

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 009 758**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0786 (2010.01)
A61K 35/15 (2015.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2019 E 19382247 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2024 EP 3719119**

54 Título: **Factores de crecimiento específicos de tejido, método de producción y usos de los mismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.03.2025

73 Titular/es:

PEACHES S.L. (100.00%)
Calle Isabel Colbrand nº 6, 4º izda
28050 Madrid, ES

72 Inventor/es:

LAPUENTE FERNÁNDEZ, JUAN PEDRO;
DE GREGORIO SANTOS, JUAN CARLOS;
DESPORTES BIELSA, PAULA;
FERNÁNDEZ VICENTE, PABLO;
CAYUELA CALVO, MARÍA;
BLÁZQUEZ MARTINEZ, ALEJANDRO;
DOS ANJOS VILABOA, SEVERIANO;
CAYUELA CALVO, MARIA;
IGLESIAS MORENO, CARMEN;
GOMEZ CEPA, GONZALO;
LAPUENTE FERNÁNDEZ, JUAN PEDRO;
DESORTE BIELSA, PAULA;
FERNÁNDEZ VICENTE, PABLO y
SANZ MORENO, JARA

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 3 009 758 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

Factores de crecimiento específicos de tejido, método de producción y usos de los mismos

5 Campo de la invención

La invención pertenece al campo de medicina humana o animal, en particular a la regeneración de tejidos. Se refiere a un método para obtener el cocultivo de células específicas de tejido y monocitos purificados. La invención también se refiere a la composición obtenida por este método y sus aplicaciones terapéuticas.

10

Antecedentes de la invención

Los factores de crecimiento (GF) desempeñan un papel importante en la promoción de la diferenciación celular y división celular. Son sustancias activas para estimular el crecimiento de células y tejidos y pueden ser producidas por muchos tipos diferentes de tejidos. Los ejemplos de estas sustancias incluyen factores de crecimiento similares a insulina (somatomedinas), que estimulan el crecimiento al mediar la secreción de hormona de crecimiento desde la glándula pituitaria; factor de crecimiento epidérmico, que estimula el crecimiento de células epiteliales; factor de crecimiento derivado de plaquetas, que estimula el crecimiento de células de músculo y células del tejido conectivo; y factor de crecimiento nervioso, que estimula el crecimiento de células neuronales.

20

Los GF se pueden originar a partir de plaquetas, plasma, la matriz ósea, osteocitos y osteoblastos, fibroblastos y de la médula ósea. Se ha demostrado que los GF de muestras de sangre tienen importantes propiedades biológicas, tal como regeneración de tejidos y disminución de enfermedades (Civinini A et al., 2010. Clin Cases Miner Bone Metab 7(3):194).

25

Los GP procedentes de muestras de sangre se usan en general en forma de plasma rico en plaquetas (PRP), es decir, de la porción de plasma que, después de la centrifugación, es rica en plaquetas. El PRP comprende factores de crecimiento y citocinas tal como factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento transformante beta, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento similar a insulina 1, factor de crecimiento similar a insulina 2, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento epidérmico, interleucina 8, factor de crecimiento de queratinocitos y factor de crecimiento del tejido conectivo. La eficacia de los factores de crecimiento en la cicatrización de lesiones y las concentraciones de los GP que se encuentran dentro del PRP son la base teórica para el uso del PRP en la reparación de tejidos. Las plaquetas recolectadas en el PRP se activan mediante la adición de trombina y cloruro de calcio.

35

Durante muchos años, el PRP que comprende factores de crecimiento y citocinas se ha usado en el tratamiento de lesiones deportivas. Esto ha llevado a diferentes conclusiones con respecto a eficacia y eficiencia en el tratamiento de lesiones en diferentes tejidos, ya que los resultados han mostrado una alta variabilidad, en general asociada con la edad del paciente. Se ha descrito que la concentración de factores de crecimiento en el PRP disminuye significativamente en sujetos mayores de 25 años en población sana, especialmente en hombres, (Evanson JR et al, 2014. Mil Med 179(7): 799). Además, cualquier enfermedad de un sujeto puede alterar adicionalmente la concentración de los GF en el PRP, clave en el proceso de regeneración-recuperación de una lesión deportiva en tejido blando u osteocartilaginoso.

40

Funayama investigó si la síntesis del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) fue inducida por la interacción directa célula a célula entre monocitos humanos y células endoteliales de la vena umbilical (EC), concluyendo que la interacción entre estas células induce la síntesis de PDGF, lo que sugiere un papel importante en la patogénesis de la aterosclerosis (Funayama H et al., 1998. Cardiovascular Research 37; 216-24).

45

Zhu estudió el efecto de monocitos y macrófagos en la patogénesis de artritis reumatoide, activando fibroblastos a través de la expresión de CD147 en monocitos CD14+. Los autores estudiaron el papel de CD147 en la producción de metaloproteasas e invasión celular a través del co-cultivo de monocitos humanos y fibroblastos humanos.

50

Todos los productos médicos en la técnica anterior que comprenden GF y se dirigen a la regeneración de tejidos son autólogos, es decir, el mismo individuo es el donante de células y el receptor. Una de las características más relevantes de estas composiciones es que se deben aplicar en el paciente inmediatamente después de su preparación, para evitar perder las propiedades biológicas de los GF. Durante el almacenamiento de estos productos médicos se producen cambios en las propiedades de los GF, tal como disminución del pH, aumento del nivel de potasio en plasma y cambios en su metabolismo, que afectan al efecto biológico de los GF (Martínez MC et al. Transfusion medical applications and practice. 2012. Primera edición. Cortes A. Vol I, capítulo 4, p. 71).

60

Además, dado que los compuestos sanguíneos no pueden sobrevivir a temperatura ambiente durante prolongados períodos de tiempo, se recomienda aplicar inmediatamente las composiciones que comprenden los mismos. El período recomendado entre la extracción de sangre del paciente y la administración del PRP no debe ser superior a 45 minutos (Moreno Ret al., 2015. Farm Hosp 39(3):130). Se debe usar un sobrenadante de plasma dentro de las ocho horas posteriores a su preparación para evitar la degradación o desnaturalización de los factores de

65

crecimiento y también evitar la contaminación bacteriana. Todo el proceso se realiza en condiciones estériles y asépticas, ya que la composición que comprende el PRP se introducirá en el cuerpo del sujeto.

Con el fin de administrar los GF a un paciente, las aplicaciones médicas recientes de factores de crecimiento sanguíneo autólogos requieren infiltración o administración continua del producto con un corto intervalo entre dosis, para que el producto pueda ser efectivo. Para estas aplicaciones, la preparación de la composición que comprende compuestos sanguíneos autólogos requiere la extracción continua de sangre del paciente, ya que las composiciones frescas se deben preparar cada vez que se necesita la composición. Esto afecta negativamente a la calidad de vida del paciente y hace que este procedimiento no sea adecuado en tratamientos a largo plazo para condiciones crónicas o degenerativas. Por lo tanto, sería una ventaja tener una composición que comprenda GF capaz de almacenarse mientras sus componentes permanecen estables y biológicamente activos a lo largo del tiempo. Esto permitiría el almacenamiento del producto, sin tener que aplicarlo al paciente de inmediato.

En el campo deportivo, el paciente lesionado requiere la administración de una composición reparadora de tejidos lo antes posible, preferiblemente inmediatamente después de haber padecido la lesión, para que la recuperación del paciente pueda comenzar lo antes posible. Esto es especialmente importante en atletas de alto nivel. Una composición almacenada permitiría tratar una lesión inmediatamente después de que se haya producido, lo que beneficiaría el pronóstico de recuperación y la calidad de vida del paciente, ya que no se necesitarían adicionales extracciones de sangre.

Debido a la necesidad obligatoria de la administración frecuente a un paciente de composiciones de PRP autólogas, existen múltiples patologías crónicas o degenerativas que se podrían tratar potencialmente con estas composiciones, pero no se han tratado debido a los requisitos continuos del paciente, lo que afecta negativamente a su calidad de vida. Los ejemplos de estas enfermedades son patologías oculares, patologías del sistema nervioso central, patologías articulares degenerativas, patologías reumáticas, patologías endocrinas, lesiones deportivas y cualquier otra enfermedad o patología que requiera la administración repetida de una composición derivada de sangre que contenga GF.

Además, las composiciones de PRP derivadas de plaquetas muestran un inconveniente adicional: los factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas obtenidas de estas células muestran una variabilidad muy alta, tanto cuantitativa como cualitativa, lo que dificulta la obtención de lotes reproducibles de composición. La concentración variable de los GF puede dar como resultado diferentes efectos biológicos. Por lo tanto, los niveles de GF en cada composición se deben analizar para una interpretación confiable de las funciones biológicas y aplicación estandarizada de PRP (Soon *et al.*, 2011. Korean J Lab Med 31: 212). De hecho, se ha demostrado que otros factores tal como el envejecimiento, dieta, estilo de vida, estrés, enfermedades, etc. afectan negativamente al contenido de los mismos (Bai MY *et al.*, 2018. Scientific Reports 8:10642).

Otro aspecto interesante a considerar en la regeneración o reparación de un tejido mediante el uso de composiciones que comprenden factores de crecimiento, es su pleiotropismo. Aunque es posible asignar a cada tipo de GF una propiedad principal, su efecto sobre cada tejido está condicionado por la presencia de otros componentes en la composición, tal como otros factores de crecimiento o citocinas, que pueden producir un efecto opuesto al efecto deseado para un factor de crecimiento específico. El pleiotropismo se debe a que las respuestas celulares a las diferentes citocinas y factores de crecimiento se activan cuando estos compuestos activan sus receptores en las células objetivo. Cada citocina o cada factor es habitualmente reconocido por solo 1 o 2 tipos diferentes de receptores y la interacción es altamente específica, aunque puede ser modulada por diferentes coadyuvantes o antagonistas de otras citocinas y/o factores.

Por lo tanto, existe la necesidad de una composición derivada de sangre adecuada para ser usada en la regeneración de tejidos que comprende factores de crecimiento y/o citocinas, esta composición se puede almacenar durante largos períodos de tiempo, mientras que los factores de crecimiento y/o las citocinas mantienen su función y actividad biológica. La composición debe ser adecuada para la administración alogénica y ser eficiente en la regeneración de tejidos.

La presente invención proporciona una solución para este problema que divulga un proceso para obtener una composición que comprende factores de crecimiento y/o citocinas, la composición obtenida por dicho método se puede almacenar y ser biológicamente activa durante al menos un año. Esta composición se puede aplicar inmediatamente después de su obtención en cualquier otro momento a un sujeto necesario de la misma.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

La presente invención se describe en el conjunto adjunto de reivindicaciones.

En un primer aspecto, se divulga un método para obtener una composición que comprende los siguientes pasos:

- a) purificación de monocitos a partir de una muestra en condiciones estériles;
- b) cultivo de los monocitos purificados en medio libre de suero con células específicas de tejido;
- c) recolección del sobrenadante que comprende factores de crecimiento y/o citocinas producidas por el cultivo del paso b); y
- d) crioconservación del sobrenadante recolectado en el paso c) a una temperatura entre -35 y -165°C.

en donde las células específicas de tejido se seleccionan del grupo que consiste en miocitos, células del músculo esquelético, células satélite del músculo, tenocitos, células de Schwann, condrocitos, sinoviocitos, linfocitos, células del folículo piloso, células de miocardio, células madre mesenquimales o combinaciones de las mismas;

En una realización, el método comprende adicionalmente el paso e) de reconstitución de los factores de crecimiento crioconservados al mantener la composición entre 25 y 30°C entre 10 y 60 minutos.

En otra realización, la invención divulga la composición para la regeneración de tejidos obtenida mediante el método divulgado anteriormente.

En otra realización, la invención divulga una composición farmacéutica que comprende la composición obtenida mediante el método de la invención.

En otra realización, la invención divulga una composición que se puede obtener mediante un método que consiste en los siguientes pasos:

- a) purificación de monocitos a partir de una muestra;
- b) cultivo de los monocitos purificados en medio libre de suero con células específicas de tejido seleccionadas del grupo que consiste en condrocitos humanos, sinoviocitos humanos, células de Schwann humanas, células del músculo esquelético humano, células satélite del músculo humano, fibroblastos dérmicos humanos, tenocitos humanos, células madre mesenquimales humanas; y
- c) recolección del sobrenadante que comprende factores de crecimiento y/o citocinas producidas en el cultivo del paso b);

para usarse en un método de tratamiento de una enfermedad musculoesquelética seleccionada de tendinosis, rotura fibrilar del músculo, tendinitis, bursitis, sinovitis, artrosis, rotura de cartílago o condropatías en donde la composición se administra en un tejido que comprende células del mismo tipo que las células específicas de tejido del paso b).

