

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 923 016**

51 Int. Cl.:

A61K 35/12 (2015.01)

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 35/32 (2015.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 19/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2008 E 18190654 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2022 EP 3424514**

54 Título: **Células precursoras mesenquimales TNAP+ para el tratamiento de enfermedades del tejido conectivo**

30 Prioridad:

06.08.2007 AU 2007904212

25.06.2008 US 133111 P

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

22.09.2022

73 Titular/es:

MESOBLAST, INC. (100.0%)

505 Fifth Avenue Level 3

New York, NY 10017, US

72 Inventor/es:

GHOSH, PETER

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 923 016 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

Células precursoras mesenquimales TNAP⁺ para el tratamiento de enfermedades del tejido conectivo

5 **CAMPO TÉCNICO**

La presente descripción se refiere a las células precursoras mesenquimales (MPC) TNAP⁺, para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad derivada de la degradación y/o inflamación del tejido conectivo rico en proteoglicanos, en la que la administración de la población celular resulta en la preservación o generación de cartílago rico en proteoglicanos.

ANTECEDENTES

Las células progenitoras no hematopoyéticas que residen en el cuerpo y originan células multipotenciales cuando se aíslan se denominan células precursoras mesenquimales (MPC). Más específicamente, las MPC purificadas son capaces de formar un gran número de colonias de células multipotenciales.

Simmons et al. (1994) describen el enriquecimiento de MPC a partir de células de médula ósea recién recolectadas mediante la selección de las células que expresan el marcador de superficie celular STRO-1. Como explicaron los autores en las páginas 272-273, se sabe que las células de la médula ósea contienen una proporción de MPC que son capaces de originar CFU-F. Estas CFU-F, a su vez, son capaces de originar en condiciones adecuadas un amplio espectro de tejidos conectivos totalmente diferenciados, que incluyen cartílago, hueso, tejido adiposo, tejido fibroso y estroma mielosoportado.

Las MPC y CFU-F están normalmente presentes con una incidencia muy baja en las células de la médula ósea (normalmente entre el 0,05% y el 0,001%) y esta rareza ha sido una limitación importante para su estudio en el pasado. Un hallazgo importante discutido por Simmons et al. (1994) fue la identificación de que estas MPC se pueden enriquecer a partir de células de médula ósea recién aisladas en cierta medida mediante la selección de células STRO-1 positivas. En particular, la selección de células STRO-1 positivas permitió el aislamiento de MPC (y CFU-F resultantes) libres de progenitores hematopoyéticos contaminantes.

El documento WO 01/04268 proporcionó un avance adicional importante en el enriquecimiento de las MPC mediante la identificación de una subpoblación dentro de esta fracción de células STRO-1 positivas que contienen MPC. En particular, el documento WO 01/04268 describe la clasificación de la población de células STRO-1 positiva en tres subconjuntos: STRO-1^{apagadas}, STRO-1^{intermedias} y STRO-1^{brillantes}. Los ensayos clonogénicos para CFU-F en las diferentes subpoblaciones clasificadas demostraron que la gran mayoría de los MPC están contenidos dentro de la fracción de STRO-1^{brillante}.

El documento WO 2004/085630 describe por primera vez que las MPC están presentes en el tejido perivascular. Uno de los beneficios de este hallazgo es que expande mucho la variedad de tejidos fuente a partir de los cuales se pueden aislar o enriquecer las MPC y ya no existe una restricción efectiva sobre la fuente de las MPC en la médula ósea. Los tejidos a partir de los cuales se pueden aislar las MPC de acuerdo con los métodos descritos en el documento WO 2004/085630 incluyen médula ósea humana, pulpa dental, tejido adiposo, piel, bazo, páncreas, cerebro, riñón, hígado y corazón. Las MPC aisladas del tejido perivascular son positivas para el marcador de superficie celular 3G5. Por lo tanto, se pueden aislar mediante el enriquecimiento por células que llevan el marcador 3G5, o mediante el enriquecimiento por un marcador de superficie del desarrollo temprano presente en las células perivasculares tales como CD146 (MUC18), VCAM-1, o mediante el enriquecimiento por alto nivel de expresión de la célula marcador de superficie STRO-1.

Estudios anteriores han sugerido un posible uso terapéutico de las MPC en el tratamiento de trastornos articulares y vertebrales, tales como los documentos WO 01/80865, WO 2006/108229 y WO 2006/032092. Además, el documento US 2003/069639 divulga un método para restaurar las propiedades normales de un disco intervertebral dañado mediante la inyección, entre otros, de un material biológicamente activo, tal como las MPC, en el paciente, y Murphy et al. (2003) se refieren a las MPC implantadas y al papel potencial en la reparación o regeneración de tejidos en una articulación lesionada. Además, Radice et al. (2000) se refieren al uso de las MPC en la manipulación genética de tejidos.

Los tejidos conectivos avasculares generalmente se ubican en sitios anatómicos dentro del sistema musculoesquelético que requieren un movimiento apreciable. Estas articulaciones de movimiento libre son responsables de la mayoría de las articulaciones en los mamíferos. En las articulaciones sinoviales, las superficies de contacto de dos huesos opuestos están cubiertas por cartílagos hialinos que se deslizan sin esfuerzo uno sobre otro debido a la presencia de un lubricante de baja fricción en el líquido sinovial producido por las células que revisten la cápsula de la articulación que recubre y conecta los huesos largos. En la columna vertebral, la articulación se logra mediante la conexión de los huesos vertebrales rígidos por medio de un anillo fibrocartilaginoso flexible (el anillo fibroso) que encapsula una masa gelatinosa hidratada (el núcleo pulposo), poblada por condrocitos como células similares a las presentes en el cartílago hialino. Independientemente del tipo y la ubicación de estos tejidos conectivos

avasculares, todos contienen células que sintetizan una matriz extracelular que es rica en proteoglicanos con alta carga negativa, que absorben las moléculas de agua junto con la proteína fibrosa, colágeno de tipo II, que confiere una alta resistencia a la tracción.

5 Los tejidos conjuntivos avasculares, tales como el cartílago hialino, los dos tercios internos del menisco y el disco intervertebral tienen capacidades limitadas de reparación y, cuando están lesionados, pueden responder mediante la producción de un tejido cicatricial fibrocartilaginoso funcionalmente inferior. A través de una multitud de factores, dominados por el envejecimiento, la genética, el estado hormonal y la lesión física, estos conectores avasculares a menudo fallan, lo que lleva a los problemas clínicos generalizados de degeneración del disco, dolor de espalda y osteoartritis.

10 Las terapias médicas actuales que normalmente se usan para tratar los síntomas derivadas de la falla de estos tejidos conectivos, en mayor parte, hacen poco para corregir la patología subyacente responsable de producir los síntomas y, en muchos casos, incluso pueden exacerbar el problema mediante la regulación por disminución de la capacidad de las células residentes para sintetizar los componentes estructurales de la matriz extracelular del tejido. Idealmente, los tratamientos terapéuticos deberían ser al menos condroprotectores, e incluso proporcionar las condiciones que mejoran la biosíntesis de la matriz y efectuar la reparación y restauración de los tejidos conectivos lesionados.

COMPENDIO

20 La invención es como define en las reivindicaciones. Cualquier tema que quede fuera del ámbito de las reivindicaciones se proporciona únicamente con fines informativos.

25 Los presentes inventores actualmente han realizado el sorprendente descubrimiento de que la administración intraarticular de MPC proporciona un efecto condroprotector en las articulaciones con osteoartritis preexistente, y lleva a la generación y crecimiento del tejido cartilaginoso en las articulaciones sinoviales y en el núcleo pulposo de los discos intervertebrales. Este hallazgo indica que se pueden usar las MPC o su progenie, para proteger o reparar tejidos conectivos dañados, así como para generar nuevo tejido funcional en sitios de degeneración o lesión.

30 En consecuencia, la presente descripción proporciona células precursoras mesenquimales (MPC) TNAP⁺ (positivas a la fosfatasa alcalina no específica del tejido), para usar en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad en un sujeto derivada de la degradación y/o la inflamación del tejido conectivo, en la que la administración de la población celular da como resultado la conservación o generación de cartílago rico en proteoglicanos.

35 En una realización de la presente descripción, el tejido conectivo es cartílago, por ejemplo, cartílago hialino.

En una realización de la presente descripción, la población celular se administra a un espacio articular.

40 En una realización de la presente descripción, el espacio articular es una articulación de la rodilla, articulación del tobillo, articulación del hombro, articulación del codo, articulación de la muñeca, articulación de la mano o articulación del dedo o articulación del pie, o en una articulación del disco intervertebral.

45 En una realización de la presente descripción, la población celular se administra por inyección intraarticular. La inyección intraarticular se puede realizar en cualquier articulación del cuerpo que esté cerca de un sitio de un defecto del cartílago, o un defecto potencial del cartílago. Por ejemplo, la administración se puede realizar en un espacio articular para tratar o prevenir defectos en el cartílago de las superficies articulares de los huesos que forman esa articulación. Del mismo modo, la administración se puede realizar en el espacio de un disco intervertebral para tratar o prevenir defectos en los discos circundantes. En otro ejemplo, la administración se realiza por vía intravenosa en un lugar cercano al defecto del cartílago.

50 En una realización de la presente descripción, la población celular es para usar en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, tal como, tendinitis, dolor de espalda, degradación del tendón del manguito rotatorio, síndrome del túnel carpiano, síndrome de DeQuervain, discos cervicales y/o lumbares degenerativos, síndrome de intersección, síndrome de distrofia simpática refleja (RSDS), tenosinovitis estenosante, epicondilitis, tenosinovitis, síndrome de salida torácica, atrapamiento del nervio cubital, síndrome del túnel radial, lesión por esfuerzo repetitivo (RSI), osteoartritis, artritis reumatoide, artritis psoriásica y artritis seronegativa, artritis asociada con enfermedad inflamatoria del intestino o espondilitis anquilosante y trastornos del disco vertebral degenerativo.

60 En una realización de la presente descripción, la población celular es para usar en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad, tal como osteoartritis, artritis reumatoide, tendinitis, dolor de espalda, degeneración del tendón del manguito rotatorio, síndrome del túnel carpiano, síndrome de DeQuercain, discos cervicales y/o lumbares degenerativos, o un trastorno del disco vertebral degenerativo.

65 **[0020]** En otra realización preferida de la presente descripción, la población celular para usar como se describió anteriormente, comprende además la administración de ácido hialurónico (HA). El HA se puede administrar en la misma o diferente composición que las células, el sobrenadante y/o los factor/es.

