. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que las secreciones de células derivadas de tejido adiposo comprenden medios clarificados procedentes del cultivo de células derivadas de tejido adiposo que han surgido como células de la progenie o una línea celular de cultivos anteriores.
8. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que las secreciones de células derivadas de tejido adiposo comprenden una preparación concentrada de medios procedentes del cultivo de células derivadas de tejido adiposo que han surgido como células de la progenie o una línea celular de cultivos anteriores.
9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que las secreciones de células derivadas de tejido adiposo es una preparación concentrada entre 2 y 20 veces.
10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que las secreciones de células derivadas de tejido adiposo es una preparación concentrada 10 veces.
11. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el sujeto es un ser humano.

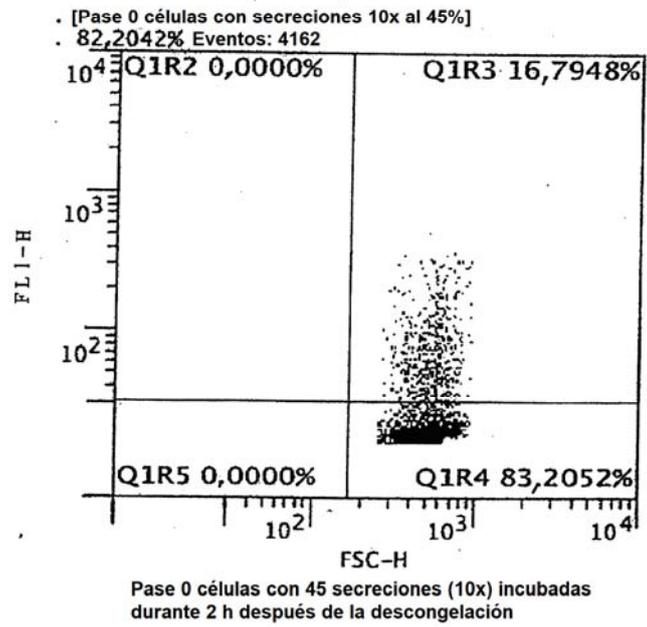
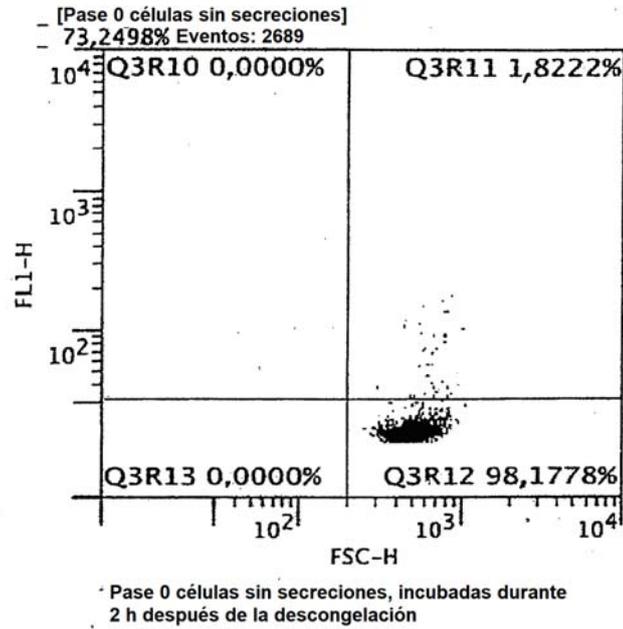