En otra realización, la invención divulga una composición que se puede obtener mediante un método que comprende los siguientes pasos:

- a) purificación de monocitos a partir de una muestra en condiciones estériles;
- b) cultivo de los monocitos purificados en medio libre de suero con células específicas de tejido seleccionadas del grupo que consiste en condrocitos humanos, sinoviocitos humanos, células de Schwann humanas, células del músculo esquelético humano, células satélite del músculo humano, fibroblastos dérmicos humanos, tenocitos humanos, células madre mesenquimales humanas; y
- c) recolección del sobrenadante que comprende factores de crecimiento y/o citocinas producidas en el cultivo del paso b);
- d) crioconservación del sobrenadante recolectado en el paso c) a una temperatura entre -35 y -165°C;
- e) reconstitución del sobrenadante del paso d) al mantenerlo entre 25 y 30°C,

para usarse en un método de tratamiento de una enfermedad seleccionada de tendinosis, rotura fibrilar del músculo, tendinitis, bursitis, sinovitis, artrosis, rotura de cartílago o una condropatía; en donde el paso e) se realiza durante 10 a 60 minutos antes de su uso, y en donde la composición se administra en un tejido que comprende células del mismo tipo que las células específicas de tejido del paso b).

En otra realización, la composición para usarse se administra a un sujeto diferente del sujeto donante de los monocitos o las células estimulantes del factor de crecimiento.

En otra realización, la composición para usarse se crioconserva después del paso c) y se reconstituye al mantener la composición entre 25 y 30°C entre 10 y 60 minutos antes de su uso.

En otra realización, la composición para usarse se administra en un tejido que comprende células del mismo tipo que las células estimulantes del factor de crecimiento del paso b).

Descripción de las figuras

Las siguientes figuras ilustran la presente invención.

Figura 1. A: Ensayo de Citocinas Fastimmune con PRP. B: Ensayo de Citocinas Fastimmune con una composición de la invención. Las células se detectan con anticuerpo CD33. R1 corresponde a linfocitos y R2 corresponde a monocitos.

Figura 2. Concentración (ng/mL) de factor de crecimiento derivado de plaquetas AA (PdGF AA) en la composición de la invención (PRS, columna negra) y plasma rico en plaquetas (PRP, columna gris).

Figura 3. Concentración (ng/mL) de factor de crecimiento derivado de plaquetas AB (PdGF AB) en la composición de la invención (PRS, columna negra) y plasma rico en plaquetas (PRP, columna gris).

Figura 4. Concentración (ng/mL) de factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PdGF BB) en la composición de la invención (PRS, columna negra) y plasma rico en plaquetas (PRP, columna gris).

Figura 5. Concentración (ng/mL) de factor de crecimiento transformante beta (TGF beta) en la composición de la invención (PRS, columna negra) y plasma rico en plaquetas (PRP, columna gris).

Figura 6. Concentración (ng/mL) de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en la composición de la invención (PRS, columna negra) y plasma rico en plaquetas (PRP, columna gris).

Figura 7. Concentración (ng/mL) de factor de crecimiento epidérmico (EGF) en la composición de la invención (PRS, columna negra) y plasma rico en plaquetas (PRP, columna gris).

Figura 8. Concentración (pg/mL) de factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF 1) en la composición de la invención (PRS, columna negra) y plasma rico en plaquetas (PRP, columna gris).

Figura 9. Concentración (pg/mL) de interleucina 1 beta (IL 1 beta) en la composición de la invención (PRS, columna negra) y plasma rico en plaquetas (PRP, columna gris).

Figura 10. Concentración (pg/mL) de interleucina 6 (IL 6) en la composición de la invención (PRS, columna negra) y plasma rico en plaquetas (PRP, columna gris).

Figura 11. Concentración (pg/mL) de interleucina 10 (IL 10) en la composición de la invención (PRS, columna negra) y plasma rico en plaquetas (PRP, columna gris).

Figura 12. Concentración (pg/mL) del factor de necrosis de tumor alfa (TNF alfa) en la composición de la invención (PRS, columna negra) y plasma rico en plaquetas (PRP, columna gris).

Figura 13. Evolución del porcentaje de pacientes que padecen tendinitis rotuliana de fase II (II, negro) y fase III (III, blanco) desde el día 0 (control) hasta el día 27 después del tratamiento.

Figura 14. Evolución del porcentaje de pacientes que padecen tendinitis de Aquiles de fase II (II, negro) y fase III (III, blanco) desde el día 0 (control) hasta el día 30 después del tratamiento.

Figura 15. Evolución del porcentaje de pacientes que padecen roturas del músculo de fase II (II, negro) y fase III (III, blanco) desde el día 0 (control) hasta el día 42 después del tratamiento.

Figura 16. Ecografía de un sujeto con ruptura del músculo realizada el día anterior al tratamiento (-1), el día 4 después del tratamiento (+4) y el día 8 después del tratamiento (+8).

Figura 17. Evolución del porcentaje de pacientes que padecen gonartrosis de fase II (II, negro) y fase III (III, blanco) desde el día 0 (control) hasta el día 56 después del tratamiento.

Figura 18. Evolución del porcentaje de pacientes que padecen condromalacia rotuliana de fase II (II, negro) y fase III (III, blanco) desde el día 0 (control) hasta el día 56 después del tratamiento.

Figura 19. Evolución del porcentaje de pacientes que padecen ruptura del ligamento cruzado anterior de fase II (II, negro) y fase III (III, blanco) desde el día 0 (control) hasta el mes 5 después del tratamiento.

Figura 20. Evolución del porcentaje de pacientes que padecen osteopatía dinámica del pubis de fase II (II, negro), fase III (III, blanco) y fase IV (IV, gris) desde el día 0 (control) hasta el mes 4 después del tratamiento.

Figura 21. Evolución del porcentaje de pacientes que padecen esguince del ligamento peroneo astrágalo de fase II (II, negro) y fase III (III, blanco) desde el día 0 (control) hasta el día 24 después del tratamiento.

Descripción detallada de la invención

En una realización, la presente invención divulga un método para obtener una composición que comprende los siguientes pasos:

- a) purificación de monocitos a partir de una muestra en condiciones estériles;
- b) cultivo de los monocitos purificados en medio libre de suero con células específicas de tejido;
- c) recolección del sobrenadante que comprende factores de crecimiento y/o citocinas producidas por el cultivo del paso b); y
- d) crioconservación del sobrenadante recolectado en el paso c) a una temperatura entre -35 y -165°C.

en donde las células específicas de tejido se seleccionan del grupo que consiste en miocitos, células del músculo esquelético, células satélite del músculo, tenocitos, células de Schwann, condrocitos, sinoviocitos, linfocitos, células del folículo piloso, células de miocardio, células madre mesenquimales o combinaciones de las mismas; en donde la composición es para la regeneración de tejido de lesiones musculoesqueléticas.

En una realización preferida, después de haber sido almacenado, el método comprende adicionalmente el paso de

- e) reconstitución de los factores de crecimiento y/o citocinas crioconservados aproximadamente entre 25 y 30°C durante aproximadamente entre 10 y 60 minutos.

El método de la invención se refiere a la obtención de una composición que se usa en la regeneración de tejidos.

Para los fines de la presente invención, las expresiones "medicina regenerativa", "reparación de tejidos", "lesiones en un tejido", "recuperación de tejidos", "regeneración de tejidos" o "curación de tejidos" deben considerarse sinónimos de cualquier proceso que implique la curación de un tejido compuesto de células de mamífero previamente lesionadas de cualquier manera. Preferentemente, el proceso implica la regeneración del tejido herido.

Antes de la purificación de los monocitos en el paso a), la muestra de monocitos se puede obtener mediante aféresis, a partir de sangre completa mediante centrifugación en gradiente con un medio ficoll o mediante cualquier otra técnica conocida en la técnica. La aféresis es una tecnología médica extracorpórea en la que la sangre de una persona pasa a través de un aparato que separa un constituyente en particular y devuelve el resto a la circulación. La sangre se filtra para remover las células madre. La centrifugación por medio ficoll (Ficoll-Plaque) es una técnica que separa la sangre de sus componentes. El medio normalmente se coloca en la parte inferior de un tubo cónico, y luego la sangre se coloca lentamente sobre el medio. Después de ser centrifugadas, las siguientes capas son visibles en el tubo cónico, de arriba a abajo: plasma y otros constituyentes, una capa de células mononucleares llamada capa leucocitaria (PBMC/MNC).

La purificación de los monocitos se realiza al colocarlos en cultivo bajo condiciones hipóxicas de esterilidad total. Dado que la composición obtenida por el proceso de la invención se aplicará en un sujeto, es necesario que todos los pasos se realicen en condiciones estériles. En el cuerpo, las concentraciones de oxígeno oscilan entre el 1 y el 12%, en lugar del 21% en la atmósfera. Las células cultivadas con bajo contenido de oxígeno, o hipoxia, crecen más rápido, viven más tiempo y muestran menos estrés. La concentración de oxígeno en condiciones hipóxicas es del 3-5 %. Los monocitos se pueden seleccionar, por ejemplo, por adherencia después de un cultivo de incubación de 24 horas o por una segunda centrifugación en un gradiente de densidad.

En el paso b), los monocitos purificados en el paso a) se cultivan en un medio libre de suero con una célula específica de tejido (también conocido como cocultivo). Para los fines de la presente invención, las células específicas de tejido y las células estimuladoras del factor de crecimiento se refieren al mismo concepto, es decir, una o más células específicas de un tejido. El cocultivo de los monocitos y las células específicas de tejido estimula el factor de crecimiento y/o la producción de citocinas durante este cultivo. Es muy importante evitar cualquier ingrediente que pueda inducir la diferenciación de monocitos, tal como suero fetal bovino, rojo fenol, antibióticos o antifúngicos entre otros. Los factores de crecimiento y/o citocinas producidos en el sobrenadante del cultivo son los elementos esenciales de la composición de la invención. En una realización preferida, el medio de cultivo contiene además factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). El origen de los monocitos es una muestra de sangre del mismo donante o de un donante diferente de las células estimulantes del factor de crecimiento. En una realización preferida, el origen de los monocitos es una muestra de sangre del mismo sujeto donante de las células estimulantes del factor de crecimiento.

En una realización preferida, las células específicas de tejido o células estimulantes del factor de crecimiento son células seleccionadas de: miocitos, células del músculo esquelético, células satélite del músculo, tenocitos, células de Schwann, fibroblastos dérmicos, condrocitos, sinoviocitos, linfocitos, células del folículo piloso, células de miocardio, células madre mesenquimales o combinaciones de las mismas. En una realización preferida, las células son de origen humano. Las células se pueden obtener de una recolección de células, o de un cultivo celular primario de un tejido de un sujeto (donante). Las células del tejido pueden ser células sanas o enfermas.

El cultivo de los monocitos y las células específicas de tejido puede comprender además células mesenquimales adultas, que son del mismo o diferente origen (recolección de células o cultivo celular primario del tejido de un donante) que las células específicas de tejido (células mesenquimales adultas autólogas o alogénicas). En una realización preferida, los monocitos purificados se cultivan en el paso b) con un cultivo primario de células de un tejido que puede ser el mismo tejido en el que se aplicará la composición obtenida en un sujeto. Durante el cultivo, que también se realiza en esterilidad con hipoxia, los monocitos producen los factores de crecimiento y/o citocinas y los excretan al sobrenadante, del que se recolectan. Dependiendo de las células específicas de tejido adicionadas al cultivo, es posible obtener conjuntos específicos de tejido de factores de crecimiento y/o citocinas. Las células específicas de un tejido dado inducen la producción de factores de crecimiento y/o citocinas diferentes de un tejido diferente. Esto permite preparar composiciones que tienen diferentes tipos de factores de crecimiento y/o citocinas dependiendo de las células específicas del tejido en el paso b).

En una realización preferida, el cocultivo en el paso b) se realiza entre 30 y 40°C, preferentemente a 37°C.