En una realización preferida de la presente descripción, la enfermedad para tratar y/o prevenir derivada de la degradación y/o inflamación del tejido conectivo es un trastorno de disco intervertebral degenerativo y la población celular se administra a una articulación de disco intervertebral.

5 En una realización de la presente descripción, la población celular es un cultivo expandido.

En una realización de la presente descripción, la población celular es una población celular alogénica.

10 Los resultados presentados en este documento indican por primera vez que los factores solubles liberados por las MPC cultivadas implantadas son compatibles con la protección, generación y crecimiento del tejido conectivo.

En otro aspecto de la presente descripción, la presente descripción proporciona el uso de MPC TNAP⁺ en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad derivada de la degradación y/o inflamación del tejido conectivo rico en proteoglicanos.

15 La presente descripción es aplicable a una amplia variedad de animales. Por ejemplo, el sujeto puede ser un mamífero tal como ser humano, perro, gato, caballo, vaca o oveja. En una realización de la presente descripción el sujeto es un ser humano.

20 A lo largo de esta memoria descriptiva, se entenderá que la palabra "comprender", o las variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implican la inclusión de un elemento, número entero o etapa establecidos o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier número entero o etapa establecidos o grupo de elementos, números enteros o etapas,

25 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1. Medias \pm DE de las puntuaciones de morfología del cartílago femoral y tibial 12 semanas después de la menisectomía para articulaciones inyectadas con Hialuronano (HA) o HA más diferentes dosis de células precursoras (MPC).

Figura 2. Medias \pm DE de las puntuaciones de osteofitos femorales y tibiales 12 semanas después de la menisectomía para articulaciones inyectadas con Hialuronano (HA) o HA más diferentes dosis de células precursoras mesenquimales (MPC).

Figura 3. Relaciones $[HA/(MPC+HA)]$ de puntuaciones de las articulaciones por morfología de cartílago para animales inyectados con diferentes dosis de células precursoras mesenquimales (MPC). Cuando la relación = 1 ambos tratamientos son igualmente eficaces. Relaciones > 1 indican MPC+HA superior a HA.

Figura 4. Relaciones $[HA/(MPC+HA)]$ de puntuaciones de puntuaciones de osteofitos para animales inyectados con diferentes dosis de MPC + HA con respecto a HA solo. Cuando la relación = 1 ambos tratamientos son igualmente eficaces. Relaciones > 1 indican MPC+HA superior a HA.

Figura 5. Medias \pm SE de las puntuaciones de grosor regional determinado histomorfométricamente para cartílagos de articulaciones inyectadas con hialuronano (HA) o 100 millones de MPC + HA doce semanas después de la menisectomía. La combinación de todas las regiones de cartílago tibial HA + 100 millones de MPC > HA ($p < 0,05$).

Figura 6. Relaciones $[HA/(MPC+HA)]$ de medias + SE de puntuaciones histopatológicas de Mankin modificadas totales de articulaciones para animales inyectados con diferentes dosis de células precursoras mesenquimales (MPC). Cuando la relación = 1 ambos tratamientos son igualmente eficaces. Relaciones > 1 indican MPC + HA superior a HA.

Figura 7. Medias \pm DE de puntuaciones de morfología del cartílago femoral y tibial para articulaciones inyectadas con HA y HA + 100 millones de MPC 12, 24 y 52 semanas después de la menisectomía.

Figura 8. Medias \pm DE de puntuaciones de osteofitos femorales y tibiales para articulaciones inyectadas con HA y HA + 100 millones de MPC 12, 24 y 52 semanas después de la menisectomía.

Figura 9. Relaciones $[HA/(MPC+HA)]$ de puntuaciones de las articulaciones por morfología de cartílago para animales inyectados con células precursoras mesenquimales (MPC) 12, 24 y 52 semanas después de la menisectomía. Cuando la relación = 1 ambos tratamientos son igualmente eficaces. Relaciones > 1 indican MPC + HA superior a HA.

Figura 10. Relaciones $[HA/(MPC+HA)]$ de puntuaciones de articulaciones de osteofitos para animales inyectados con células precursoras mesenquimales (MPC) 12, 24 y 52 semanas después de la menisectomía. Cuando la relación = 1 ambos tratamientos son igualmente eficaces. Relaciones > 1 indican MPC + HA superior a HA.

Figura 11. Relaciones $[HA/(MPC+HA)]$ de medias \pm SE de las puntuaciones histopatológicas de Mankin modificadas

de cartílago articular para animales inyectados con células precursoras mesenquimales (MPC) 12, 24 y 52 semanas después de la meniscectomía. Cuando la relación = 1 ambos tratamientos son igualmente eficaces. Relaciones > 1 indican MPC + HA superior a HA.

5 Figura 12. Medias +/- SE de la rigidez del cartílago patelar de articulaciones inyectadas con hialuronano (HA) o HA + diferentes dosis de células precursoras mesenquimales (MPC). *=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001, ****=p<0,0001.

10 Figura 13. Medias +/- SE de la rigidez del cartílago patelar de articulaciones inyectadas con hialuronano (HA) o 100 millones de células precursoras mesenquimales (MPC) + HA y sacrificados 12, 24 y 52 semanas después de la meniscectomía. *= p<0,05, **= p<0,01, ***= p<0,001, ****= p<0,0001.

15 Figura 14. Medias +/- SE de la fase de rezago del cartílago patelar de articulaciones inyectadas con hialuronano (HA) o HA + diferentes dosis de células precursoras mesenquimales (MPC). *= p<0,05, **= p<0,01, ***= p<0,001, ****= p<0,0001.

Figura 15. Medias +/- SE de la fase de rezago del cartílago patelar de articulaciones inyectadas con hialuronano (HA) o HA + 100 millones de células precursoras mesenquimales (MPC) y sacrificados 12, 24 y 52 semanas después de la meniscectomía. *= p<0,05, **= p<0,01, ***= p<0,001, ****= p<0,0001.

20 Figura 16. Comparación de las puntuaciones de morfología del cartílago articular en ovejas macho castradas no tratadas y ovejas ovariectomizadas 12 semanas después de la meniscectomía que muestra la gravedad significativamente mayor de las lesiones de la OA en el grupo de hembras.

25 Figura 17. Comparación de las puntuaciones de osteofitos articulares en ovejas macho castradas no tratadas y ovejas ovariectomizadas 12 semanas después de la meniscectomía que muestran las puntuaciones significativamente más altas en el grupo de hembras.

30 Figura 18. Media ± DE de puntuaciones histopatológicas de Mankin modificadas de cartílago 36 semanas después de la meniscectomía de articulaciones de ovejas ovariectomizadas inyectadas con Hialuronano (HA) o HA+100 millones de células precursoras mesenquimales (MPC) 12 semanas después de la meniscectomía.

Valores P = HA versus MPC+HA. Estos resultados muestran que una inyección única de MPC reduce la puntuación histopatológica anormal del cartílago hialino femoral durante 6 meses en un grado mayor que el cartílago tibial.

35 Figura 19. Relaciones (HA/HA+MPC) de puntuaciones histopatológicas de Mankin modificadas totales de cartílago de articulaciones de ovejas ovariectomizadas 36 semanas después de la meniscectomía a las que se administran inyecciones intraarticulares 12 semanas después de la meniscectomía. Cuando la relación = 1, MPC+HA es equivalente a HA. Relación > 1, muestra que MPC+HA es más protector que HA solo. Datos = Medias ± SEM. Estos resultados muestran que una inyección única de MPC reduce la puntuación histopatológica anormal de cartílago hialino femoral durante 6 meses en un grado mayor que el cartílago tibial.

45 Figura 20. Media ± DE de puntuaciones histopatológicas de Mankin modificadas de cartílago femoral 24 y 36 semanas después de la meniscectomía (MX) de articulaciones de ovejas ovariectomizadas inyectadas con Hialuronano (HA) o 100 millones de células precursoras mesenquimales (MPC) + HA 12 semanas después de MX en comparación con las articulaciones no inyectadas a 12 semanas después de MX. Los valores P son para 12 semanas NIL versus tratamientos. Estos resultados muestran que una inyección única de MPC reduce la puntuación histopatológica anormal durante 6 meses.

50 Figura 21. Datos de histomorfometría del cartílago femoral 36 semanas después de la meniscectomía de articulaciones de ovejas ovariectomizadas inyectadas con Hialuronano (HA) o 100 millones de células precursoras mesenquimales (MPC) + HA 12 semanas después de la meniscectomía. Datos mostrados = Media + SEM. Valores P = HA vs MPC+HA. Estos resultados muestran que una inyección única de MPC genera mayor cartílago hialino durante 6 meses que el ácido hialurónico.

55 Figura 22. Media + SEM de grosor de cartílago femoral determinado histomorfométricamente de las articulaciones de ovejas hembra no tratadas sacrificadas 12 semanas después de la meniscectomía (Mx) o inyectadas con Hialuronano (HA) o células precursoras mesenquimales (MPC)+HA a 12 semanas después de Mx posteriormente sacrificadas 12 ó 24 semanas después. Datos expresados como media + SEM. Valores P con respecto a 12 semanas tratadas con NIL. Estos resultados muestran que una inyección única de MPC aumenta el grosor del cartílago hialino durante 6 meses.

65 Figura 23. Áreas del cartílago femoral determinadas histomorfométricamente de articulaciones de ovejas hembra no tratadas sacrificadas 12 semanas después de la meniscectomía (Mx) o inyectadas con Hialuronano (HA) o células precursoras mesenquimales (MPC)+HA a 12 semanas después de Mx posteriormente sacrificadas 12 ó 24 semanas después. Datos expresados como media ± SEM. Valores P con respecto a 12 semanas tratadas NIL. Estos resultados muestran que una inyección única de MPC aumenta el área del cartílago hialino durante 6 meses.

Figura 24. Densidad en escala de grises integrada determinada histomorfométricamente (IGD) como una medición del contenido de proteoglicano total (PG) de los cartílagos femorales de articulaciones de ovejas hembra no tratadas sacrificadas 12 semanas después de la meniscectomía (Mx) o inyectadas con Hialuronano (HA) o células precursoras mesenquimales (MPC)+HA a 12 semanas después de Mx posteriormente sacrificadas 12 ó 24 semanas después. Datos expresados como medias + SEM. Valores P con respecto a 12 semanas tratadas con NIL. Estos resultados muestran que una inyección única de MPC genera significativamente más cartílago que contiene proteoglicano que la inyección de ácido hialurónico durante 6 meses.

Figura 25. Representación esquemática de los niveles espinales lumbares tratados con células precursoras mesenquimales (MPC) en todos los grupos de ovejas.