Figura 1

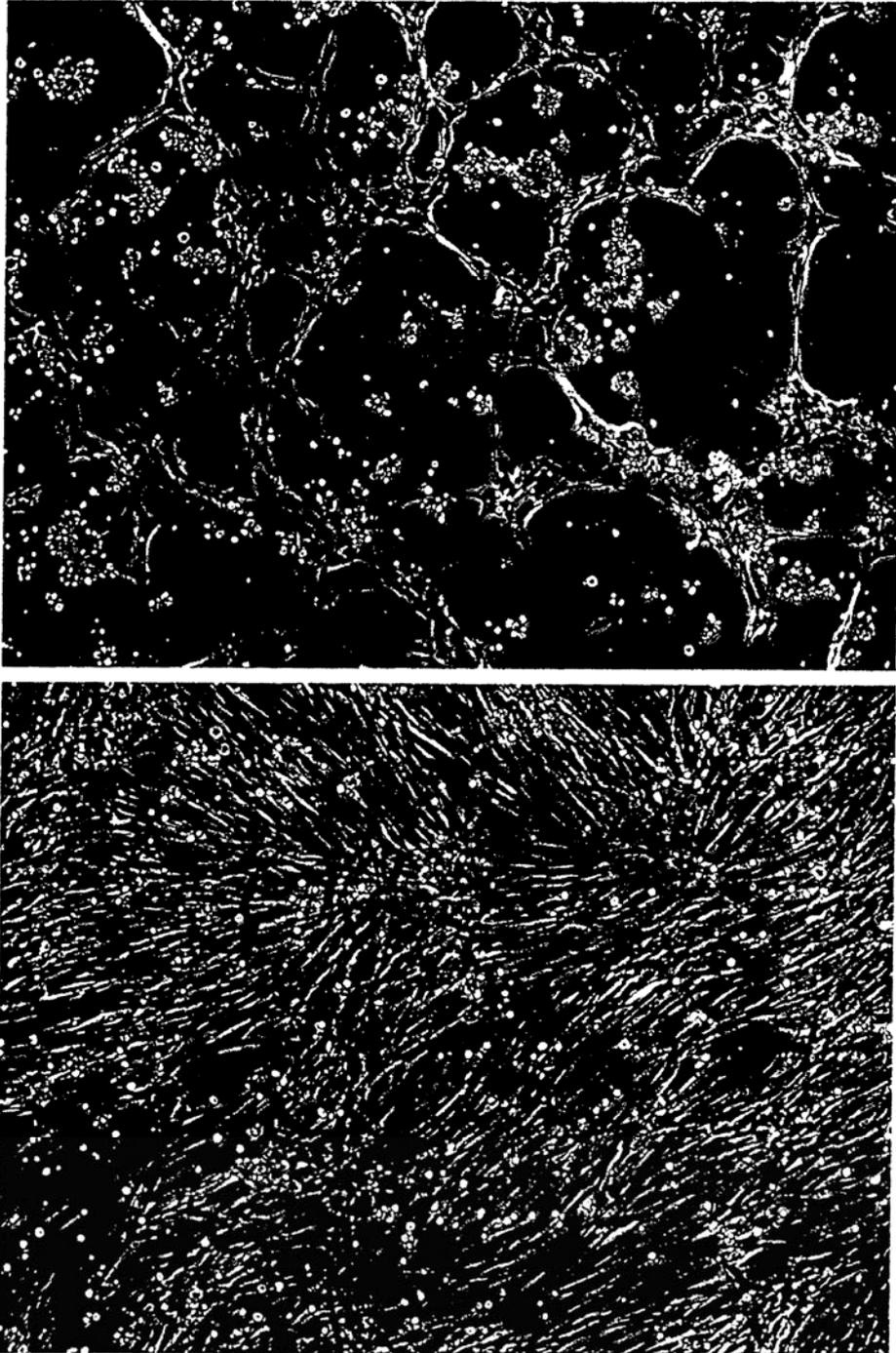


Figura 2

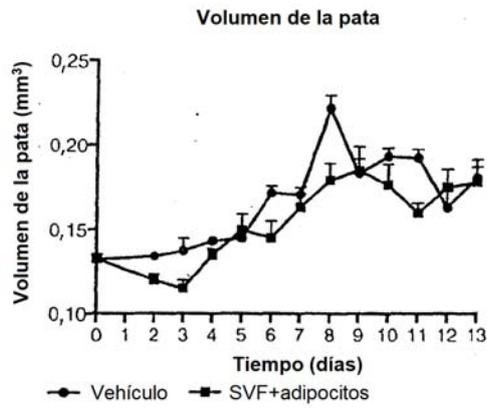


Figura 3

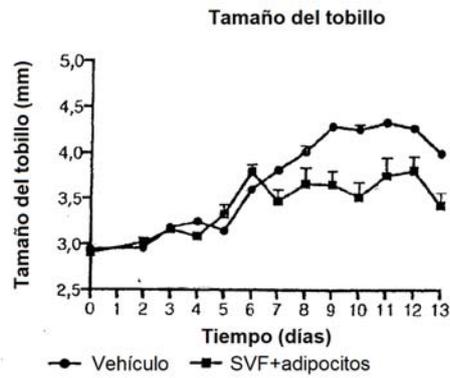


Figura 4

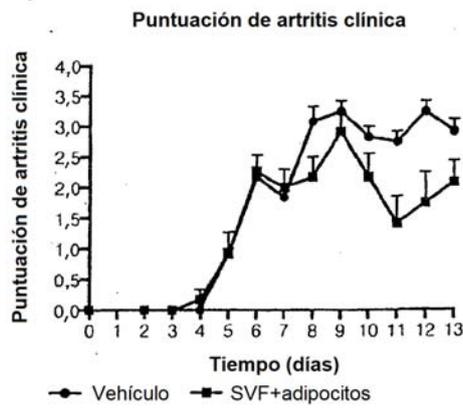


Figura 5

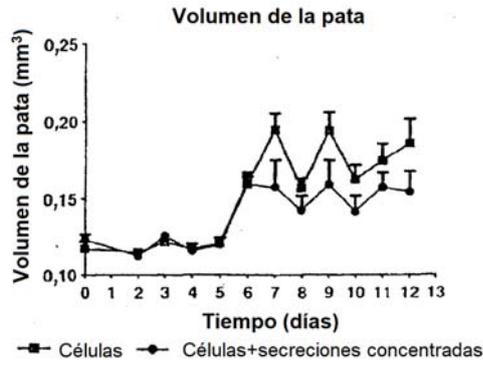