La recolección de los factores de crecimiento y/o citocinas en el paso c) se puede realizar mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica. Estos componentes se excretan en el medio de cultivo durante el cocultivo y son específicos del tejido del que provienen las células específicas del tejido cultivadas con los monocitos. El proceso puede comprender además la nanoencapsulación de los factores de crecimiento recolectados. La nanoencapsulación de agentes terapéuticos aumenta su eficacia, especificidad y capacidad de direccionamiento. Los nanotransportadores protegen su carga útil de la degradación prematura en el entorno biológico, mejoran la biodisponibilidad y prolongan la presencia en la sangre y la absorción celular. En una realización preferida, los factores de crecimiento se encapsulan mediante tecnología microfluídica. En una realización preferida, la recolección de la composición del cultivo en el paso c) se lleva a cabo a una temperatura entre 10 y 20°C, más preferentemente a 15°C. Estas bajas temperaturas en el paso c) evitan o minimizan la pérdida de constituyentes volátiles presentes en el plasma o en el sobrenadante del cultivo y también permiten mantener un riesgo muy bajo de contaminación microbiana en la composición.

La crioconservación del producto en el paso d) se lleva a cabo congelando el sobrenadante obtenido en el paso c) a una temperatura entre -35 y -165°C. En una realización preferida, la composición se congela a -35°C y luego se crioconserva a una temperatura entre -35°C y -86°C. En una realización aún más preferida, la composición se congela a -35°C y luego se somete a una rampa de temperatura hasta -86°C. En una realización más preferida, la composición se congela primero y se crioconserva a 35°C durante 24 horas y luego, se somete gradualmente a temperaturas más bajas hasta -86°C. Preferentemente, la composición se almacena entre -80 y -86°C hasta su uso. Se ha demostrado experimentalmente que el almacenamiento a partir de -40°C garantiza la estabilidad y la actividad biológica del GF y/o las citocinas presentes en la composición y su actividad *in vivo* también restaura un tejido lesionado. La composición crioconservada puede mantenerse al menos 1 año entre -40 y -165°C. Preferiblemente al menos 3 años. En una realización preferida, el sobrenadante se dosifica en dosis individuales.

La composición de la invención, como cualquier otra composición de regeneración de tejidos, debe aplicarse a temperatura ambiente (25 - 30°C). Esta temperatura es esencial, ya que el propósito de la composición es para usarse como tratamiento en medicina regenerativa, que se realizan siempre a estas temperaturas, ya que el tratamiento se aplica directamente en el tejido lesionado de un sujeto. Por esta razón, la reconstitución de la composición en el paso e) debe llevarse a cabo al mantener la composición a temperatura ambiente (entre 25 y 30°C) durante entre 10 minutos y 1 hora. En una realización preferida, la reconstitución de la composición se realiza al mantenerla entre 25 y 30°C durante entre 20 y 40 minutos. La descongelación de la composición durante el paso de reconstitución e) provoca la destrucción de cualquier fracción del complemento y cualquier inmunoglobulina presente en la muestra. La presencia de inmunoglobulinas en la composición puede producir reacciones cruzadas inmunológicas y reacciones autoinmunitarias en el receptor sujeto de la composición. Por lo tanto, la ausencia de inmunoglobulinas en la composición descongelada permite que el producto obtenido por este proceso se aplique a un sujeto receptor que padece una enfermedad autoinmunitaria. En consecuencia, la composición de la invención podría usarse en el donante sujeto de las células específicas de tejido (autólogas) o en un sujeto diferente (alogénicas), sin riesgo de reacción inmunitaria en el receptor.

La composición reconstituida después del paso e) tiene una concentración análoga de factores de crecimiento y/o citocinas con la misma actividad biológica, en relación con la composición obtenida después del paso c). Por lo tanto, la composición obtenida bajo el método divulgado en la presente es estable durante el tiempo después de la crioconservación y efectividad de la composición después de la crioconservación permite el almacenamiento de la composición y evita cualquier extracción de sangre posterior al donante, ya que las dosis de la composición obtenidas mediante el proceso descrito en la presente pueden aplicarse posteriormente de acuerdo con las necesidades de un paciente (el mismo sujeto que el donante o cualquier otro receptor).

También se ha demostrado experimentalmente que los efectos sobre la proliferación celular, la migración celular, la quimiotaxis y la síntesis auto y paracrina de factores de crecimiento inducidos por la composición reconstituida son idénticos a los de la composición antes de la crioconservación. Por lo tanto, la crioconservación y reconstitución

de la composición no tiene efecto en el tejido receptor.

En una realización preferida, la composición obtenida mediante el método de la invención contiene plaquetas, glóbulos rojos o leucocitos en una cantidad de menos del 1 % de la cantidad total de componentes en la muestra. Más preferentemente, menos de 0,5% e incluso más preferentemente, la composición contiene menos de 0,001% de plaquetas, glóbulos rojos o leucocitos de la cantidad total de componentes en la muestra.

En otra realización, la divulgación se refiere a una composición para la regeneración de tejidos obtenida mediante un método que consiste en los siguientes pasos:

- a) purificación de monocitos a partir de una muestra en condiciones estériles;
- b) cultivo de los monocitos purificados en medio libre de suero con células específicas de tejido;
- c) opcionalmente, adicionar un factor estimulante de colonias de macrófagos;
- d) recolección del sobrenadante que comprende factores de crecimiento y/o citocinas producidas por el cultivo del paso b);
- e) criopreservación del sobrenadante recolectado en el paso c) a una temperatura entre -35 y -165°C,

en donde las células específicas de tejido se seleccionan del grupo que consiste en miocitos, células del músculo esquelético, células satélite del músculo, tenocitos, células de Schwann, condrocitos, sinoviocitos, linfocitos, células del folículo piloso, células de miocardio, células madre mesenquimales o combinaciones de las mismas.

En una realización preferida, la composición comprende plaquetas, glóbulos rojos o leucocitos en una cantidad de menos de 0,001% de la cantidad total de componentes en la muestra.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la composición obtenida mediante el método divulgado anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable. Como apreciará un experto en esta técnica, los portadores pueden elegirse en función de la vía de administración como se describe a continuación, la ubicación de la cuestión objetico, el fármaco que se administra, el curso temporal de administración del fármaco, etc. En un portador farmacéuticamente aceptable se selecciona para no afectar indebidamente la actividad biológica de la composición de la invención. Pueden incluir emulsionantes, sales, amortiguadores farmacológicamente aceptables, aglutinantes, deslizantes, lubricantes, desintegradores, edulcorantes, pigmentos, codisolventes, tensioactivos, aceites, humectantes, emolientes, conservadores, estabilizadores, antioxidantes o combinaciones de los mismos.

La composición farmacéutica se puede administrar a un sujeto por cualquier medio conocido en la técnica, preferiblemente dirigido al tejido lesionado. El término "sujeto", tal como se usa en la presente, se refiere a humanos, así como a no humanos. Por ejemplo, los no humanos pueden ser mamíferos (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, un primate o un cerdo).

En una realización, la composición o composición farmacéutica divulgada en la presente se puede almacenar en un vial estéril inyectable. La composición o composición farmacéutica se puede administrar directamente al tejido lesionado. En una realización más preferida, la composición se administra, por ejemplo, por vía intraarticular, subdérmica, subcutánea, intravenosa o intratendinosa.

En otra realización, la invención divulga una composición que se puede obtener mediante un método que consiste en los siguientes pasos:

- a) purificación de monocitos a partir de una muestra;
- b) cultivo de los monocitos purificados en medio libre de suero con células específicas de tejido seleccionadas del grupo que consiste en condrocitos humanos, sinoviocitos humanos, células de Schwann humanas, células del músculo esquelético humano, células satélite del músculo humano, fibroblastos dérmicos humanos, tenocitos humanos, células madre mesenquimales humanas; y
- c) recolección del sobrenadante que comprende factores de crecimiento y/o citocinas producidas en el cultivo del paso b);

para usarse en un método de tratamiento de una enfermedad musculoesquelética seleccionada de tendinitis, rotura fibrilar del músculo, tendinitis, bursitis, sinovitis, artrosis, rotura de cartílago o condropatías en donde la composición se administra en un tejido que comprende células del mismo tipo que las células específicas de tejido del paso b).

En una realización preferida, la composición para usarse se administra a un sujeto diferente del sujeto donante de los monocitos o las células específicas de tejido.

En otra realización, la invención divulga una composición que se puede obtener mediante un método que consiste en los siguientes pasos:

- a) purificación de monocitos a partir de una muestra en condiciones estériles;
- b) cultivo de los monocitos purificados en medio libre de suero con células específicas de tejido seleccionadas del grupo que consiste en condrocitos humanos, sinoviocitos humanos, células de Schwann humanas, células de músculo esquelético humano, células satélite del músculo humano, fibroblastos dérmicos humanos, tenocitos humanos, células madre mesenquimales humanas;
- c) recolección del sobrenadante que comprende factores de crecimiento y/o citocinas producidas en el cultivo del paso b);
- d) criopreservación del sobrenadante recolectado en el paso c) a una temperatura entre -35 y -165°C; y
- e) reconstitución del sobrenadante del paso d) al mantenerlo entre 25 y 30°C,

para usarse en un método de tratamiento de una enfermedad seleccionada de tendinosis, rotura fibrilar del músculo, tendinitis, bursitis, sinovitis, artrosis, rotura de cartílago o condropatías, en donde el paso e) se realiza durante 10 a 60 minutos antes de su uso, y en donde la composición se administra en un tejido que comprende células del mismo tipo que las células específicas de tejido del paso b).

Los pasos del método para obtener la composición para usarse como se indicó anteriormente deben interpretarse como se describió previamente para otras realizaciones en el presente documento.

La composición, o composición farmacéutica, es para usarse en el tratamiento de una enfermedad que requiere medicina regenerativa, reparación de tejidos, regeneración de tejidos o curación de tejidos. La enfermedad puede ser cualquier enfermedad que requiera la curación del tejido después de haber padecido cualquier tipo de evento traumático. El término "reparación", cuando se usa en el contexto de la curación del tejido dañado, se define como la restauración de la arquitectura y la función del tejido después de una lesión. Determinados tejidos del cuerpo son más capaces de proliferación celular (y por lo tanto de regeneración) que otros. La medicina regenerativa se define como el tratamiento de una enfermedad que requiere la regeneración de tejidos biológicos.

La composición descrita en la presente es para usarse en el tratamiento de tejidos que se han lesionado y requieren regeneración de tejidos. En una realización preferida, los factores de crecimiento y/o citocinas presentes en la composición son específicos de tejido. Esto significa que se han producido en un cultivo que comprende monocitos y, como células estimulantes del factor de crecimiento, células del mismo tipo de las células que forman parte del tejido a recuperar/tratar/regenerar. Esto permite un tratamiento específico para un tejido con factores de crecimiento específicos y/o citocinas producidas por células del mismo tejido. Se ha demostrado experimentalmente que las composiciones específicas de tejido tienen propiedades biológicas mejoradas, produciendo mejores resultados *in vitro* e *in vivo* en la regeneración de tejidos.

En una realización más preferida, la composición es para usarse en el tratamiento de una enfermedad que pertenece al campo de la medicina deportiva, traumatología, reparación o rehabilitación. En una realización más preferida, la composición es para usarse en tendinosis, rotura fibrilar del músculo, tendinitis, bursitis, sinovitis, artrosis, rotura de cartílago o una condropatía.

En una realización más preferida, la composición, o una composición farmacéutica para usarse en medicina regenerativa se dirige a la reparación de un tejido seleccionado del grupo que comprende tejido cartilaginoso, tejido óseo, tejido sinovial, tejido graso, tejido tendinoso, tejido ligamentoso, tejido del músculo, tejido epitelial o tejido endotelial.

En una realización específica, la composición para usarse en la reparación de tejido cartilaginoso se ha obtenido usando como factor de crecimiento células estimulantes, condrocitos y/o condroblastos.

En otra realización específica, la composición para usarse en la reparación de tejido óseo se ha obtenido usando como factor de crecimiento células estimulantes, osteoblastos y/u osteocitos y/u osteoclastos.

En otra realización específica, la composición para usarse en la reparación de tejido sinovial se ha obtenido usando como factor de crecimiento células estimulantes, células sinoviales de fibroblastos o células de tipo B y/o células sinoviales similares a macrófagos.

En otra realización específica, la composición para usarse en la reparación de tejido tendinoso se ha obtenido usando como factor de crecimiento células estimulantes, tenocitos (fibrocitos) y/o tenoblastos (fibroblastos).