Figura 26. Recuperación media en la altura del disco tres y seis meses después de la inyección de MPC y HA en el núcleo pulposo de discos de oveja degenerados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier realización de la presente descripción no esté comprendida en el alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención

Técnicas generales y definiciones seleccionadas

A menos que se defina específicamente de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente se deben entender con el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la técnica (por ejemplo, en cultivos celulares, biología de células madre, genética molecular, inmunología, inmunohistoquímica, química de proteínas y bioquímica).

A menos que se indique lo contrario, las técnicas de proteína recombinante, cultivo celular e inmunológicas utilizadas en la presente descripción son procedimientos estándar, bien conocidos por los expertos en la materia. Dichas técnicas se describen y explican en toda la bibliografía en fuentes tales como, J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editores), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996), y F.M. Ausubel et al. (editores), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, que incluyen todas las actualizaciones hasta el presente), Ed Harlow and David Lane (editores) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), y J.E. Coligan *et al.* (editores) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (que incluyen todas las actualizaciones hasta el presente).

Como se usa en la presente, las expresiones "que trata", "tratar" o "tratamiento" incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células como se define en la presente, suficiente para reducir o eliminar al menos un síntoma de la afección especificada.

Como se usa en la presente, las expresiones "que previene", "prevenir" o "prevención" incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células como se define en la presente, suficiente para detener o impedir el desarrollo de al menos un síntoma de la afección especificada.

Como se usa en la presente, la expresión "derivado de células precursoras mesenquimales" se refiere a sobrenadante y/o uno o más factores solubles, producidos a partir del cultivo in vitro de células precursoras mesenquimales y/o células de su progenie.

Como se usa en la presente, el término "sobrenadante" se refiere al material no celular producido después del cultivo in vitro de células precursoras mesenquimales y/o células de su progenie, en un medio adecuado, con preferencia medio líquido. Normalmente, el sobrenadante se produce mediante el cultivo de las células en el medio en condiciones y tiempo adecuados, seguido de la eliminación del material celular mediante un proceso tal como centrifugación.

Como se usa en la presente, la expresión "uno o más factores solubles" se refiere a las moléculas, normalmente proteínas, secretadas por las MPC, y/o las células de su progenie, durante el cultivo.

Células precursoras mesenquimales (MPCs) o células de progenie.

Como se usa en la presente, "MPC" son células progenitoras STRO-1⁺ no hematopoyéticas que son capaces de formar grandes cantidades de colonias de células multipotenciales.

Las células precursoras mesenquimales (MPC) son células que se encuentran en la médula ósea, sangre, células de la pulpa dental, tejido adiposo, piel, bazo, páncreas, cerebro, riñón, hígado, corazón, retina, cerebro, folículos pilosos,

intestino, pulmón, ganglios linfáticos, timo, hueso, ligamento, tendón, músculo esquelético, dermis y periostio; y son capaces de diferenciarse en distintas líneas germinales tales como mesodermo, endodermo y ectodermo. Por lo tanto, las MPC son capaces de diferenciarse en un gran número de tipos de células que incluyen, pero sin limitación, tejidos conectivos adiposo, óseo, cartilaginoso, elástico, muscular y fibroso. La vía específica de compromiso y diferenciación de linaje en la que entran estas células depende de varias influencias de influencias mecánicas y/o factores bioactivos endógenos, tales como factores de crecimiento, citoquinas y/o condiciones microambientales locales establecidas por los tejidos del huésped. Las células precursoras mesenquimales, por lo tanto, son células progenitoras no hematopoyéticas que se dividen para producir células hijas que son células madre o células precursoras que, con el tiempo, se diferenciarán irreversiblemente para producir una célula fenotípica.

En una realización preferida de la presente descripción, las MPC se enriquecen a partir de una muestra obtenida de un sujeto. Los términos 'enriquecido', 'enriquecimiento' o variaciones de estos se usan en la presente para describir una población de células en las que la proporción de un tipo de célula particular o la proporción de un número de tipos de células particulares aumenta cuando se compara con la población no tratada.

Las células de la presente descripción son MPC TNAP⁺.

En una realización preferida de la presente descripción, las células usadas en la presente descripción también son VCAM-1⁺, THY-1⁺, STRO-2⁺, CD45⁺, CD146⁺, 3G5⁺ o cualquiera de sus combinaciones. Con preferencia, las células STRO-1⁺ son STRO-1^{brillantes}. Con preferencia, las células STRO-1^{brillantes} son adicionalmente una o más de VCAM-1⁺, THY-1⁺, STRO-2⁺ y/o CD146⁺.

En una realización de la presente descripción, las células precursoras mesenquimales son células precursoras mesenquimales perivasculares como se define en el documento WO 2004/85630.

Cuando los autores se refieren a una célula como "positiva" para un marcador dado, puede ser un expresador bajo (bajo o débil) o alto (brillante, bri) de ese marcador, de acuerdo con el grado en el que esté presente el marcador en la superficie celular, donde los términos se relacionan con la intensidad de la fluorescencia u otro color utilizado en el proceso de clasificación de color de las células. La distinción de bajo (o tenue o apagado) y bri se entenderá en el contexto del marcador utilizado en una población celular particular que se está clasificando. En la presente cuando se hace referencia a una célula como "negativa" para un marcador dado, no significa que esa célula no expresa el marcador en absoluto. Significa que el marcador se expresa en un nivel relativamente muy bajo en esa célula, y que genera una señal muy baja cuando se marca de forma detectable.

El término "brillante", cuando se usa en la presente, se refiere a un marcador en la superficie celular que genera una señal relativamente alta cuando se marca en forma detectable. Si bien no se desea estar limitado por la teoría, se propone que las células "brillantes" expresen más de la proteína marcadora blanco (por ejemplo, el antígeno reconocido por STRO-1) que otras células en la muestra. Por ejemplo, las células STRO-1^{bri} producen una mayor señal fluorescente, cuando se marcan con un anticuerpo STRO-1 conjugado con FITC según lo determinado por el análisis FACS, que las células no brillantes (STRO-1^{apagada/tenue}). Con preferencia, las células "brillantes" constituyen al menos aproximadamente el 0,1% de las células mononucleares de la médula ósea marcadas de manera más brillante contenidas en la muestra inicial. En otras realizaciones de la presente descripción, las células "brillantes" constituyen al menos aproximadamente el 0,1%, al menos aproximadamente el 0,5%, al menos aproximadamente el 1%, al menos aproximadamente el 1,5%, o al menos aproximadamente el 2%, de las células mononucleares de la médula ósea marcadas de manera más brillante contenidas en la muestra inicial. En una realización preferida, las células STRO-1^{brillantes} tienen una expresión mayor de 2 log de magnitud que la expresión superficial de STRO-1. Esto se calcula en relación con el "fondo", es decir, las células que son STRO-1⁻. En comparación, las células STRO-1^{apagadas} y/o STRO-1^{intermedias} tienen una expresión de menos de 2 log de magnitud de mayor expresión superficial de STRO-1, normalmente aproximadamente de 1 log o menor que el "fondo".

Cuando se usa en la presente, el término "TNAP" se considera que abarca todas las isoformas de fosfatasa alcalina no específica de tejido. Por ejemplo, el término abarca la isoforma hepática (LAP), la isoforma ósea (BAP) y la isoforma renal (KAP). En una realización preferida de la presente descripción, la TNAP es BAP. En una realización particularmente preferida, TNAP como se usa en la presente se refiere a una molécula que se puede unir al anticuerpo STRO-3 producido por la línea celular de hibridoma depositada en ATCC el 19 de diciembre de 2005 según las disposiciones del Tratado de Budapest bajo el número de acceso de depósito PTA -7282.

Además, en una realización preferida de la presente descripción, las MPC son capaces de originar CFU-F clonogénico.

Se prefiere que una proporción significativa de las células multipotenciales sean capaces de diferenciarse en al menos dos líneas germinales diferentes. Los ejemplos no limitantes de los linajes a los que pueden comprometer las células multipotenciales incluyen células precursoras óseas; progenitores de hepatocitos, que son multipotentes para las células epiteliales del conducto biliar y los hepatocitos; células neuronales restringidas, que pueden generar precursores de células gliales que progresan a oligodendrocitos y astrocitos; precursores neuronales que progresan a neuronas; precursores para el músculo cardíaco y los cardiomiocitos, líneas de células beta pancreáticas secretoras de insulina sensibles a la glucosa. Otros linajes incluyen, pero sin limitación, odontoblastos, células productoras de

dentina y condrocitos, y células precursoras de las siguientes: células epiteliales pigmentarias de la retina, fibroblastos, células de la piel tales como queratinocitos, células dendríticas, células del folículo piloso, células epiteliales del conducto renal, células de músculo liso y esquelético, progenitoras testiculares, células endoteliales vasculares, tendones, ligamentos, cartílagos, adipocitos, fibroblastos, estroma medular, músculo cardíaco, músculo liso, músculo esquelético, pericitos, vasculares, epiteliales, gliales, neuronales, astrocitos y oligodendrocitos.

En otra realización de la presente descripción, las MPC no son capaces de originar, después de cultivar, células hematopoyéticas.

Las células expandidas de la invención pueden tener una amplia variedad de fenotipos que dependen de las condiciones de cultivo (que incluyen el número y/o tipo de factores estimulantes en el medio de cultivo), el número de pasajes, y similares. En ciertas realizaciones de la presente descripción, las células de la progenie se obtienen después de aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, o aproximadamente 10 pasajes de la población progenitora. Sin embargo, las células de la progenie se pueden obtener después de cualquier número de pasajes de la población progenitora.

Las células de la progenie se pueden obtener mediante el cultivo en cualquier medio adecuado. El término "medio", como se usa en referencia a un cultivo celular, incluye los componentes del ambiente que rodea a las células. Los medios pueden ser sólidos, líquidos, gaseosos o una mezcla de fases y materiales. Los medios incluyen medios de cultivo líquidos, así como medios líquidos que no sostienen el crecimiento celular. Los medios también incluyen medios gelatinosos tales como agar, agarosa, gelatina y matrices de colágeno. Los ejemplos de medios gaseosos incluyen la fase gaseosa a la que están expuestas las células que crecen en una placa de Petri u otro soporte sólido o semisólido. El término "medio" también se refiere al material que se destina al uso en un cultivo celular, incluso si aún no se ha puesto en contacto con las células. En otras palabras, un líquido rico en nutrientes preparado para el cultivo bacteriano es un medio. De manera similar, una mezcla en polvo que, cuando se mezcla con agua u otro líquido, se vuelve adecuada para el cultivo celular, se puede denominar "medio en polvo".