Figura 6

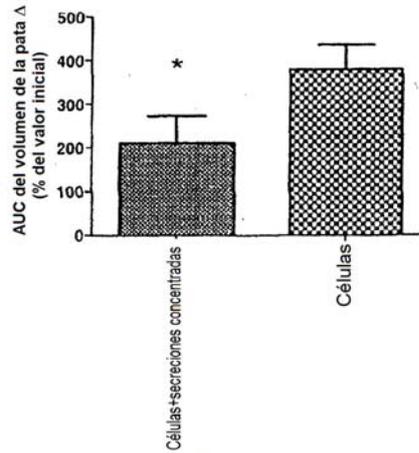


Figura 7

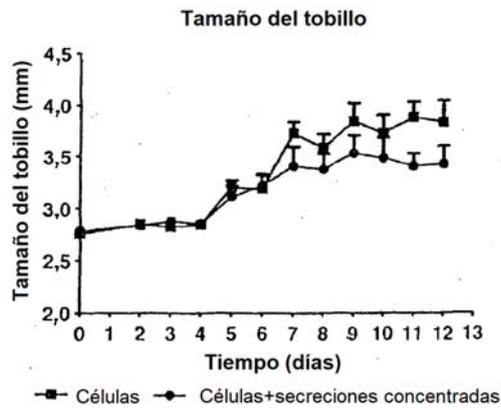


Figura 8

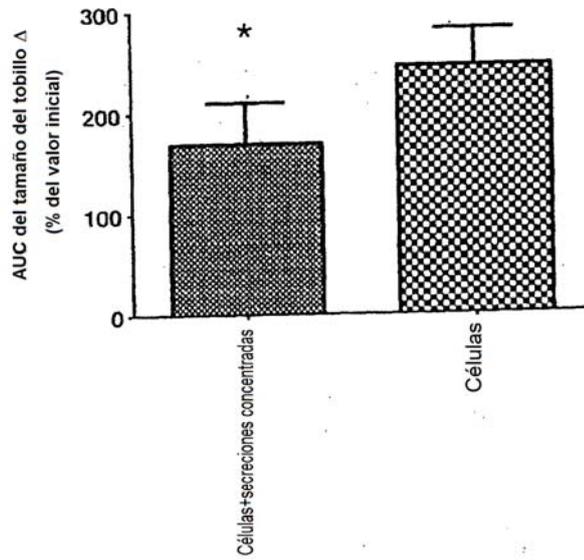


Figura 9

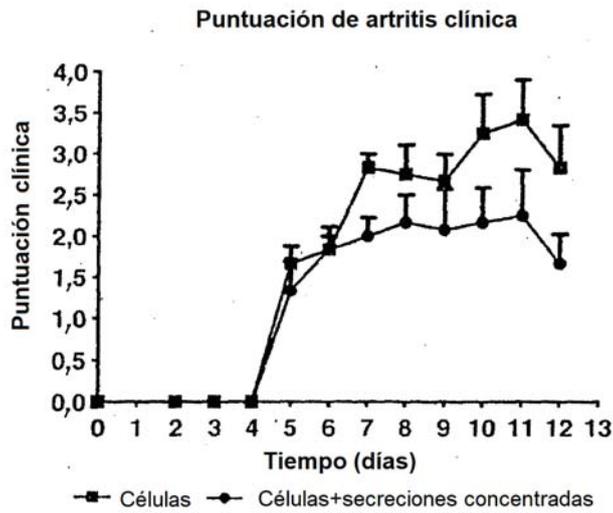


Figura 10

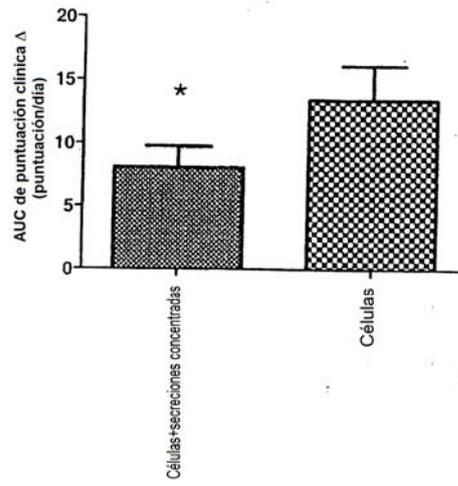


Figura 11