En otra realización específica, la composición para usarse en la reparación de tejido ligamentoso se ha obtenido mediante el uso de células estimulantes del factor de crecimiento, células madre del ligamento periodontal y/o fibrocitos.

En otra realización específica, la composición para usarse en la reparación de tejido del músculo se ha obtenido usando como células estimulantes del factor de crecimiento, miocitos.

En otra realización específica, la composición para usarse en la reparación de tejido epitelial se ha obtenido usando como factor de crecimiento células estimulantes, células epiteliales y/o fibroblastos.

En otra realización específica, la composición para usarse en la reparación del tejido endotelial se ha obtenido mediante el uso de células endoteliales como células estimulantes del factor de crecimiento.

En una realización más preferida, la composición para usarse descrita en las realizaciones anteriores, se refiere al tratamiento de tendinosis rotuliana, rupturas parciales del músculo, tendinitis de Aquiles, gonartrosis, condropatía rotuliana, desgarro del ligamento cruzado anterior, osteopatía púbica dinámica o esguince del ligamento astrágalo.

En otra realización, la invención divulga un método para el tratamiento de una enfermedad que requiere la regeneración de tejidos, que comprende administrar una cantidad farmacéutica efectiva de la composición farmacéutica descrita anteriormente. En una realización preferida, la enfermedad se selecciona del grupo que comprende tendinosis, ruptura fibrilar del músculo, tendinitis, bursitis, sinovitis, dolor de neuropatía crónica, úlceras, regeneración dérmica, artrosis, ruptura de cartilago, parálisis, lesiones neurológicas o condropatías o cualquier otra enfermedad que requiera medicina regenerativa.

En una realización preferida, la composición para usarse de acuerdo con las realizaciones anteriores se administra a un sujeto diferente del sujeto donante de los monocitos o las células estimulantes del factor de crecimiento, es decir, la composición es para uso alogénico.

En una realización, la composición para usarse que se puede obtener mediante el método indicado anteriormente se aplica en el tejido objetivo después de completar el método de su obtención. De manera alternativa, en una realización preferida, la composición para usarse se crioconserva después del paso c) y se reconstituye mediante su uso previo en el tratamiento de la enfermedad. En una realización más preferida, la composición se reconstituye al mantener la composición entre 25 y 30°C entre 10 y 60 minutos.

En una realización preferida, la composición para usarse se administra en un tejido que comprende células del mismo tipo que las células estimulantes del factor de crecimiento del paso b).

La composición obtenida mediante el método divulgado en la presente ha demostrado ser efectiva en la curación de tejidos dañados, reduciendo el tiempo de recuperación del sujeto que comprende el daño del tejido. La razón principal detrás del éxito de la composición es la presencia de factores de crecimiento específicos para cada tejido específico y el mantenimiento de su función biológica a pesar de haber sido crioconservados.

En la presente divulgación, los términos técnicos y científicos usados en las descripciones en la presente tendrán los significados comúnmente entendidos por un experto en la técnica, a menos que se defina específicamente lo contrario.

Ejemplos

Los ejemplos descritos a continuación tienen como objeto ilustrar esta invención, pero sin limitar el alcance de la misma.

Ejemplo 1: Preparación de la composición

Se centrifugaron bolsas de aféresis monocítica en un gradiente de densidad con Ficoll 30 minutos a 400 xg. Se recolectó la banda intermedia de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La fracción se lavó cuatro veces con suero fisiológico. Las células se resuspendieron en suero. Las células se cultivaron en placas T175 durante 24 horas a 37°C y los monocitos se seleccionaron por adherencia. Las células se centrifugaron en un gradiente de densidad Percell.

Los monocitos se extrajeron de la fracción de gradiente y se cultivaron en medio GM P (GIBCO® CTS TM AIM V® SFM, Thermofisher) sin rojo fenol y sin antibióticos. Se adicionaron 350 µL de suplemento de factor de crecimiento.

Los cultivos primarios de condrocitos humanos, sinoviocitos humanos, células de Schwann humanas, células de músculo esquelético humano, células satélite del músculo humano, fibroblastos dérmicos humanos fueron proporcionados por Innoprot. Los tenocitos humanos se obtuvieron de Zenbio y las células madre mesenquimales humanas provienen de cultivos primarios obtenidos de muestras de tejido adiposo abdominal.

Las células se cultivaron a 37°C en matraces de cultivo pretratados con poli-lisina en medios de cultivo como se describe a continuación:

- Tenocitos humanos: 100 mL de DMEM, 240 µL de heparina, 5 mL de plaquetas lisadas, 1 mL de antibióticos, 1 mL de glutamina, 0,5 mL de anfotericina B.

- Células madre mesenquimales: 100 mL de alfa-MEM, 240 µL de heparina, 5 mL de plaquetas lisadas, 1 mL de

glutamina, 0,5 mL de anfotericina B.

- Células de músculo esquelético humano y células satélite de músculo humano: 100 mL de DMEM, 240 µL de heparina, 5 mL de plaquetas lisadas, 1 mL de suplemento de crecimiento de células del músculo esquelético, 1 mL de antibióticos.

5 - Condrocitos humanos: 100 mL de DMEM, 240 µL de heparina, 5 mL de plaquetas lisadas, 1 mL de CGS (Suplemento de Crecimiento de Condrocitos), 1 mL de antibióticos.

- Células de Schwann humanas: 100 mL de DMEM, 240 µL de heparina, 5 mL de plaquetas lisadas, 1 mL de SCGS (Suplemento de Crecimiento de Células de Schwann), 1 mL de antibióticos.

10 - Fibroblastos dérmicos humanos: 100 mL de DMEM, 240 µL de heparina, 2 mL de plaquetas lisadas, 1 mL de FGS (Suplemento de Crecimiento de Fibroblastos), 1 mL de antibióticos.

- Sinoviocitos humanos: 100 mL de DMEM, 240 µL de heparina, 2 mL de plaquetas lisadas, 1 mL de SGS (Suplemento de Crecimiento de Sinoviocitos), 1 mL de antibióticos.

Ejemplo 2: Análisis de la composición

15 Se analizaron los componentes de un cocultivo de 24 horas de monocitos obtenidos después de un cocultivo y se compararon con los componentes de una composición de control del PRP después de la desgranulación de plaquetas.

20 Cuando las células se han congelado previamente, la descongelación se llevó a cabo sembrando las células en placas 1T75 con PLL y adicionando 20 mL de medio de cultivo, excepto tenocitos humanos y células madre mesenquimales, que se centrifugaron a 400 xg durante 7 minutos antes de adicionar las células al medio de cultivo.

25 Los componentes se detectaron en un aparato de citometría de flujo CUBE 6 con el kit de Ensayo de Citocinas Fastimmune. La Figura 1 muestra que el contenido molecular general de la composición (A) es similar al control del PRP (B). Por lo tanto, la composición obtenida a partir del sobrenadante de un cultivo de monocitos se puede usar para los mismos fines que el PRP.

30 Las citocinas y los factores de crecimiento en la composición obtenida del ejemplo 1 (PRS) y la muestra de control (PRP) se cuantificaron mediante análisis multiplex en un espectrofotómetro BioRad®. Los compuestos analizados fueron: el factor de crecimiento derivado de plaquetas AA (PdGF AA, Figura 2), el factor de crecimiento derivado de plaquetas AB (PdGF AB, Figura 3), el factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PdGF BB, Figura 4), el factor de crecimiento transformante beta (TGF beta, Figura 5), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, Figura 6), el factor de crecimiento epidérmico (EGF, Figura 7), el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF 1, Figura 8), la interleucina 1 beta (IL 1 beta, Figura 9), la interleucina 6 (IL 6, Figura 10), la interleucina 10 (IL 10, Figura 11) y el factor de necrosis de tumor alfa (TNF alfa, Figura 12).

35 Como se puede ver en las figuras 2 a 8, la cantidad de todos los factores de crecimiento PdGF AA, PdGF AB, PdGF BB, TGF beta 1, VEGF, EGF e IGF aumenta significativamente en la composición obtenida del sobrenadante del cultivo, en comparación con el PRP estándar.

40 Los factores de crecimiento PDGF, TGF-β, IGF 1, VEGF y EGF están relacionados con la migración y proliferación celular, desempeñando un papel importante en la curación de las lesiones del músculo. Además, IL 1 Beta e IL 6 son interleucinas proinflamatorias, mientras que IL 10 es una interleucina antiinflamatoria. El equilibrio entre ellos modula las señales inhibitoras o estimuladoras durante el proceso de inflamación, en forma autocrina, paracrina y endocrina.

Ejemplo 3: Ensayos clínicos

50 Las composiciones obtenidas a partir del método del ejemplo 1 se probaron en el tratamiento de lesiones en músculos, tendones, ligamentos, cartílagos y huesos en un total de 327 pacientes que padecen cualquiera de esas lesiones. Cada tejido se trató con una composición obtenida cultivando los monocitos con células del mismo tipo que el tejido objetivo (composiciones específicas de tejido). Los pacientes practicaron actividades deportivas tal como fútbol, tenis, carreras, atletismo, caminata, pádel y baloncesto. La edad de los sujetos fue entre 15 y 58 años (edad promedio 36 años). El 37 % de los pacientes eran hombres y el 33 % eran mujeres.

55 Las lesiones de cada caso se clasificaron de acuerdo con la escala de Rutland de tendinopatía rotuliana, como se indica en la Tabla 1 (Rutland M et al., 2010. N Am J Sports Phys Ther 5(3):166).

Tabla 1. Fases de la tendinopatía rotuliana

Fases	Escala de la rodilla de saltador Blazina	Etapas de tendinopatía de Kennedy
Fase 1	Dolor solo después de la actividad	Dolor después de la actividad
Fase 2	Dolor/incomodidad durante y después de la actividad con el sujeto aún capaz de	Dolor al inicio y después de la actividad

	desempeñarse a un nivel satisfactorio (no interfiere con la participación)	
Fase 3	Dolor durante y después de la actividad más prolongado, con dificultad progresivamente creciente para desempeñarse a un nivel satisfactorio (interfiere con la competencia)	Dolor al inicio, durante y después de la actividad, pero el rendimiento no se ve afectado
Fase 4	Rompimiento completo del tendón	Dolor al inicio, durante y después de la actividad, y el rendimiento se ve afectado

Los sujetos tratados en el ensayo se clasificaron como se indica en la Tabla 2 de acuerdo con el nivel de lesión para cada caso:

5 Tabla 2. Clasificación de los pacientes de acuerdo con el tipo y gravedad de la lesión.

Lesión	Casos (N)	Fase 2	Fase 3	Fase 4
Tendinosis rotuliana	22	12	10	0
Tendinitis de Aquiles	19	8	11	0
Ruptura del músculo IT	28	14	14	0
Ruptura del músculo RA	19	10	9	0
Gonartrosis	71	45	25	0
Condromalacia rotuliana	66	34	32	0
Rotura del ligamento cruzado anterior	14	8	6	0
Osteopatía dinámica del pubis	38	18	12	8
esguince del ligamento peroneo astrágalo	50	35	15	0

Con el fin de evaluar la recuperación en el tejido de los sujetos, se usó la puntuación VISA (Victoria Institute of Sport Assessment, Visentini PJ et al., 1998. J Sci Med Sport 1(1):22).

10 Ejemplo 4: Tratamiento de tendinosis rotuliana

Se seleccionaron 22 sujetos que padecían tendinosis rotuliana (o tendinopatía). La tendinosis rotuliana es un trastorno musculoesquelético que afecta tanto a los atletas recreativos como a los de élite y que puede provocar una discapacidad que dura varios meses. 12 de estos sujetos presentaron una fase inicial II y 10, padecieron una fase inicial III. Con el fin de evaluar la recuperación en el tejido de los sujetos, se usó la puntuación VISA.

La composición se inyectó en el tendón rotuliano de los sujetos. Los pacientes fueron seguidos a los 10 días, 1 mes, 3 meses y 6 meses después de la inyección de la composición, en la que se evaluaron los datos de la escala VISA. Además, se realizaron ecografías previas y posteriores al tratamiento 10 días después de la implantación.

La Figura 13 muestra la evolución del porcentaje de escala de cada fase de la enfermedad, desde el día 0 (control) hasta el día 27.