En una realización de la presente descripción, las células de progenie útiles para los métodos de la invención se obtienen mediante el aislamiento de TNAP⁺ MPC de la médula ósea usando perlas magnéticas marcadas con el anticuerpo STRO-3, y luego se cultivan expandiendo las células aisladas (ver Gronthos et al. (1995) para un ejemplo de condiciones de cultivo adecuadas).

En una realización de la presente descripción, dichas células expandidas (progenie) (al menos después de 5 pasajes) pueden ser CC9⁺, HLA clase I⁺, HLA clase II⁻, CD14⁻, CD19⁻, CD3⁻, CD11a-c⁻, CD31⁻, CD86⁻, CD34⁻ y/o CD80⁻. Sin embargo, es posible que en diferentes condiciones de cultivo a las descritas en la presente la expresión de diferentes marcadores pueda variar. Además, si bien las células de estos fenotipos pueden predominar en la población celular expandida, no significa que exista una proporción menor de las células que no tienen este fenotipo (por ejemplo, un pequeño porcentaje de las células expandidas pueden ser CC9⁻). En una realización preferida de la presente descripción, las células expandidas todavía tienen la capacidad de diferenciarse en diferentes tipos de células.

En una realización de la presente descripción, una población celular expandida comprende células en las que al menos el 25%, con más preferencia al menos el 50% de las células son CC9⁺.

En otra realización de la presente descripción, una población celular expandida, comprende células en las que al menos el 40%, con preferencia al menos 45%, de las células son STRO-1⁺.

En una realización adicional de la presente descripción, las células expandidas pueden expresar marcadores seleccionados del grupo que consiste en LFA-3, THY-1, VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, P-selectina, L-selectina, 3G5, CD49a/CD49b/CD29, CD49c/CD29, CD49d/CD29, CD 90, CD29, CD18, CD61, integrina beta, 6-19, trombomodulina, CD10, CD13, SCF, PDGF-R, EGF-R, IGF1-R, NGF-R, FGF-R, Leptina-R, (STRO-2 = Leptina-R), RANKL, STRO-1^{brillante} y CD146 o cualquier combinación de estos marcadores.

En una realización de la presente descripción, las células de la progenie son progenie de MPC expandida multipotencial (MEMP) como se define en el documento WO 2006/032092. Los métodos para preparar poblaciones enriquecidas de MPC a partir de las cuales se puede derivar la progenie se describen en los documentos WO 01/04268 y WO 2004/085630. En un contexto in vitro, las MPC rara vez estarán presentes como una preparación absolutamente pura y generalmente estarán presentes con otras células que son células comprometidas específicas de tejido (TSCC). El documento WO 01/04268 se refiere a la recolección de dichas células de la médula ósea a niveles de pureza de aproximadamente el 0,1% al 90%. La población que comprende MPC de la cual se deriva la progenie se puede recolectar directamente de una fuente de tejido, o alternativamente, puede ser una población que ya se ha expandido ex vivo.

Por ejemplo, la progenie se puede obtener de una población recolectada, no expandida, de MPC sustancialmente purificada, que comprende al menos aproximadamente el 0,1, 1,5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 95% de células totales de la población en la que están presentes.

- Las MEMPS se pueden distinguir de las MPC recién recolectadas en que son positivas para el marcador STRO-1^{bri} y negativas para el marcador de fosfatasa alcalina (ALP). Por el contrario, las MPC recién aisladas son positivas tanto para STRO-1^{bri} como para ALP. En una realización preferida de la presente descripción, al menos el 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de las células administradas tienen el fenotipo STRO-1^{bri}, ALP⁻. En una realización preferida adicional de la presente descripción, las MEMPS son positivas para uno o más de los marcadores Ki67, CD44 y/o CD49c/CD29, VLA-3, $\alpha\beta 1$. En otra realización preferida de la presente descripción, las MEMPS no muestran actividad TERT y/o son negativas para el marcador CD18.
- La población inicial de MPC se puede derivar de uno o más tipos de tejidos expuestos en los documentos WO 01/04268 o WO 2004/085630, a saber, médula ósea, células de pulpa dental, tejido adiposo y piel, o quizás más ampliamente a partir de tejido adiposo, dientes, pulpa dental, piel, hígado, riñón, corazón, retina, cerebro, folículos pilosos, intestino, pulmón, bazo, ganglio linfático, timo, páncreas, hueso, ligamento, médula ósea, tendón y músculo esquelético.
- Se entenderá que, al realizar la presente descripción, la separación de células que llevan cualquier marcador de superficie celular dado se puede efectuar mediante una serie de métodos diferentes, sin embargo, los métodos preferidos se basan en la unión de un agente de unión al marcador de interés, seguido de una separación de los que exhiben unión, ya sea una unión de alto nivel o una unión de bajo nivel o ninguna unión. Los agentes de unión más convenientes son anticuerpos o moléculas a base de anticuerpos, con preferencia son anticuerpos monoclonales o a base de anticuerpos monoclonales debido a la especificidad de estos últimos agentes. Los anticuerpos pueden usarse para ambas etapas, sin embargo, también se podrían utilizar otros agentes, por lo tanto, también se pueden emplear ligandos para estos marcadores para enriquecer las células que los portan o que carecen de ellos.
- Los anticuerpos o ligandos pueden unirse a un soporte sólido para permitir una separación bruta. Las técnicas de separación preferiblemente maximizan la conservación de la viabilidad de la fracción por recolectar. Se pueden emplear diversas técnicas de diferente eficacia para obtener separaciones relativamente crudas. La técnica particular empleada dependerá de la eficiencia de la separación, la citotoxicidad asociada, la facilidad y velocidad del rendimiento y la necesidad de equipos sofisticados y/o habilidades técnicas. Los procedimientos para la separación pueden incluir, pero sin limitación, la separación magnética, el uso de perlas magnéticas recubiertas con el anticuerpo, la cromatografía por afinidad y el "panning" con el anticuerpo unido a una matriz sólida. Las técnicas que proporcionan una separación precisa incluyen, sin limitación, FACS.
- Se prefiere que el método para aislar MPC, por ejemplo, comprenda una primera etapa que sea una etapa de clasificación en fase sólida que utilice, por ejemplo, MACS que reconoce la expresión de alto nivel del STRO-1. Luego se puede continuar con una segunda etapa de clasificación, si así se desea, para obtener un mayor nivel de expresión de células precursoras como se describe en la memoria descriptiva de la patente WO 01/14268. Esta segunda etapa de clasificación podría implicar la utilización de dos o más marcadores.
- El método para obtener MPC también puede incluir la recolección de una fuente celular antes de la primera etapa de enriquecimiento utilizando técnicas conocidas. Por lo tanto, el tejido se extirpará quirúrgicamente. Las células que comprenden el tejido de origen se separarán seguidamente en una llamada suspensión de células individuales. Esta separación puede lograrse mediante medios físicos y/o enzimáticos.
- Una vez que se ha obtenido una población de MPC adecuada, se la puede cultivar o expandir por cualquier medio adecuado para obtener MEMPS.
- En una realización de la presente descripción, las células para usar como se describe en la presente se toman del sujeto que se va a tratar, se cultivan *in vitro* utilizando técnicas estándar y se usan para obtener o células expandidas para administrar al sujeto como una composición autóloga o alogénica.
- La presente descripción se puede implementarse utilizando células de cualquier especie animal no humana, incluidas sin limitación, células de primates no humanos, células de animales ungulados, caninos, felinos, lagomorfos, de roedores, de aves y de peces. Las células de primate con las que se puede realizar presente descripción células de chimpancés, babuinos, monos cynomolgus y cualquier otro mono del Nuevo o Viejo Mundo. Las células de ungulados con las que se puede realizar la presente descripción, células de bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, equinos, búfalos y bisontes. Las células de roedor con las que se puede llevar a cabo la presente descripción incluyen, células de ratón, rata, cobayo, hámster y jerbo. Los ejemplos de especies lagomorfas con las que se puede realizar la presente descripción incluyen conejos domesticados, conejos silvestres, liebres, colas de algodón, conejos de raquetas de nieve y pikas. Los pollos (*Gallus gallus*) son un ejemplo de una especie aviar con la que se puede practicar la presente descripción.
- Las células para usar de acuerdo con la presente descripción se pueden almacenar antes de su utilización. Los métodos y protocolos para conservar y almacenar células de eucariotas, y en particular células de mamíferos, son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Pollard, J. W. and Walker, J. M. (1997) Basic Cell Culture Protocols, Second Edition, Humana Press, Totowa, N.J.; Freshney, R. I. (2000) Culture of Animal Cells, Fourth Edition, Wiley-

Liss, Hoboken, N.J.). Cualquier método que mantenga la actividad biológica de las células madre aisladas, tales como las células madre/progenitoras mesenquimales, o su progenie, puede utilizarse en relación con la presente descripción. En una realización preferida de la presente descripción, las células para su uso según la presente descripción se mantienen y almacenan mediante el uso de la criopreservación.

5

Administración y composiciones

Composiciones celulares

10 En una realización de la presente descripción MPC TNAP⁺ para usar como se describen en la presente se administran como células no diferenciadas, es decir, tal como se cultivan en medio de cultivo. Como alternativa, MPC TNAP⁺ para usar como se describen en la presente se pueden administrar después de su cultivo.

15 Las MPC TNAP⁺ para usar de acuerdo con la descripción se pueden administrar solas o como mezclas con otras células. Las células que pueden administrarse junto con las MPC TNAP⁺ de la presente descripción incluyen otras células o condrocitos multipotentes o pluripotentes, condroblastos, osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, células de revestimiento óseo, células madre o células de médula ósea. Las células de diferentes tipos pueden mezclarse con MPC TNAP⁺ de la presente descripción inmediatamente o poco antes de su administración, o pueden cultivarse conjuntamente durante un período de tiempo previo a su administración.

20

En algunas formas de realización, puede ser innecesario o indeseable inmunosuprimir a un paciente antes de iniciar la terapia con MPC TNAP⁺. Por consiguiente, el trasplante con MPC TNAP⁺ alogénicas, o incluso xenogénicas, o con su progenie, puede ser tolerado en algunos casos.

25 Sin embargo, en otros casos, puede ser deseable o apropiado inmunodeprimir farmacológicamente a un paciente antes de iniciar la terapia celular. Esto se puede lograr mediante el uso de agentes inmunosupresores sistémicos o locales, o se puede lograr suministrando las células en un dispositivo encapsulado. Las células se pueden encapsular en una cápsula que es permeable a los nutrientes y al oxígeno requeridos por la célula y los factores terapéuticos que la célula es todavía impermeable a los factores inmunes humorales y las células. Es preferible que el material encapsulante sea hipoalergénico, esté situado de manera fácil y estable en un tejido diana y que proporciona una protección adicional a la estructura implantada. Estos medios, y otros, para reducir o eliminar una respuesta inmune a las células trasplantadas son conocidos en la técnica. Como alternativa, las células pueden modificarse genéticamente para reducir su inmunogenicidad.

Generalidades

En la presente, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es efectiva, a las dosificaciones y durante los intervalos de tiempo necesarios, para lograr el efecto deseado.

40 La expresión "eficaz desde el punto de vista preventivo" se refiere a una cantidad que es eficaz, en las dosificaciones y durante los intervalos de tiempo necesarios, para lograr el efecto preventivo deseado, tales como la prevención o inhibición de la apoptosis celular o de un daño en los tejidos.

45 La cantidad de MPC TNAP⁺ de su progenie, por administrar para usar como se describe en la presente, puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Puede ser ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidades de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La expresión "forma de unidad de dosificación" como se usa en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos por tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

50 Debe comprenderse que MPC TNAP⁺ o su progenie para usar como se describe en la presente, pueden administrarse en la forma de una composición que comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptables.

60 Tal como se usa en la presente, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" o "excipiente" incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles. En una realización de la presente descripción, el vehículo es adecuado para la administración parenteral. Como alternativa, el vehículo puede ser adecuado para su administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, sublingual u oral. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. También es posible incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones.

65

Normalmente, las composiciones terapéuticas deberían ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada. El vehículo puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de ellos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño requerido para las partículas en el caso de la dispersión y mediante el uso de agentes tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio, en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Además, el factor estimulante puede administrarse en una formulación de liberación prolongada, por ejemplo, en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Los compuestos activos se pueden preparar con vehículos que protegerán el compuesto contra su liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluidos los implantes y los sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y copolímeros polilácticos, poliglicólicos (PLG). Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica.

Las células para usar como se describe en la presente pueden administrarse en combinación con una matriz apropiada, por ejemplo, para proporcionar una liberación lenta de los factores solubles.

La elección del material de la matriz se basa en la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, las propiedades mecánicas, el aspecto cosmético y las propiedades de la interfaz. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser biodegradables y químicamente definidas como sulfato de calcio, fosfato tricálcico, hidroxiapatita, ácido poliláctico y polianhidridos. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tales como el colágeno óseo o dérmico. Otras matrices están compuestas de proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras matrices potenciales no son biodegradables y se definen químicamente, como la hidroxiapatita sinterizada, el bioglass, los aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden comprender combinaciones de cualquiera de los tipos de materiales mencionados con anterioridad, tales como el ácido poliláctico y la hidroxiapatita o el colágeno y el fosfato tricálcico. Los biocerámicos se pueden alterar en su composición, como en el aluminato-fosfato de calcio y en su procesamiento para alterar el tamaño de los poros, el tamaño de las partículas, la forma de las partículas y la biodegradabilidad.

Las MPC TNAP⁺ o su progenie para usar como se describe en la presente, pueden implantarse, inyectarse, administrarse (por ejemplo, mediante un catéter o jeringa) quirúrgicamente, o administrarse de otro modo directa o indirectamente al sitio que necesita reparación o aumento.

En algunas formas de realización de la presente descripción, la formulación comprende un gel polimerizable *in situ*, como se describe, por ejemplo, en el documento US 2002/0022676, Anseth *et al.*, (2002) y Wang *et al.* (2003).

En algunas formas de realización de la presente descripción, los polímeros son al menos parcialmente solubles en soluciones acuosas, tales como agua, soluciones salinas tamponadas, o soluciones acuosas de alcohol, que tienen grupos laterales cargados, o una sal iónica monovalente de ellos. Los ejemplos de polímeros con grupos laterales ácidos que pueden hacerse reaccionar con cationes incluyen los poli(fosfacenos), ácidos poliacrílicos, ácidos poli(metacrílicos), copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, poli(acetato de vinilo) y polímeros sulfonados, tales como el poliestireno sulfonado. También se pueden usar copolímeros que tienen grupos laterales ácidos formados por reacción de ácido acrílico o metacrílico y monómeros o polímeros de éter vinílico. Los ejemplos de grupos ácidos son grupos de ácido carboxílico, grupos de ácido sulfónico, grupos de alcohol halogenado (preferiblemente fluorados), grupos OH fenólicos y grupos OH ácidos.

Los ejemplos de polímeros con grupos laterales básicos que pueden hacerse reaccionar con aniones incluyen las poli(vinilaminas), poli(vinilpiridina), poli(vinilimidazol) y algunos polifosfacenos sustituidos con imino. La sal de amonio o cuaternaria de los polímeros también se puede formar a partir de los nitrógenos de la estructura básica o de grupos imino pendientes. Ejemplos de grupos laterales básicos incluyen los grupos amino e imino.

El alginato se puede entrecruzar iónicamente con cationes divalentes, en agua, a temperatura ambiente, para formar una matriz de hidrogel. Debido a estas condiciones moderadas, el alginato ha sido el polímero más comúnmente utilizado para la encapsulación de células de hibridomas, como se describe, por ejemplo, en el documento US 4.352.883. En el proceso descrito en el documento US 4.352.883, una solución acuosa que contiene los materiales biológicos que se van a encapsular se suspende en una solución de un polímero soluble en agua, la suspensión se forma en gotas que se configuran en microcápsulas discretas por contacto con cationes multivalentes, seguidamente la superficie de las microcápsulas se reticula con poliaminoácidos para formar una membrana semipermeable alrededor de los materiales encapsulados.

Los polifosfacenos son polímeros con estructuras básicas que consisten en nitrógeno y fósforo separados por enlaces simples y dobles alternados. Cada átomo de fósforo está unido covalentemente a dos cadenas laterales.

Los polifosfacenos adecuados para la reticulación tienen una mayoría de grupos de cadena lateral que son ácidos y capaces de formar puentes salinos con cationes di- o trivalentes. Los ejemplos de grupos laterales ácidos preferidos comprenden ácido carboxílico y grupos de ácido sulfónico. Los polifosfacenos hidrolíticamente estables están formados por monómeros que tienen grupos laterales de ácido carboxílico que están reticulados por cationes divalentes o trivalentes, tales como Ca^{2+} o Al^{3+} . Se pueden sintetizar polímeros que se degradan por hidrólisis incorporando monómeros que tienen grupos laterales de imidazol, éster de aminoácido o glicerol. Por ejemplo, se puede sintetizar un poli[bis(carboxilato-fenoxi)]fosfaceno polianiónico (PCPP), que se reticula con cationes multivalentes disueltos en medios acuosos a temperatura ambiente o inferior para formar matrices de hidrogel.

Los polifosfacenos biodegradables tienen al menos dos tipos diferentes de cadenas laterales, grupos laterales ácidos capaces de formar puentes salinos con cationes multivalentes y grupos laterales que se hidrolizan en condiciones *in vivo*, por ejemplo, grupos imidazol, ésteres de aminoácidos, glicerol y glucosilo.

La hidrólisis de la cadena lateral da como resultado la erosión del polímero. Los ejemplos de cadenas laterales hidrolizantes comprenden imidazoles sustituidos y no sustituidos y los ésteres de aminoácidos en los que el grupo está unido al átomo de fósforo a través de un enlace amino (polímeros de polifosfaceno en los que ambos grupos R están unidos de esta manera se conocen como poliaminofosfacenos). Para los poliimidazoefosfacenos, algunos de los grupos "R" en la estructura del polifosfaceno son anillos de imidazol, unidos al fósforo en el esqueleto a través de un átomo de nitrógeno del anillo. Otros grupos "R" pueden ser residuos orgánicos que no participan en la hidrólisis, tales como los grupos metilfenoxi u otros grupos que se muestran en el artículo científico de Allcock *et al.* (1977). Los métodos para la síntesis de los materiales de hidrogel, así como los métodos para preparar tales hidrogeles, son conocidos en la técnica.

Las MPC TNAP⁺ o su progenie para usar como se describe en la presente pueden administrarse junto con otros fármacos o moléculas biológicas beneficiosas (factores de crecimiento, factores tróficos). Cuando se administran junto con otros agentes, pueden administrarse juntos en una única composición farmacéutica, o en composiciones farmacéuticas separadas, de manera simultánea o secuencial con los otros agentes (ya sea antes o después de la administración de los otros agentes). Los factores bioactivos que pueden administrarse conjuntamente incluyen agentes antiapoptóticos (por ejemplo, EPO, el mimeticuerpo EPO, TPO, IGF-I e IGF-II, HGF, inhibidores de caspasa); agentes antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS y NSAID (fármacos antiinflamatorios no esteroides; por ejemplo, TEPOXALINA, TOLMETINA, SUPROFENO); agentes inmunosupresores/inmunomoduladores (por ejemplo, inhibidores de la calcineurina, como la ciclosporina, tacrolimus; inhibidores de mTOR (por ejemplo, SIROLIMUS, EVEROLIMUS); agentes antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, micofenolato mofetilo); corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos como los anticuerpos monoclonales anti-IL-2Ralpha (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales anti-células T (por ejemplo, globulina antitimocítica (ATG); globulina antilinfocítica (ALG); anticuerpo anticélulas T OKT3 monoclonales); agentes antitrombogénicos (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, uroquinasa, PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona), compuestos de antitrombina, antagonistas de los receptores plaquetarios, anticuerpos antitrombina, anticuerpos del receptor antiplaquetario, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de la prostaglandina e inhibidores plaquetarios); y antioxidantes (por ejemplo, probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína), así como anestésicos locales. Como otro ejemplo, MPC TNAP⁺ o su progenie para usar como se describe en la presente se pueden administrar con factor inhibidor de cicatrices como se describe en el documento US 5.827.735.

Cuando se trata y/o previene una enfermedad derivada de la degradación y/o inflamación del tejido conectivo, se prefiere que ñas MPC TNAP⁺ o su progenie para usar como se describe en la presente se administren con agentes condoprotectores. Los ejemplos incluyen, sin limitación, polisulfato de pentosano (SP54 y Cartrophen), éster de polisulfato de glicosaminoglicano (Arteparon), complejo de glicina-glicano-péptido (Rumalon) y ácido hialurónico (Hyalgan). Verbruggen (2005) y Richette and Bardin (2004) describen otros ejemplos. En una realización preferida de la presente descripción, el agente condoprotector es ácido hialurónico.

Cola de fibrina

Las colas de fibrina son una clase de selladores quirúrgicos que se han utilizado en varios entornos clínicos.