Casi el 50 % de los pacientes con lesiones de fase II que fueron tratados con la composición pudieron regresar a la práctica deportiva el día 3 después del tratamiento (PRS). El día 18, todos estos pacientes estaban haciendo deporte. Además, el tiempo de recuperación de los pacientes fue incluso menor que otros tratamientos, tal como el PRS. Después de 27 días, todos los pacientes con lesiones de fase III habían regresado a la actividad deportiva normal.

30 Ejemplo 5: Tratamiento de la tendinitis de Aquiles

Se seleccionaron 19 sujetos que padecían tendinosis rotuliana (o tendinopatía). La tendinosis rotuliana es un trastorno musculoesquelético que afecta tanto a los atletas recreativos como a los de élite y que puede provocar una discapacidad que dura varios meses. 8 de estos sujetos presentaron una fase inicial II y 11, padecieron una fase inicial III.

La composición se inyectó peri-tendón e intratendón en condiciones asépticas en el tendón rotuliano de los sujetos. Los pacientes fueron seguidos a los 10 días, 1 mes, 3 meses y 6 meses después de la inyección de la composición, en la que se evaluaron los datos de la escala VISA. Además, se realizaron ecografías previas y posteriores al tratamiento 10 días después de la implantación.

La Figura 14 muestra la evolución del porcentaje de escala de cada fase de la enfermedad, desde el día 0 (control) hasta el día 30. En el día 6, más del 50 % de los pacientes con lesiones de fase II que fueron tratados con la composición pudieron regresar a la práctica deportiva después del tratamiento (PRS).

45 Ejemplo 6: Tratamiento de desgarro muscular

Se seleccionaron 47 sujetos que padecen de desgarro del músculo. 28 de los sujetos padecieron isquiotibiales y 19 padecieron una ruptura del cuádriceps recto anterior. 24 de los sujetos presentaron una fase inicial II y 23, padecieron una fase inicial III. Con el fin de evaluar el efecto de la composición en cada sujeto, se evaluó el porcentaje de jugadores que regresaron a la actividad deportiva (RTP) después del tratamiento.

La composición se inyectó peri-tendón e intra-tendón en condiciones asépticas en el tendón rotuliano de los sujetos. Los pacientes fueron seguidos a los 10 días, 1 mes, 3 meses y 6 meses después de la inyección de la composición, en la que se evaluaron los datos de la escala VISA. Además, se realizaron ecografías previas y posteriores al tratamiento 10 días después de la implantación.

La figura 15 muestra el resultado del tratamiento con el porcentaje de pacientes que regresaron a la actividad deportiva en un día específico. En las lesiones de grado II, más del 50% de los pacientes tratados con PRS regresaron a los deportes el día 10 después del tratamiento, siendo el 100% el día 15 después de completar el tratamiento.

Con el fin de evaluar la progresión de la recuperación de la lesión, se realizó un seguimiento de uno de los pacientes, un varón de 36 años con un desgarro fibrilar del tercio inferior del bíceps femoral, con el fin de evaluar la cicatrización del músculo. La Figura 16 muestra el resultado de una ecografía realizada el día anterior al tratamiento (-1), el día 4 después del tratamiento (+4) y el día 8 después del tratamiento (+8).

A partir de estos resultados, se puede concluir que los pacientes a los que se aplicó la composición, mejoraron durante el tratamiento, recuperándose de las lesiones.

Ejemplo 7: Tratamiento de la gonartrosis

Se seleccionaron 71 sujetos que padecían gonartrosis. 45 de los sujetos presentaron una fase inicial II y 26, padecieron una fase inicial III. Con el fin de evaluar el efecto de la composición en cada sujeto, se evaluó la escala funcional y de dolor de rodilla, escala WOMAC (The Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index).

La composición se inyectó intraarticular en condiciones asépticas en el tendón rotuliano de los sujetos. Los pacientes fueron seguidos a los 10 días, 1 mes, 3 meses y 6 meses después de la inyección de la composición, en la que se evaluaron los datos de la escala VISA. Además, se realizaron ecografías previas y posteriores al tratamiento 10 días después de la implantación.

La figura 17 muestra el resultado del tratamiento con el porcentaje de pacientes que regresaron a la actividad deportiva en un día específico. En las lesiones de grado II, más del 60% de los pacientes tratados con PRS regresaron a los deportes el día 7 después del tratamiento, siendo el 100% el día 35 después de la finalización del tratamiento.

A partir de estos resultados, se puede concluir que los pacientes a los que se aplicó la composición, mejoraron durante el tratamiento, recuperándose de las lesiones.

Ejemplo 8: Tratamiento de la condromalacia rotuliana

Se seleccionaron 66 sujetos que padecían gonartrosis. 34 de los sujetos presentaron una fase inicial II y 32, padecieron una fase inicial III. Con el fin de evaluar el efecto de la composición en cada sujeto, se evaluó la escala internacional KOOS para la evaluación de la función y el dolor de rodilla (Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score).

La composición se inyectó intraarticular en condiciones asépticas en el tendón rotuliano de los sujetos. Los pacientes fueron seguidos a los 10 días, 1 mes, 3 meses y 6 meses después de la inyección de la composición, en la que se evaluaron los datos de la escala VISA. Además, se realizaron ecografías previas y posteriores al tratamiento 10 días después de la implantación.

La Figura 18 muestra el resultado del tratamiento con el porcentaje de pacientes que regresaron a la actividad deportiva en un día específico (RTP, regresar a la actividad física).

Ejemplo 9: Tratamiento de la ruptura del ligamento cruzado anterior (ACL)

Se seleccionaron 14 sujetos que padecían gonartrosis. 8 de los sujetos presentaron una fase inicial II y 6, padecieron una fase inicial III. Con el fin de evaluar el efecto de la composición en cada sujeto, se evaluó la escala KOOS. El caso de fase III estaba bajo cirugía plástica semitendinosa.

La composición se inyectó intraarticular en condiciones asépticas en el tendón rotuliano de los sujetos. Los

pacientes fueron seguidos a los 10 días, 1 mes, 3 meses y 6 meses después de la inyección de la composición, en la que se evaluaron los datos de la escala VISA. Además, se realizaron ecografías previas y posteriores al tratamiento 10 días después de la implantación.

- 5 La figura 19 muestra el resultado del tratamiento con el porcentaje de pacientes que regresaron a la actividad deportiva en un día específico.

Ejemplo 10: Tratamiento de la osteopatía dinámica del pubis (DOC)

- 10 Se seleccionaron 38 sujetos que padecían DOC. 18 de los sujetos presentaron una fase inicial II, 12, padecieron una fase inicial III y 8 una fase inicial IV. Con el fin de evaluar el efecto de la composición en cada sujeto, se evaluó el porcentaje de jugadores que regresaron a la actividad deportiva (RTP) después del tratamiento.

- 15 La composición se inyectó intraarticular en condiciones asépticas en el tendón rotuliano de los sujetos. Los pacientes fueron seguidos a los 10 días, 1 mes, 3 meses y 6 meses después de la inyección de la composición, en la que se evaluaron los datos de la escala VISA. Además, se realizaron ecografías previas y posteriores al tratamiento 10 días después de la implantación.

- 20 La figura 20 muestra el resultado del tratamiento con el porcentaje de pacientes que regresaron a la actividad deportiva en un día específico.

Ejemplo 11: Tratamiento del esguince del ligamento peroneo astrágalo (AFL)

- 25 Se seleccionaron 50 sujetos que padecían LPA. 35 de los sujetos presentaron una fase inicial II y 15, padecieron una fase inicial III. Con el fin de evaluar el efecto de la composición en cada sujeto, se evaluó la escala FAAM (Foot and Ankle Ability Measure).

- 30 La composición se inyectó intraarticular en condiciones asépticas en el tendón rotuliano de los sujetos. Los pacientes fueron seguidos a los 10 días, 1 mes, 3 meses y 6 meses después de la inyección de la composición, en la que se evaluaron los datos de la escala VISA. Además, se realizaron ecografías previas y posteriores al tratamiento 10 días después de la implantación.

La figura 21 muestra el resultado del tratamiento con el porcentaje de pacientes que regresaron a la actividad deportiva en un día específico.

REIVINDICACIONES

1. Método para obtener una composición, que comprende los siguientes pasos:

- a) purificación de monocitos a partir de una muestra en condiciones estériles;
 - b) cultivo de los monocitos purificados en medio libre de suero con células específicas de tejido;
 - c) recolección del sobrenadante que comprende factores de crecimiento y/o citocinas producido por el cultivo del paso b);
 - d) crioconservación del sobrenadante recolectado en el paso c) a una temperatura entre -35 y -165°C,
- en donde las células específicas de tejido se seleccionan del grupo que consiste en miocitos, células del músculo esquelético, células satélite del músculo, tenocitos, células de Schwann, condrocitos, sinoviocitos, linfocitos, células del folículo piloso, células de miocardio, células madre mesenquimales o combinaciones de las mismas; en donde la composición es para la regeneración de tejido de lesiones musculoesqueléticas.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente el paso de:

- e) reconstitución de los factores de crecimiento crioconservados al mantener la composición entre 25 y 30°C entre 10 y 60 minutos.

3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, donde las células específicas de tejido se obtienen de un tejido no lesionado.

4. El método de las reivindicaciones 1 o 2, donde las células específicas de tejido se obtienen de un tejido lesionado.

5. El método de las reivindicaciones 1 a 4, donde el paso de cultivo b) comprende además células mesenquimales adultas.

6. El método de las reivindicaciones 1 a 5, donde la muestra en el paso a) es del mismo donante que las células específicas de tejido.

7. Composición para la regeneración de tejido, obtenida mediante un método que consiste en los siguientes pasos:

- a) purificación de monocitos a partir de una muestra en condiciones estériles;
- b) cultivo de los monocitos purificados en medio libre de suero con células específicas de tejido;
- c) opcionalmente, adicionar un factor estimulante de colonias de macrófagos;
- d) recolección del sobrenadante que comprende factores de crecimiento y/o citocinas producidas por el cultivo del paso b);
- e) crioconservación del sobrenadante recolectado en el paso c) a una temperatura entre -35 y -165°C,

en donde las células específicas de tejido se seleccionan del grupo que consiste en miocitos, células del músculo esquelético, células satélite del músculo, tenocitos, células de Schwann, condrocitos, sinoviocitos, linfocitos, células del folículo piloso, células de miocardio, células madre mesenquimales o combinaciones de las mismas.

8. La composición de acuerdo a la reivindicación 7, que comprende plaquetas, glóbulos rojos o leucocitos en una cantidad de menos de 0,001% de la cantidad total de componentes en la muestra.

9. Composición farmacéutica que comprende la composición de las reivindicaciones 7 u 8 y un portador farmacéuticamente aceptable.

10. Una composición que se puede obtener mediante un método que consiste en los siguientes pasos:

- a) purificación de monocitos a partir de una muestra;
 - b) cultivo de los monocitos purificados en medio libre de suero con células específicas de tejido seleccionadas del grupo que consiste en condrocitos humanos, sinoviocitos humanos, células de Schwann humanas, células del músculo esquelético humano, células satélite del músculo humano, fibroblastos dérmicos humanos, tenocitos humanos, células madre mesenquimales humanas; y
 - c) recolección del sobrenadante que comprende factores de crecimiento y/o citocinas producidas en el cultivo del paso b);
- para usarse en un método de tratamiento de una enfermedad musculoesquelética seleccionada de tendinitis, rotura fibrilar del músculo, tendinitis, bursitis, sinovitis, artrosis, rotura de cartílago o condropatías en donde la composición se administra en un tejido que comprende células del mismo tipo que las células específicas de tejido del paso b).

11. La composición para usarse de acuerdo a la reivindicación 10, donde la composición se administra a un sujeto diferente del sujeto donante de los monocitos o las células específicas de tejido.

12. Una composición que se puede obtener mediante un método que consiste en los siguientes pasos:

- a) purificación de monocitos a partir de una muestra en condiciones estériles;
- 5 b) cultivo de los monocitos purificados en medio libre de suero con células específicas de tejido seleccionadas del grupo que consiste en condrocitos humanos, sinoviocitos humanos, células de Schwann humanas, células de músculo esquelético humano, células satélite del músculo humano, fibroblastos dérmicos humanos, tenocitos humanos, células madre mesenquimales humanas;
- 10 c) recolección del sobrenadante que comprende factores de crecimiento y/o citocinas producidas en el cultivo del paso b);
- d) crioconservación del sobrenadante recolectado en el paso c) a una temperatura entre -35 y -165°C; y
- e) reconstitución del sobrenadante del paso d) al mantenerlo entre 25 y 30°C,
- 15 para usarse en un método de tratamiento de una enfermedad seleccionada de tendinosis, rotura fibrilar del músculo, tendinitis, bursitis, sinovitis, artrosis, rotura de cartílago o condropatías
- en donde el paso e) se realiza durante 10 a 60 minutos antes de su uso, y
- en donde la composición se administra en un tejido que comprende células del mismo tipo que las células específicas de tejido del paso b).