Cuando se usa en la presente, la expresión "cola de fibrina" se refiere a la matriz insoluble formada por la reticulación de polímeros de fibrina en presencia de iones calcio. La cola de fibrina puede formarse a partir de fibrinógeno, o de un derivado o metabolito del mismo, fibrina (monómeros o polímeros solubles) y/o sus complejos derivados de tejido biológico o fluido que forma una matriz de fibrina. Como alternativa, la cola de fibrina puede formarse a partir de fibrinógeno, o de un derivado o metabolito del mismo, o de la fibrina, producida por tecnología de ADN recombinante.

La cola de fibrina también puede formarse por la interacción de fibrinógeno y un catalizador de la formación de cola de fibrina (como la trombina y/o el factor XIII). Como apreciarán los expertos en la técnica, el fibrinógeno se escinde proteolíticamente en presencia de un catalizador (tal como trombina) y se convierte en un monómero de fibrina. Los

monómeros de fibrina pueden formar polímeros que pueden reticularse para formar una matriz de cola de fibrina. La reticulación de los polímeros de fibrina puede mejorarse por la presencia de un catalizador tal como el factor XIII. El catalizador de la formación de cola de fibrina puede derivarse de plasma sanguíneo, crioprecipitado u otras fracciones de plasma que contienen fibrinógeno o trombina. Como alternativa, el catalizador puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante.

La velocidad a la que se forma el coágulo depende de la concentración de trombina mezclada con fibrinógeno. Por ser una reacción dependiente de la enzima, cuanto más alta sea la temperatura (hasta 37 °C) más rápida será la velocidad de formación de coágulos. La resistencia a la tracción del coágulo depende de la concentración de fibrinógeno utilizado.

El uso de cola de fibrina y los métodos para su preparación y uso han sido descritos por Hirsh et al. en la patente US N.º 5.643.192. Hirsh divulga la extracción de fibrinógeno y de componentes de trombina de un solo donante, y la combinación de solamente estos componentes para su uso como cola de fibrina. Marx, patente US N.º 5.651.982, describe otra preparación y método de uso para la cola de fibrina. Marx proporciona una cola de fibrina con liposomas para usar como un sellador tópico en mamíferos. La preparación y el uso de un complejo de fibrinógeno tópico (TFC) para la cicatrización de heridas se conocen en el campo. La publicación de patente internacional WO 96/17633, de la Cruz Roja Americana, describe las preparaciones de TFC que contienen fibrinógeno, trombina y cloruro de calcio.

Varias publicaciones describen el uso de colas de fibrina para la administración de agentes terapéuticos. Por ejemplo, la patente US N.º 4.983.393 divulga una composición para uso como un inserto intravaginal que comprende agarosa, agar, glicosaminoglicanos de solución salina, colágeno, fibrina y una enzima. Además, la patente US N.º 3.089.815 describe una preparación farmacéutica inyectable compuesta de fibrinógeno y trombina y la patente US N.º 6.468.527 divulga una cola de fibrina que facilita el suministro de diversos agentes biológicos y no biológicos a sitios específicos dentro del cuerpo.

Producción de células genéticamente modificadas

En una realización de la presente descripción, las células para usar como se describe en la presente están modificadas genéticamente. Es preferible que las células se modifiquen genéticamente para producir una proteína heteróloga. Normalmente, las células se modificarán genéticamente de tal manera que la proteína heteróloga se secrete de las células. Sin embargo, en una realización de la presente descripción, las células pueden modificarse para expresar un polinucleótido funcional que no codifica proteínas, como el ARNs (normalmente para el silenciamiento de ARN), un oligonucleótido antisentido o un ácido nucleico catalítico (como una ribozima o ADNzima).

Las células modificadas genéticamente pueden cultivarse en presencia de al menos una citoquina en una cantidad suficiente para soportar el crecimiento de las células modificadas. Las células modificadas genéticamente así obtenidas pueden usarse de inmediato (por ejemplo, en un trasplante), cultivarse y expandirse *in vitro*, o almacenarse para usos posteriores. Las células modificadas pueden almacenarse por medio de métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, congelados en nitrógeno líquido.

La modificación genética utilizada en la presente abarca cualquier método de modificación genético que implique la introducción de un polinucleótido exógeno o extraño en una célula descrita en la presente o la modificación de un gen endógeno dentro de la célula. La modificación genética incluye, entre otros, la transducción (transferencia mediada por virus del ADN del huésped o donante a un receptor, ya sea *in vitro* o *in vivo*), transfección (transformación de células con genomas de ADN viral aislados), transferencia mediada por liposomas, electroporación, transfección de fosfato de calcio o coprecipitación y otros. Los métodos de transducción incluyen el cocultivo directo de células con células productoras (Bregni et al., 1992) o el cultivo con material sobrenadante viral solo con o sin factores de crecimiento y policaciones apropiados.

Es preferible introducir un polinucleótido exógeno en la célula en un vector. El vector incluye preferiblemente los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia de codificación insertada. Los métodos utilizados para construir tales vectores son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las técnicas para construir vectores de expresión adecuados se describen en detalle en: Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y. (3rd Ed., 2000); y en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York (1999).

Los vectores pueden incluir, sin limitación, vectores virales, tales como retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados y virus del herpes simple; cósmidos; vectores plásmidos; vectores sintéticos; y otros vehículos de recombinación normalmente usados en la técnica. Los vectores que contienen tanto un promotor como un sitio de clonación en el que un polinucleótido puede estar unido operativamente son bien conocidos en la técnica. Dichos vectores son capaces de transcribir ARN *in vitro* o *in vivo*, y están disponibles comercialmente de fuentes tales como Stratagene (La Jolla, California) y Promega Biotech (Madison, WI). Los ejemplos específicos incluyen, pSG, pSV2CAT, pXtl de Stratagene; y pMSG, pSVL, pBPV y pSVK3 de Pharmacia.

Los vectores preferidos incluyen vectores retrovirales (ver, Coffin et al., "Retroviruses", Capítulo 9 pp; 437-473, Cold

Springs Harbor Laboratory Press, 1997). Los vectores se pueden producir de forma recombinante mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los documentos WO 94/29438, WO 97/21824 y WO 97/21825 describen la construcción de plásmidos de empaquetamiento retroviral y líneas celulares de empaquetamiento. Los ejemplos de vectores incluyen los vectores de expresión de mamíferos pCMV, tales como pCMV6b y pCMV6c (Chiron Corp.), pSFFV-Neo y pBluescript-Sk+. Los ejemplos no limitantes, de virus retrovirales son aquellos derivados de retrovirus murinos, aviares o de primates. Los vectores retrovirales comunes incluyen aquellos basados en el virus de la leucemia murina de Moloney (vector MoMLV, Moloney murine leukemia virus). Otros vectores derivados de MoMLV incluyen, Lmily, LINGFER, MINGFR y MINT. Los vectores adicionales incluyen aquellos basados en el virus de la leucemia del mono de Gibbon (GALV) y el virus del sarcoma murino de Moloney (MOMSV) y el virus que forma el foco del bazo (SFFV). Los vectores derivados del virus de células madre murinas (MESV) incluyen MESV-MiLy. Los vectores retrovirales también incluyen vectores basados en lentivirus, y los ejemplos no limitativos incluyen vectores basados en el virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2).

Al producir constructos de vectores retrovirales, las secuencias virales gag, pol y env pueden eliminarse del virus, creando espacio para la inserción de secuencias de ADN extrañas. Los genes codificados por ADN extraño generalmente se expresan bajo el control de un fuerte promotor viral en la repetición terminal larga (LTR). La selección de las secuencias reguladoras de control apropiadas depende de la célula huésped utilizada y la selección está dentro de la experiencia del experto en la técnica. Se conocen numerosos promotores además del promotor de la LTR. Los ejemplos no limitantes incluyen el promotor PL del fago lambda, el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV) humano; el promotor de la región U3 del virus del sarcoma murino de Moloney (MMSV), el virus del sarcoma de Rous (RSV) o el virus de formación del foco del bazo (SFFV); el promotor de la granzima A; y el promotor de la granzima B. Adicionalmente se pueden usar elementos de control inducibles o múltiples. La selección de un promotor adecuado será evidente para los expertos en la materia.

Un constructo de este tipo se puede empaquetar en partículas virales de manera eficiente si las funciones gag, pol y env se proporcionan en trans por una línea celular de empaquetamiento. Por lo tanto, cuando el constructo del vector se introduce en la célula empaquetadora, las proteínas gag-pol y env producidas por la célula, se ensamblan con el vector ARN para producir viriones infecciosos que se secretan en el medio de cultivo. El virus así producido puede infectar e integrarse en el ADN de la célula diana, pero no produce partículas virales infecciosas ya que carece de secuencias de empaquetamiento esenciales. La mayoría de las líneas celulares de empaquetamiento actualmente en uso se han transfectado con plásmidos separados, cada uno de los cuales contiene una de las secuencias de codificación necesarias, de modo que son necesarios múltiples eventos de recombinación antes de que se pueda producir un virus competente para la replicación. Como alternativa, la línea celular de envasado alberga un provirus. El provirus se ha mutilado de manera que, si bien puede producir todas las proteínas necesarias para ensamblar virus infecciosos, su propio ARN no se puede empaquetar en virus. El ARN producido a partir del virus recombinante se empaqueta en su lugar. Por lo tanto, el stock de virus liberado de las células empaquetadoras contiene solo virus recombinante. Los ejemplos no limitantes de líneas de envasado retroviral incluyen PA12, PA317, PE501, PG13, PSI.CRIP, RDI14, GP7C-tTA-G10, ProPak-A (PPA-6) y PT67.

Otros vectores adecuados incluyen vectores adenovirales (ver el documento WO 95/27071) y vectores virales adenoasociados. Estos vectores son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Stem Cell Biology and Gene Therapy, eds. Quesenberry et al., John Wiley & Sons, 1998; y las patentes US Nros. 5.693.531 y 5.691.176. El uso de vectores derivados de adenovirus puede ser ventajoso en ciertas situaciones porque no son capaces de infectar células que no se dividen. A diferencia del ADN retroviral, el ADN adenoviral no está integrado en el genoma de la célula diana. Además, la capacidad de transportar ADN extraño es mucho mayor en los vectores adenovirales que en los vectores retrovirales. Los vectores virales adenoasociados son otro sistema de administración útil. El ADN de este virus puede integrarse en células que no se dividen, y varios polinucleótidos se han introducido con éxito en diferentes tipos de células utilizando vectores virales adenoasociados.

En algunas formas de realización, el constructo o vector incluirá dos o más secuencias polinucleotídicas heterólogas. Es preferible que la secuencia de ácido nucleico adicional sea un polinucleótido que codifica un marcador selectivo, un gen estructural, un gen terapéutico o un gen de citoquina/quimioquina.

Se puede incluir un marcador selectivo en el constructo o vector con el fin de monitorear la modificación genética exitosa y para la selección de las células en las que se ha integrado el ADN. Los ejemplos no limitantes incluyen marcadores de resistencia a fármacos, tales como G148 o higromicina. Adicionalmente, se puede usar una selección negativa, por ejemplo, en donde el marcador es el gen HSV-tk. Este gen hará que las células sean sensibles a agentes como el aciclovir y el ganciclovir. El gen NeoR (resistencia a la neomicina/G148) se usa comúnmente, pero se puede usar cualquier gen marcador conveniente cuyas secuencias de genes no estén ya presentes en la célula diana. Otros ejemplos no limitantes incluyen el Factor de Crecimiento Nervioso de baja afinidad (NGFR), la proteína verde fluorescente reforzada (EFGP), el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR), el gen hisD bacteriano, el CD24 murino (HSA), el CD8a murino (Iyt), los genes bacterianos que confieren resistencia a la puromicina o fleomicina, y β -galactosidasa.

La secuencia o secuencias polinucleotídicas adicionales pueden introducirse en la célula en el mismo vector o pueden introducirse en las células huésped en un segundo vector. En una realización preferida de la presente descripción, se

incluirá un marcador selectivo en el mismo vector que el polinucleótido.

La presente descripción también abarca la modificación genética de la región promotora de un gen endógeno, de manera que la expresión del gen endógeno está regulada hacia arriba, lo que resulta en el aumento de la producción de la proteína codificada en comparación con una célula de tipo salvaje.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Expansión de MPC inmunoseleccionadas y recolección de sobrenadante

La médula ósea (BM) se extrae de ovejas de menos de 2 años. En resumen, se aspiran 40 ml de BM de la cresta ilíaca anterior en tubos que contienen anticoagulante de litio y heparina. Los BMMNC se preparan por separación en gradiente de densidad utilizando Lymphoprep™ (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) como se describió anteriormente (Zannettino et al., 1998). Después de la centrifugación a 400 x g durante 30 minutos a 4 °C, la capa lustrosa se elimina con una pipeta de transferencia y se lava tres veces en "HHF", compuesta de solución salina equilibrada de Hank (HBSS; Life Technologies, Gaithersburg, MD), que contiene 5 % de suero de ternera fetal (FCS, CSL Limited, Victoria, Australia).

TNAP+ se aislaron posteriormente por clasificación de células activadas magnéticamente como se describió anteriormente (Gronthos et al., 2003; Gronthos et al., 1995). En resumen, se incuban aproximadamente $1-3 \times 10^8$ BMMNC en un tampón de bloqueo, que consiste en suero de conejo normal al 10% (v/v) en HHF durante 20 minutos en hielo. Las células se incuban con 200 μ l de una solución de 10 μ g/ml de mAb STRO-3 en tampón de bloqueo durante 1 hora en hielo. Las células se lavan posteriormente dos veces en HHF mediante centrifugación a 400 x g. Se agrega una dilución de 1/50 de γ -biotina anti-ratón de cabra (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Reino Unido) en tampón HHF y las células se incuban durante 1 hora en hielo. Las células se lavan dos veces en tampón MACS (Ca^{2+} - y PBS libre de Mn^{2+} suplementado con 1% de BSA, 5 mM de EDTA y azida sódica al 0,01%) como se indicó anteriormente y se resuspenden en un volumen final de 0,9 ml de tampón MACS.

Se añadieron 100 μ l de microperlas de estreptavidina (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Alemania) a la suspensión celular y se incuban en hielo durante 15 minutos. La suspensión celular se lava dos veces y se resuspende en 0,5 ml de tampón MACS y luego se carga en una minicolumna MACS (MS Columns, Miltenyi Biotec) y se lava tres veces con 0,5 ml de tampón MACS para recuperar las células que no se unieron a mAb STRO -3 (depositado el 19 de diciembre de 2005 con American Type Culture Collection (ATCC) con el número de acceso PTA-7282, ver el documento WO/2006/108229). Después de la adición de 1 ml de tampón MACS adicional, la columna se retira del imán y las células positivas para TNAP se aíslan mediante presión positiva. Una alícuota de células de cada fracción puede teñirse con estreptavidina-FITC y la pureza se puede evaluar mediante citometría de flujo.

Los cultivos primarios se establecen a partir de las células TNAP+ aisladas de MACS mediante el plaqueo en α -MEM complementado con 20% de suero de ternera fetal, 2 mM de L-glutamina y 100 μ M de L-ascorbato-2-fosfato como se describió anteriormente (Gronthos et al., 1995).

Las células se cultivaron hasta el pasaje 5, momento en el que se puede recoger el medio acondicionado (sobrenadante).

Ejemplo 2: Estudios sobre los efectos intraarticulares dependientes de la dosis de las células precursoras mesenquimales (MPC) inmunoseleccionadas alogénicas sobre la integridad del cartílago en un modelo de OA temprana inducida por la meniscectomía medial total bilateral en ovinos machos castrados adultos (carneros)

Los meniscos de la articulación de la rodilla, o cartílagos semilunares, son importantes estructuras de soporte de peso que también sirven para mejorar la lubricación del cartílago articular y proporcionan estabilización lateral durante la articulación articular. La extirpación quirúrgica de un menisco desgarrado o degenerado, es decir, una meniscectomía, es un procedimiento ortopédico común, pero se sabe que está asociado con un mayor riesgo de osteoartritis (OA) en años posteriores (Englund, 2004). Se sabe que el atrapamiento mecánico del sinovio articular en el espacio previamente ocupado por el menisco extirpado quirúrgicamente conduce a la regeneración parcial de una réplica de menisco (Moon et al., 1984). Sin embargo, los resultados de los estudios experimentales de meniscectomía en perros indican que estas estructuras de reemplazo consistían esencialmente en tejido fibroso con propiedades biomecánicas muy inferiores a las de los meniscos originales (Ghosh et al., 1983). Además, el grado de desarrollo de la OA en las articulaciones de estos animales experimentales 6 meses después de la meniscectomía fue relativamente grave, lo que confirma la protección funcional limitada que ofrecen las estructuras de regeneración en el cartílago articular (Ghosh et al. 1983a). Los modelos de OA en animales grandes y pequeños han permitido la evaluación longitudinal de los cambios espaciales y temporales en los tejidos articulares que se producen durante el desarrollo de esta enfermedad, lo cual es difícil de obtener con pacientes humanos (Smith and Ghosh, 2001). En ovejas merinas, se ha demostrado que la meniscectomía lateral o medial reproduce con fiabilidad alteraciones bioquímicas, biomecánicas e histopatológicas típicas de la OA (Smith and Ghosh, 2001). El modelo de OA ovina también se ha utilizado ampliamente para investigar los resultados de varias modalidades de tratamientos posoperatorios (Ghosh, 1991; Smith and Ghosh, 2001) pero hasta la fecha no se ha empleado para evaluar el rebrote meniscal y la progresión de la OA y

cómo estos eventos podrían verse influenciados por la terapia de células precursoras mesenquimales (MPC) intraarticular.

5 Nuestros estudios previos habían demostrado que la meniscectomía media total bilateral (BTM) en ovejas merinas daba lugar a cambios patológicos en el cartílago articular (AC), huesos subcondrales y tejidos sinoviales que eran progresivos y simulaban el desarrollo de la osteoartritis humana (OA) temprana. Anteriormente utilizamos este modelo animal para evaluar posibles fármacos para la OA que modifican la enfermedad.

10 Métodos

BTM se llevó a cabo en 36 ovejas merinas adultas. Dos semanas después de la BTM, las articulaciones se inyectaron aleatoriamente con 2 ml de hialuronano (HA) de alto MW o con 2 ml de Stro-3+ MPC alogénico suspendido en 2 ml de HA. Se estudiaron cuatro dosis de MPC: Grupo A = 10 millones (mil) de MPC [n = 6]; Grupo B = 25 mil MPC [n = 6]; Grupo C = 100 mil MPC [n = 18] y Grupo D = 150 mil MPC [n = 6]. Los grupos A, B y D se sacrificaron 12 semanas después de la BTM, mientras que el grupo C se sacrificó 12 [n = 6], 24 [n = 6] y 52 [n = 6] semanas después de BTM.

En la necropsia, los compartimientos mediales de las articulaciones de BTM fueron evaluados por 2 observadores ciegos para las lesiones de AC y los osteofitos (OP) utilizando una escala de 0 a 4. Se extrajeron tejido sinovial y un corte osteocondral coronal de 5 mm de ancho de la línea media del fémur y la tibia, y se procesaron y se anotaron los cambios histopatológicos (Little et al., 1997) y los análisis histomorfométricos (Coke et al., 2003) utilizando los métodos citados.

Las rótulas intactas de todas las articulaciones se sometieron a estudios de indentación biomecánica topográfica para determinar la rigidez y el desfase del cartílago articular (Appleyard et al., 2003).

25 El análisis estadístico del efecto del tratamiento se realizó utilizando el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis y para las comparaciones específicas entre grupos utilizando el análisis no paramétrico de la U de Mann Whitney, con una $p < 0,05$ considerada significativa.

30 El análisis estadístico para la comparación entre las medias de los grupos de MPC + HA inyectadas y HA inyectadas de cada grupo se realizó utilizando la misma varianza de dos colas de la prueba t de Student con $p < 0,05$ considerado significativo.

35 El análisis estadístico para la comparación entre cartílagos de rótula de MPC + articulaciones HA inyectadas (tratadas) y HA inyectadas de cada grupo se realizó mediante una prueba t independiente con $p < 0,05$ considerado significativo.

Resultados

40 Las puntuaciones morfológicas generales 12 semanas después de BTM mostraron un efecto dependiente de la dosis de MPC sobre la integridad del AC y la formación de OP; MPC de 100 mil aparece como la dosis condroprotectora más eficaz en relación con la HA sola (Figuras 1 y 2). Las relaciones de puntuación total de AC (HA+MPC)/(HA) mostraron $100 > 150 > 25 = 10$, mientras que las relaciones OP fueron de $100 = 25 > 10 > 150$ mil MPC (Figuras 3 y 4). Se observó una puntuación menor estadísticamente significativa (SS) para el AC femoral y tibial total ($p = 0,02$), mientras que $p = 0,052$ se observó para los cartílagos femorales del Grupo C MPC en comparación con HA solo (Figura 1).