DIBUJOS

Fig. 1

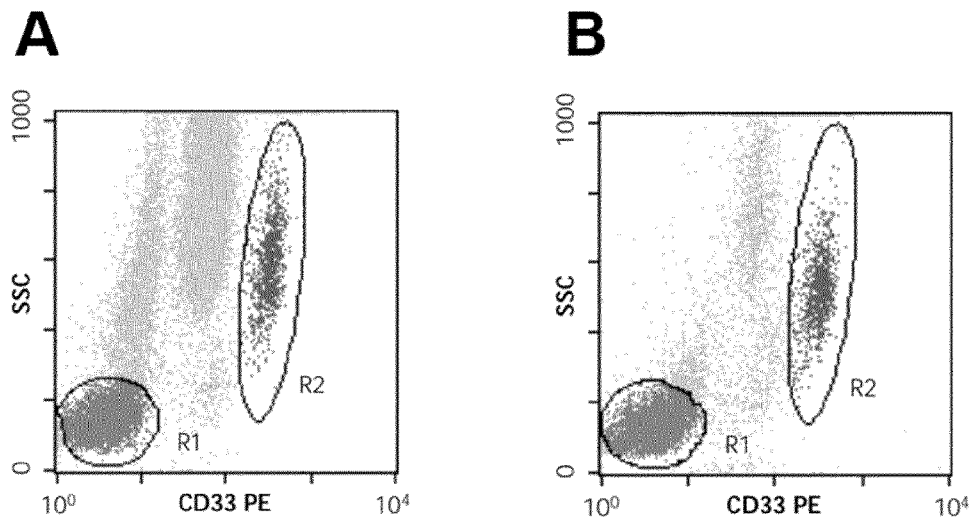


Fig. 2

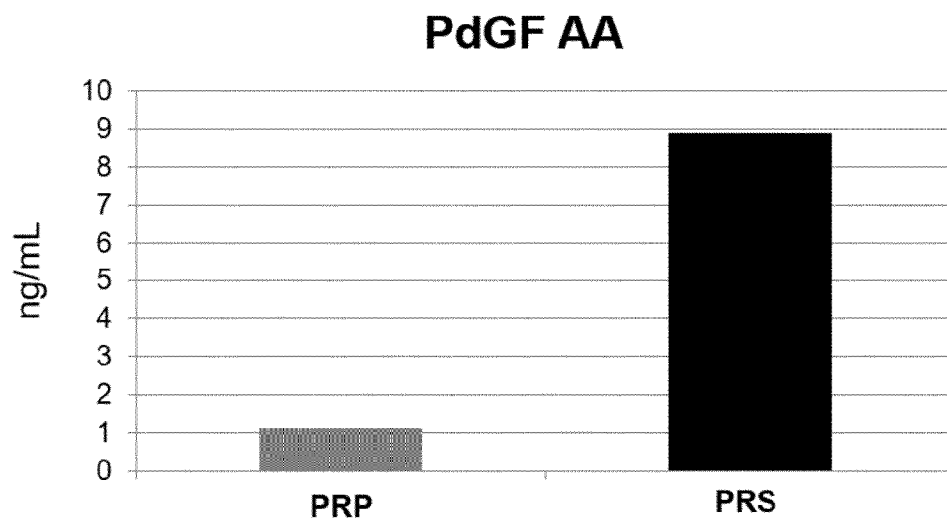


Fig. 3

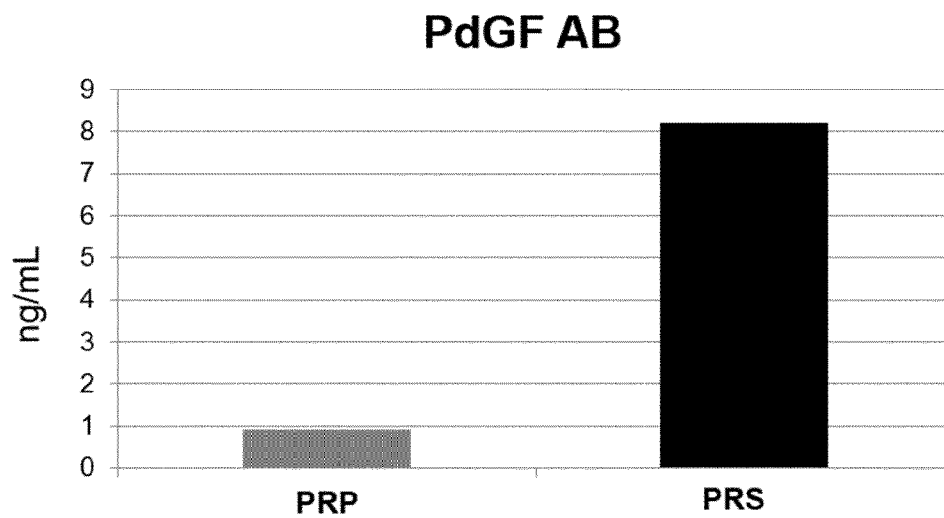


Fig.4

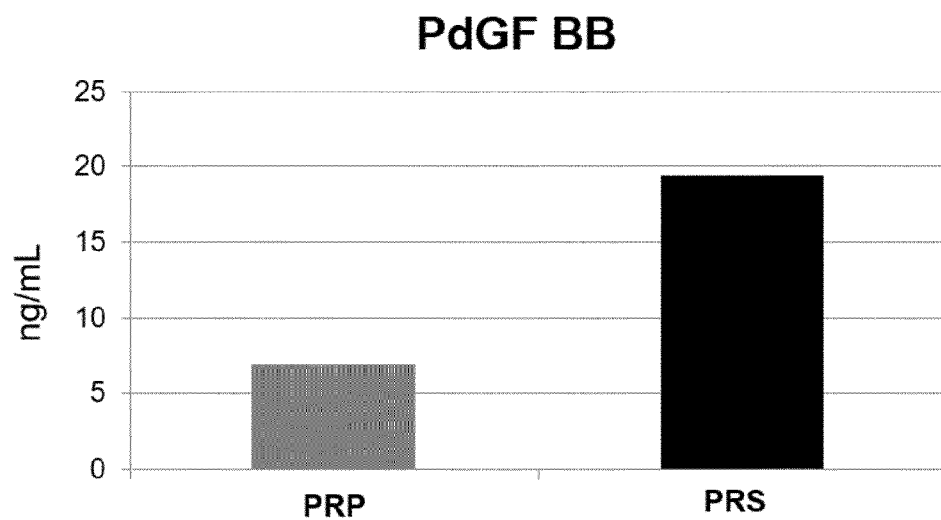


Fig. 5

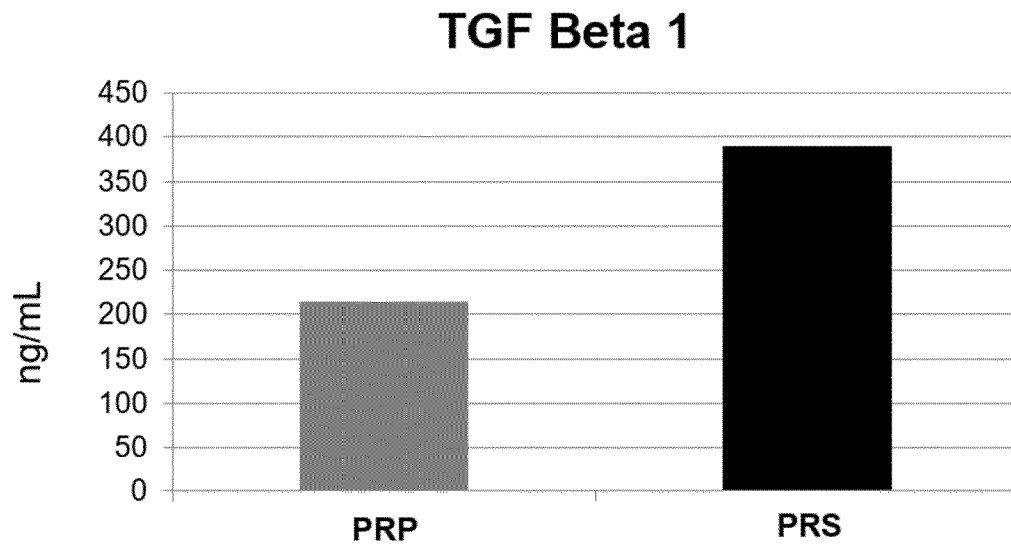


Fig. 6

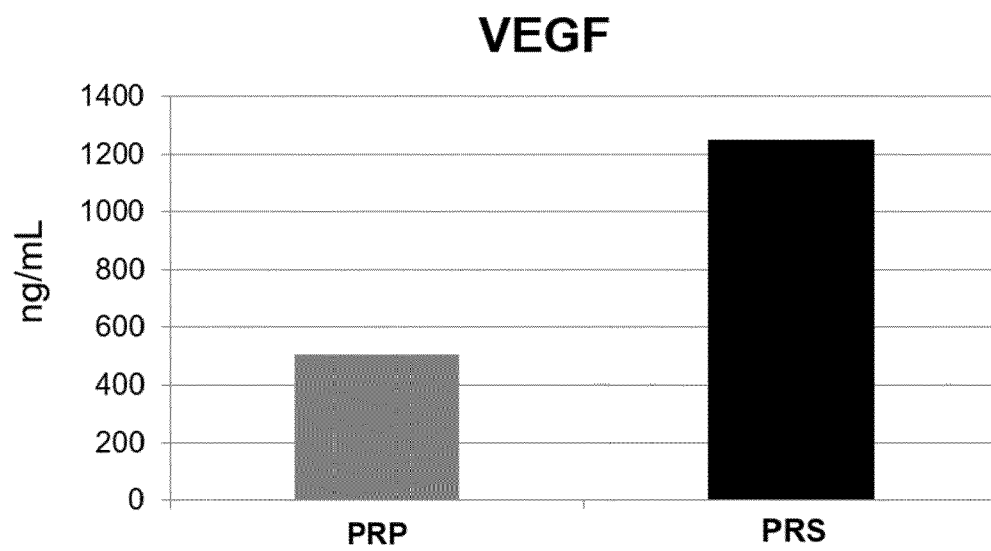


Fig. 7

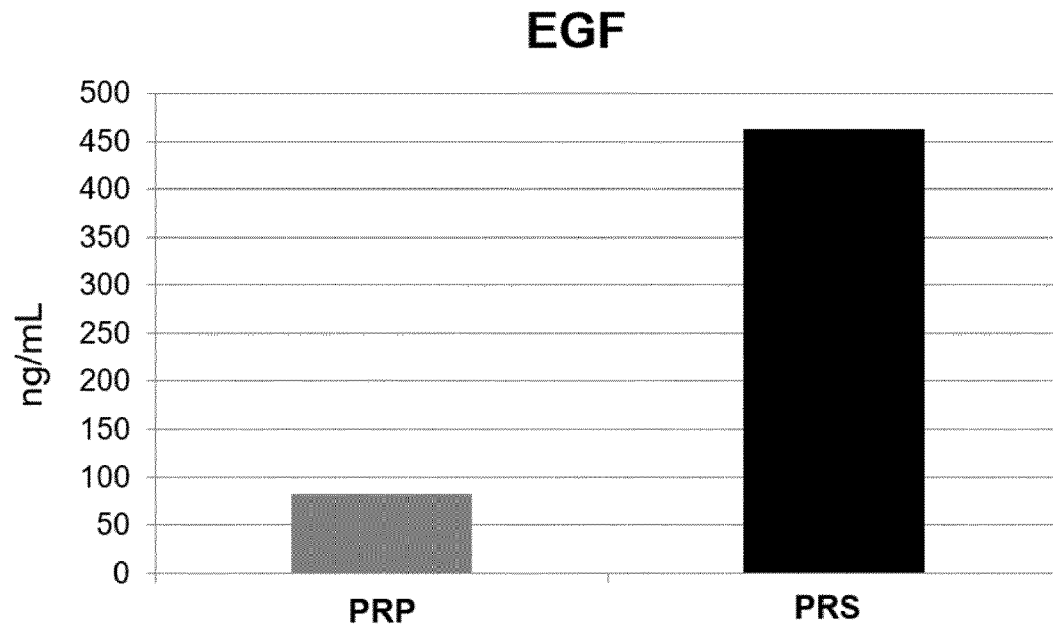


Fig. 8

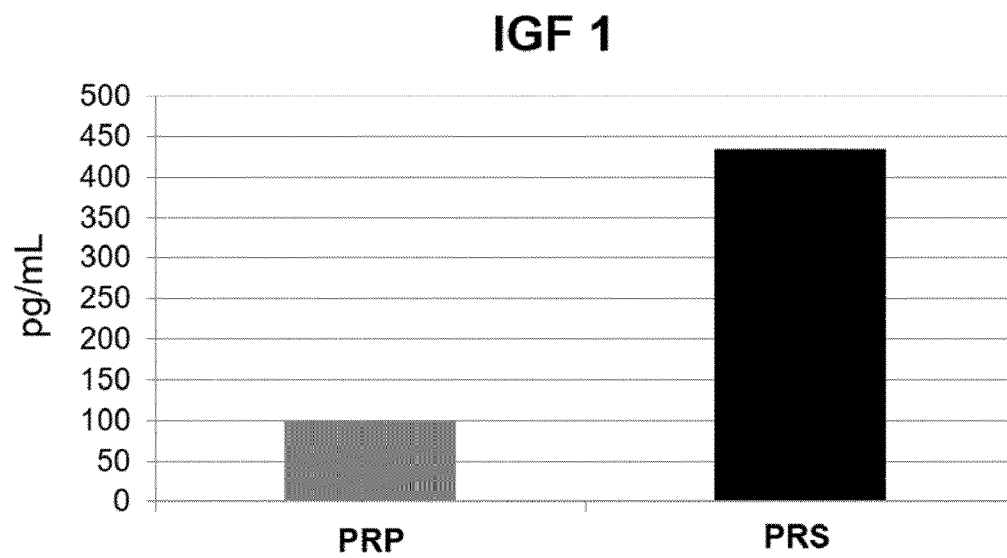


Fig. 9

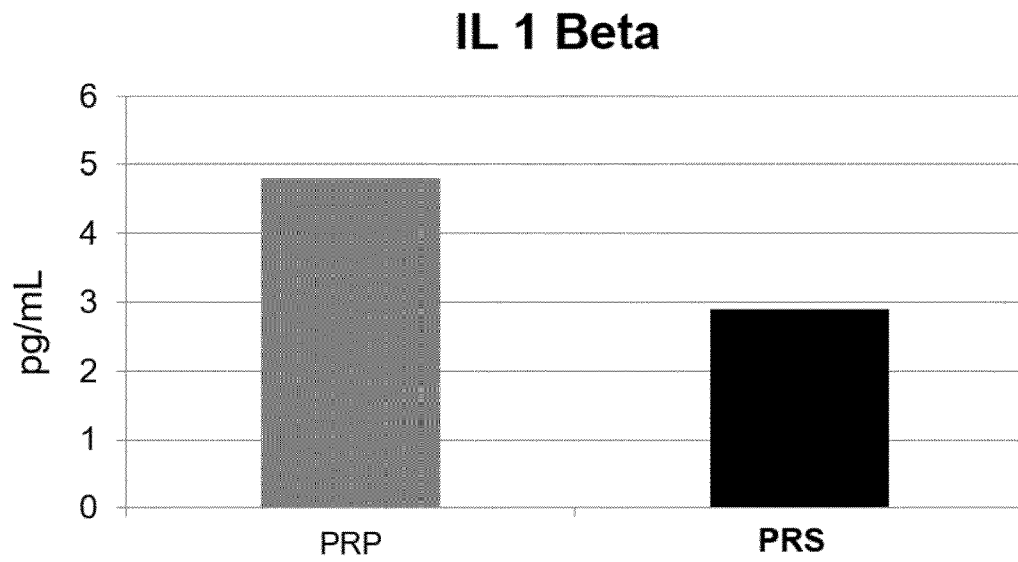


Fig. 10

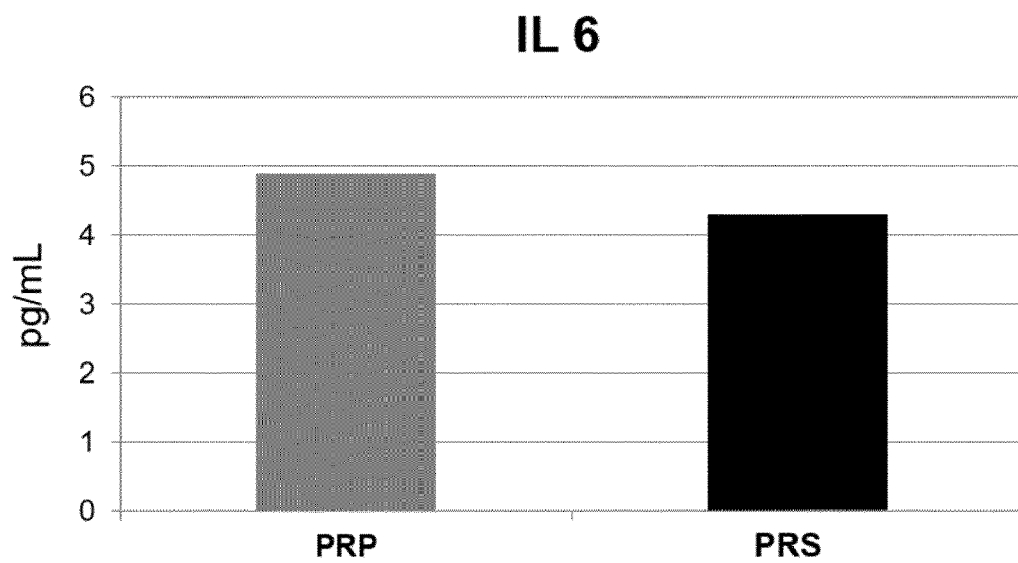


Fig. 11

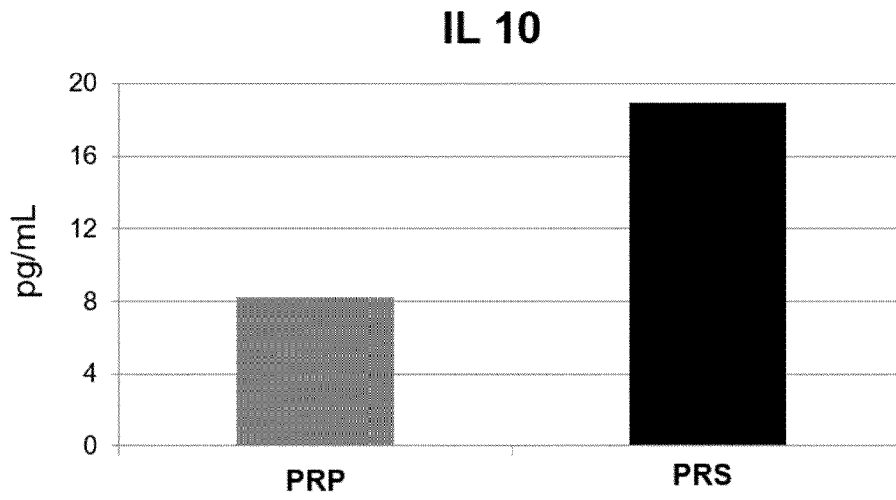


Fig. 12

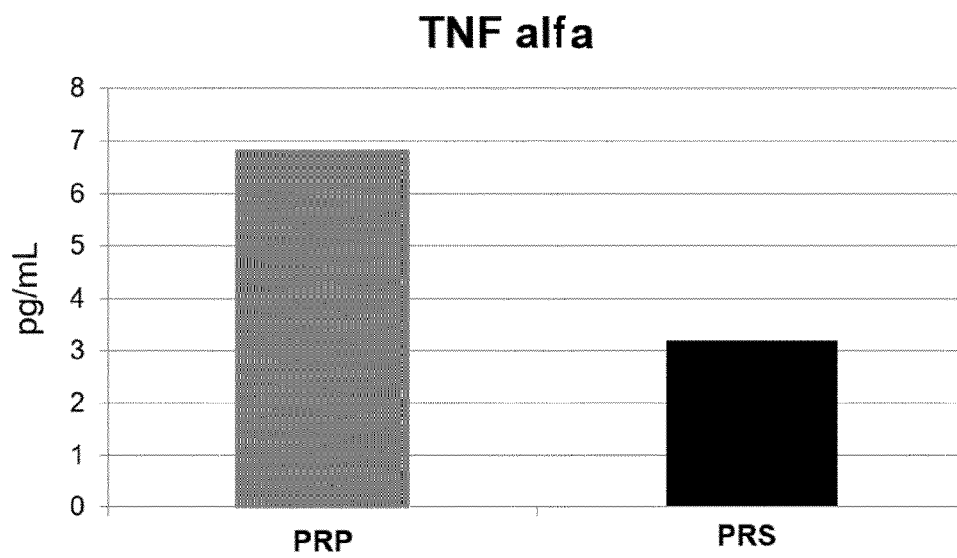


Fig. 13

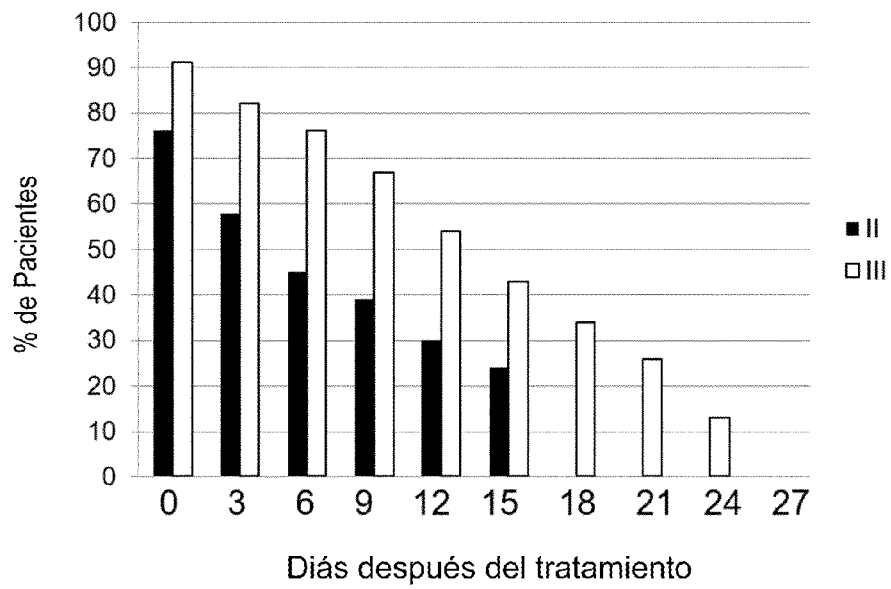


Fig. 14

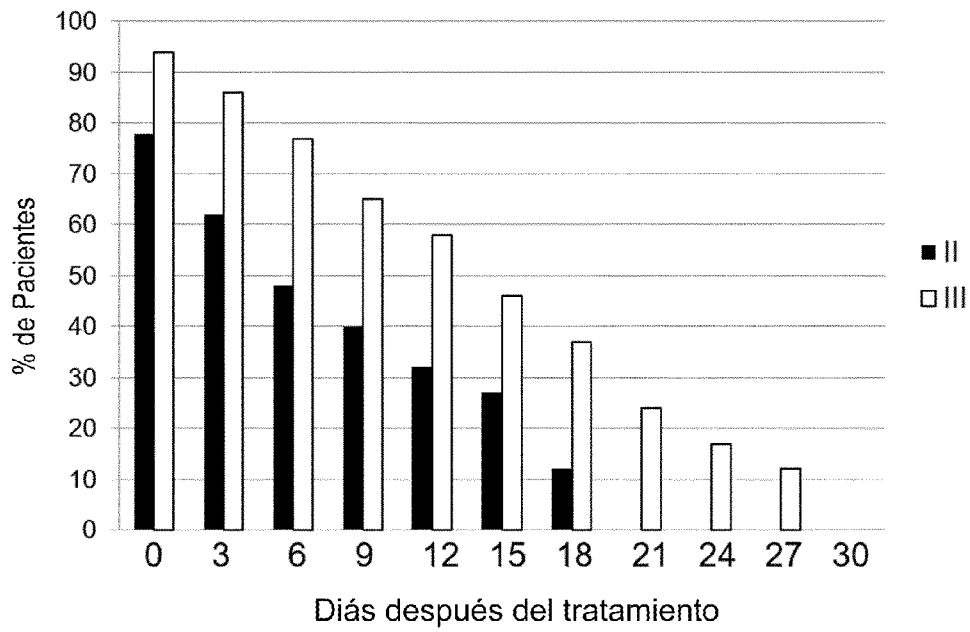


Fig. 15

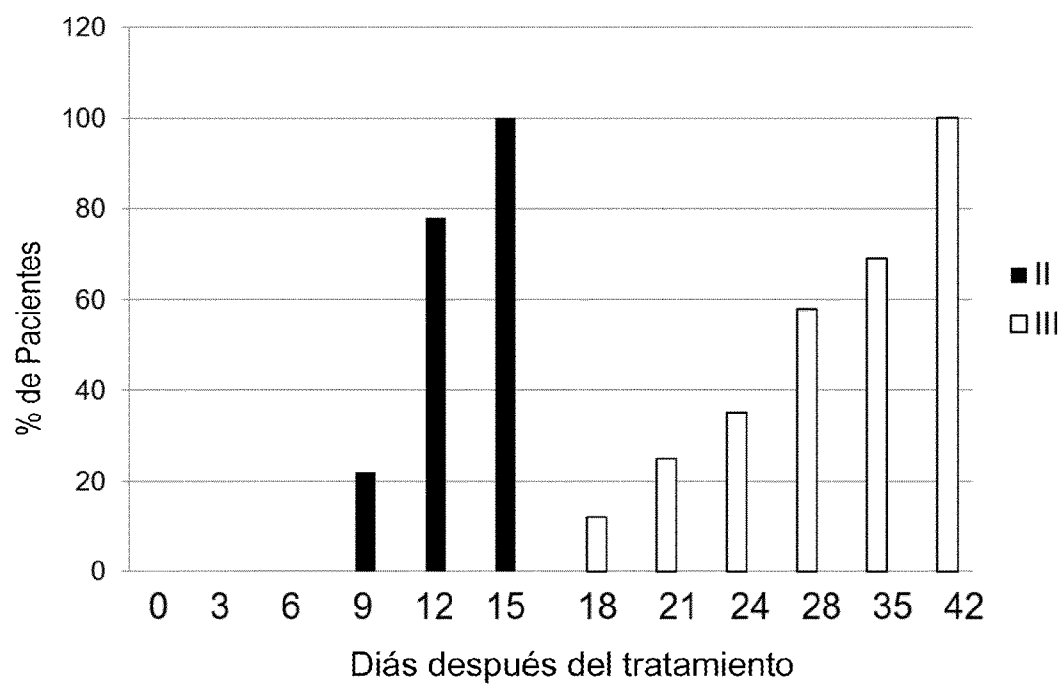
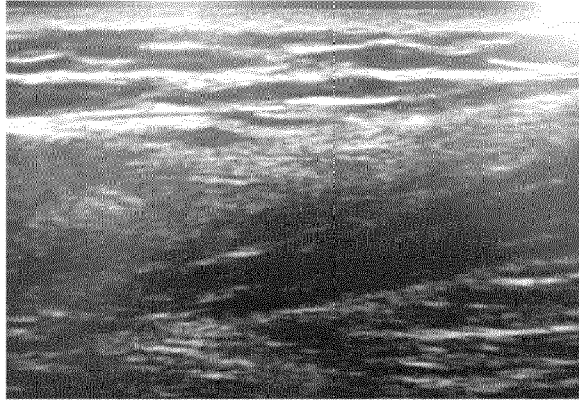


Fig. 16

-1



+4



+8

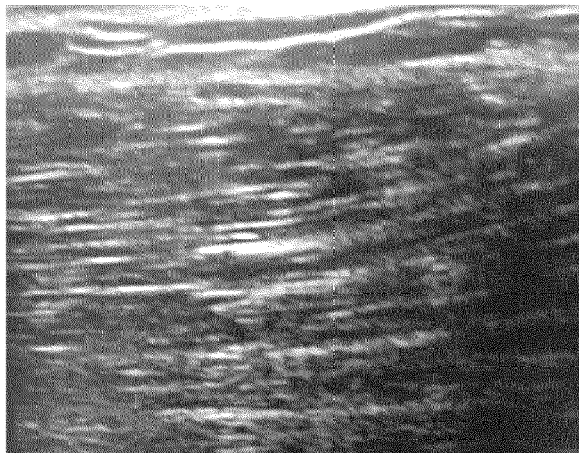


Fig. 17

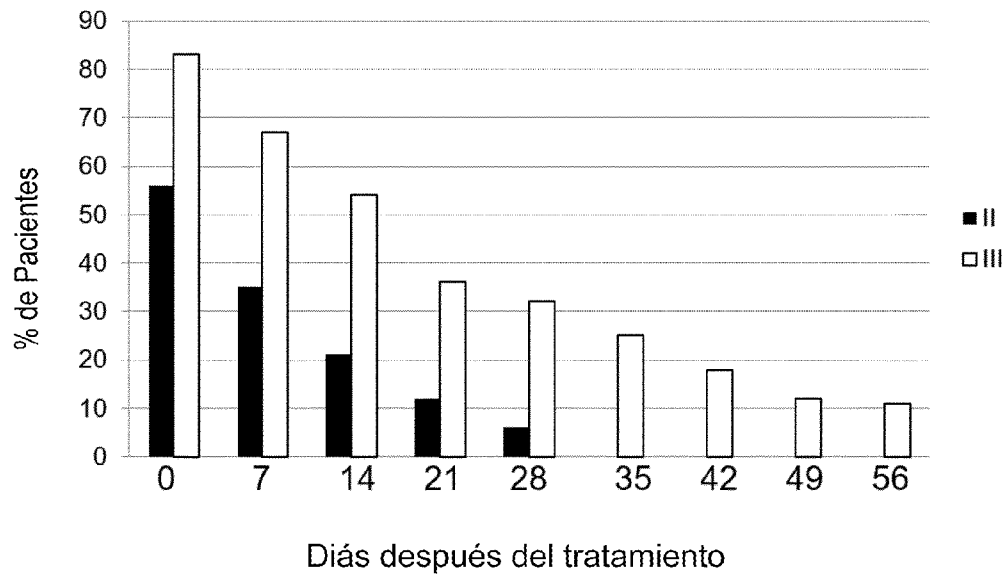


Fig. 18

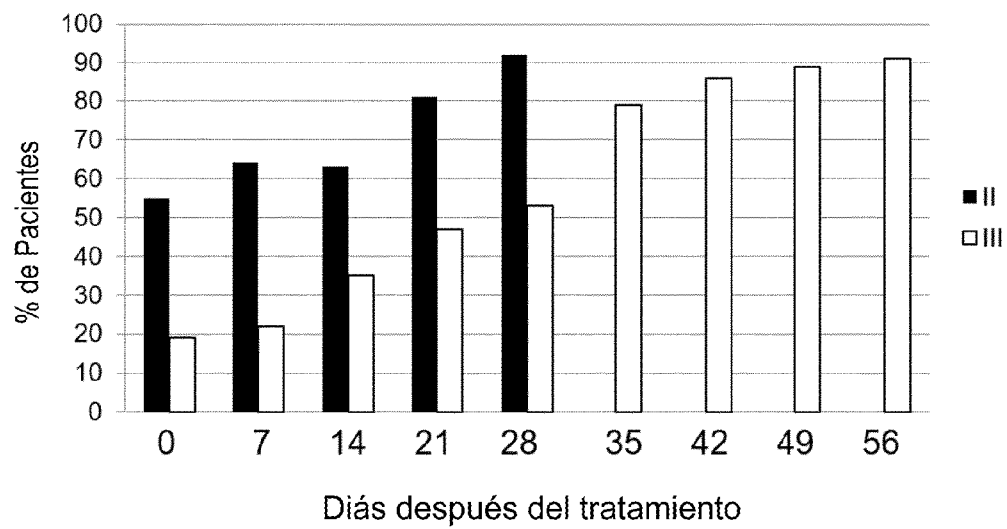


Fig. 19

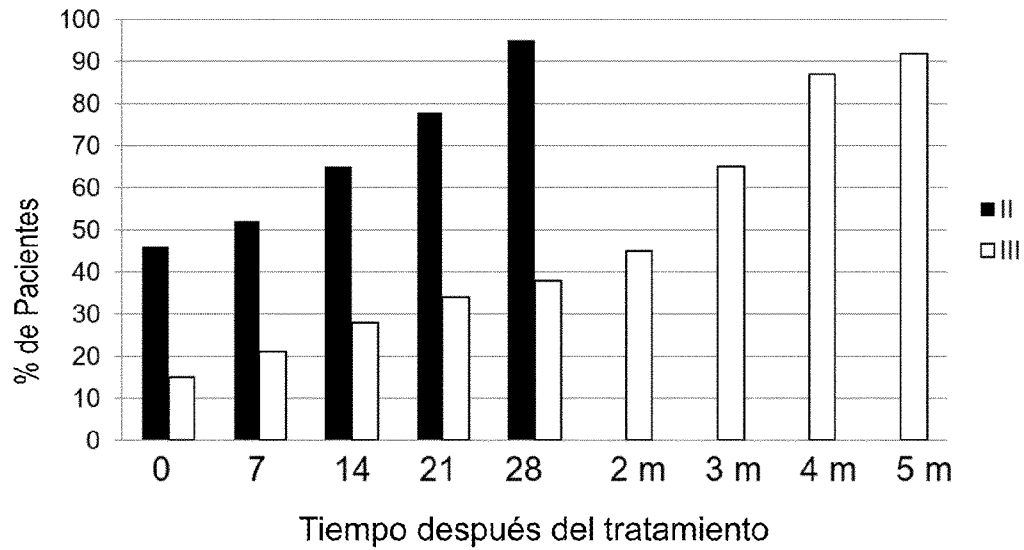


Fig. 20

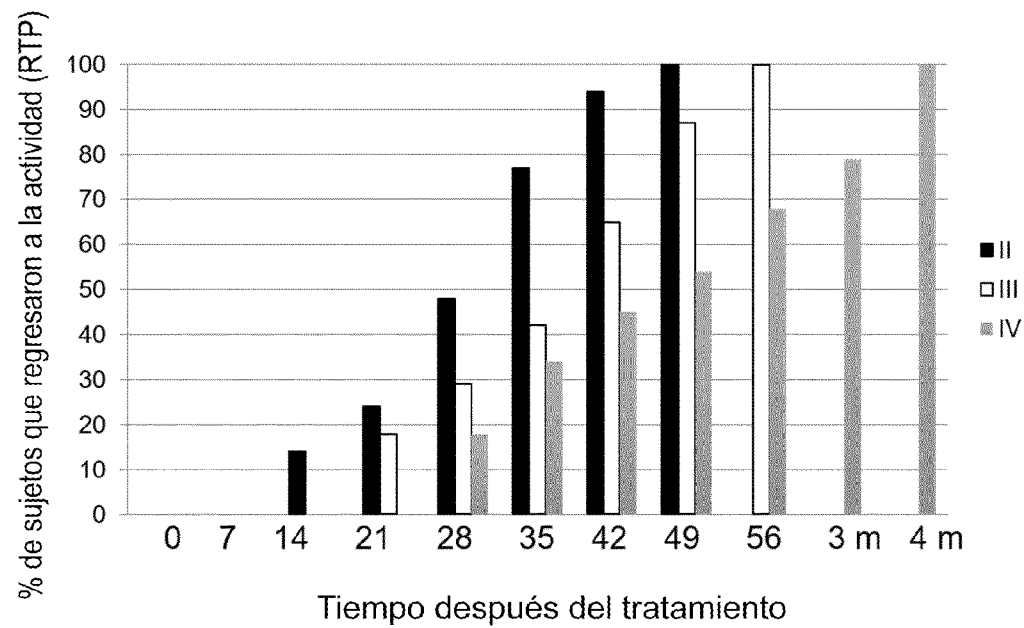


Fig. 21