50 El análisis histomorfométrico de la meseta tibial del grupo C MPC + HA reveló que AC era más gruesa que HA-AC correspondiente en las regiones media ($p = 0,057$) y externa ($p = 0,028$); todas las regiones ($p = 0,01$) (Figura 5). Las puntuaciones medias de Mankin modificadas para las secciones de AC de las uniones del grupo C MPC + HA fueron menores que las secciones de HA correspondientes, pero no fueron SS. Además, cuando se calcularon y representaron gráficamente las proporciones de las puntuaciones de Mankin totales para las articulaciones inyectadas de HA + MPC inyectadas con HA y contralaterales de cada grupo, era evidente que la dosis de 100 millones de MPC era la más eficaz (Figura 6).

55 La cuestión de la sostenibilidad de la dosis de 100 millones de MPC para preservar la integridad del cartílago articular se abordó mediante el estudio de las propiedades morfológicas, histológicas y biomecánicas de los tejidos 22 y 50 semanas después de la inyección, es decir, 24 y 52 semanas después de la meniscectomía. Como es evidente en las Figuras 7 y 8, la diferencia entre los valores medios para las puntuaciones morfológicas para HA y HA + 100 millones de MPC disminuye a lo largo de este tiempo, aunque hay algunas pruebas de un efecto terapéutico a las 24 semanas. Esta visión está respaldada por los datos de HA/MPC + HA que indicaron un efecto más fuerte de las células en la supresión de las puntuaciones de osteofitos durante hasta 52 semanas (Figuras 10 y 11). Por otro lado, en los gráficos similares para los puntajes histopatológicos de Mankin se observó que a las 52 semanas se perdieron los efectos protectores del MPC (Figura 11).

65 Los estudios de indentación biomecánica en los cartílagos de la rótula de las articulaciones de todos los grupos de animales fueron generalmente consistentes con los datos morfológicos e histológicos. Sin embargo, la rigidez del

cartilago está influenciada por el grosor del cartilago, que en las primeras fases de la lesión puede ser hipertrófico pero normalizarse con el tiempo. Esta situación puede estar ocurriendo en el presente modelo, ya que la rigidez del cartilago de la rótula determinada para los grupos de 25 y 100 millones de MPC fue significativamente menor que la de los grupos de 10 y 150 millones de MPC que, de otros estudios, mostraron la mayoría de los tejidos dañados (Figuras 12 y 13). Esta interpretación fue apoyada por los datos de retardo de fase, que fueron significativamente más bajos para las rótulas del grupo de 100 millones de MPC, en relación con las articulaciones inyectadas de HA correspondientes y la dosis de 150 millones de MPC (Figura 14). Además, se encontró que los valores de retraso de fase promedio observados a las 12 semanas aumentaron significativamente a las 24 y 52 semanas después de la menisectomía, lo que confirma la pérdida de un efecto terapéutico útil de la MPC inyectada más allá de 6-12 meses (Figura 15). El retardo de la fase refleja el ensamblaje molecular de la matriz extracelular del cartilago y, mientras más bajo es el ángulo (Fase), mayor es la elasticidad y, por lo tanto, la capacidad de recuperación de la deformación (Cake et al., 2005).

Los efectos condroprotectores observados para las articulaciones inyectadas de 100 mil MPC disminuyeron con el tiempo; los efectos positivos observados a las 12 y 24 semanas se perdieron BTM a las 52 semanas.

No hubo evidencia de modulación histopatológica sinovial. La patología clínica y de órganos gruesos realizada en estos animales no ha mostrado ninguna evidencia de efecto adverso sistémico de MPC.

Conclusiones

Este es el primer informe, por lo que sabemos, de un efecto terapéutico beneficioso de MPC alogénica sobre la integridad del cartilago en un modelo de OA temprana. Se sabe que las MPC liberan factores de crecimiento y citoquinas y también suprimen la producción de TNF-alfa por otras células, mientras que regulan hacia arriba las citoquinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10). Estas actividades paracrinas de MPC podrían estimular la biosíntesis de condrocitos de nueva matriz, pero también atenuar la producción local y la actividad de los mediadores catabólicos. El hallazgo en este estudio de que 100 millones de MPC eran condroprotectores era consistente con dicho mecanismo de acción. Los datos generados en estos estudios en ovejas indican que la duración del efecto condroprotector mediado por una única inyección intraarticular de 100 millones de MPC es de entre 6 y 12 meses después del tratamiento, lo que sugiere que pueden requerirse múltiples inyecciones para el manejo a largo plazo de OA paciente.

Si bien las inyecciones intraarticulares de HA se usan ampliamente para el tratamiento de la osteoartritis de rodilla, hay pruebas limitadas de que esta terapia es condroprotectora (Ghosh et al., 2002). Sin embargo, se informa que la terapia de HA intraarticular proporciona un alivio sintomático en la OA que es de inicio lento, pero más sostenida que con los corticosteroides intraarticulares (Bellamy et al., 2006).

Ejemplo 3: Efectos terapéuticos relativos de la inyección intraarticular de hialuronano (HA) o 100 millones de células precursoras mesenquimales (MPC) + HA sobre la integridad del cartilago en un modelo de osteoartritis severa inducida por la menisectomía media total bilateral en las articulaciones sofocadas de las ovejas ovariectomizadas

El menisco de la articulación de la rodilla desempeña un papel importante en la protección del cartilago articular (AC) contra el daño durante la articulación articular normal (Amoczy et al., 1988). La extirpación total o parcial del menisco en humanos después de su lesión generalmente produce una degeneración prematura del AC y la progresión a la osteoartritis (OA) (Jorgensen et al., 1987; Roos et al., 1998 y McNicholas et al., 2000). Los estudios experimentales han demostrado que la menisectomía total unilateral o bilateral en ovejas también conduce a la descomposición prematura del AC y al inicio temprano de la OA (Ghosh et al., 1990; Appleyard et al., 1999 y Ghosh et al., 1993c).

Dado que la falla del AC en las articulaciones menisectomizadas es una consecuencia de la imposición de un alto esfuerzo focal y de cizallamiento sobre el cartilago, se encontró que la menisectomía bilateral induce una progresión más rápida de la degeneración del cartilago que la menisectomía unilateral donde se puede acomodar un soporte de peso sin dolor mediante el uso de la extremidad posterior no operada contralateral (Ghosh et al., 1993a y 1993b; Appleyard et al., 2003; Little et al., 1997 y Oakley et al., 2004). Además, también se ha demostrado que las ovejas ovariectomizadas sometidas a menisectomía bilateral se someten a una OA más progresiva que los machos adultos castrados (carneros), en gran parte debido al agotamiento de la circulación de la hormona protectora del cartilago, el estrógeno (Parker et al., 2003). Por estas razones, las ovejas ovariectomizadas y menisectomizadas bilaterales se ven favorecidas como un modelo animal grande de OA para estudiar las actividades modificadoras de la enfermedad de los agentes anti-OA (Ghosh et al., 1993; Smith et al., 1997; Burkhardt et al., 2001; Hwa et al., 2001 y Cake et al., 2000). Por lo tanto, el modelo de OA ovariectomizado/menisectomizado bilateralmente de OA se seleccionó para la presente investigación, cuyo objetivo fue evaluar los efectos de las células alogénicas (MPC) alogénicas administradas de forma intraarticular sobre la inducción del crecimiento o la regeneración de cartilago rico en proteoglicano y en condroprotección en relación con una terapia anti-OA actualmente utilizada, IA hialuronano (HA).

Métodos

Se realizó una meniscectomía medial total (BTM) bilateral en 18 ovejas merinas adultas que se habían sometido a una ovariectomía 3 meses atrás utilizando un método publicado (Cake et al., 1004). El procedimiento quirúrgico y el régimen posoperatorio utilizado para BTM fueron idénticos a los descritos para los estudios de BTM de ovejas macho castrados descritos en el Ejemplo 2.

5 Doce semanas después del BTM, se sacrificaron 6 ovejas, mientras que las articulaciones sofocantes (rodilla) de las 12 ovejas meniscectomizadas restantes se inyectaron al azar con 2 ml de HA de alto MW o 100 millones de MPC suspendidas en 2 ml de Profreeze® más 2 ml de HA. Esta dosis de MPC + HA se mostró en el Ejemplo 2 para proporcionar los efectos condroprotectores más beneficiosos en el modelo de oveja BTM macho. Las ovejas meniscectomizadas e inyectadas se dividieron en dos grupos de 6 que se sacrificaron 24 y 36 semanas después de BTM, es decir, 12 y 24 semanas después de la inyección intraarticular HA o MPC + HA. Para determinar los efectos de género en la respuesta de desestabilización de la articulación, 6 ovejas macho castradas no tratadas también se sometieron a BTM y se sacrificaron 12 semanas después de la meniscectomía.

15 En la necropsia, se abrieron las articulaciones, se extrajeron los meniscos y se fotografiaron las mesetas mediales femoral y tibial. Las imágenes grabadas fueron calificadas por 2 observadores ciegos para los cambios morfológicos en el cartílago utilizando una escala de 0 - 4. El sinovio del pliegue suprapatelar y un corte osteocondral coronal de 5 mm de ancho se retiraron de la línea media del fémur y la tibia de cada articulación y se procesaron para la preparación de cortes histológicos. La histopatología del cartílago fue evaluada por dos observadores ciegos utilizando un sistema de puntuación de Mankin modificado como se describió anteriormente (Little et al., 1997). La histopatología sinovial se calificó utilizando los criterios descritos recientemente por Cake et al., 2008.

25 Las secciones serológicas histológicas de los mismos bloques de cartílago que se usaron para la puntuación de Mankin también se utilizaron para el análisis histomorfométrico como se describió anteriormente (Cake et al., 2000; Cake et al., 2004). Esta técnica emplea el análisis de imágenes asistido por computadora (ImagePro Plus v.3.0, Media Cybernetics) para generar datos cuantitativos sobre las dimensiones y un índice del contenido de proteoglicanos de AC con tinción de azul de toluidina. En resumen, las imágenes de las secciones teñidas se obtuvieron a través de un Microtek Slidescanner 35t plus (Microtek Modelo N.º PTS-1950) a una resolución de 1300 dpi y luego se analizaron con el software Image J® (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) en un ordenador personal. Las imágenes digitales de las secciones femoral y tibial se subdividieron en las regiones interna, media y externa, representando cada región aproximadamente un tercio del área total de las secciones de cartílago. La calibración espacial del sistema se logró mediante el escaneo de una retícula de alta precisión de 10x10 mm. Esta escala se utilizó para cuantificar la longitud (mm) y el área (mm²) de cada región de las imágenes importadas. El grosor promedio de las secciones se determinó dividiendo el área por la longitud. La densidad óptica (OD) de las secciones de cartílago teñidas con TB se obtuvo como el valor de gris medio (MGV) (suma de valores de grises/número de píxeles) y se tomó como un índice del contenido de proteoglicano (PG). La densidad de escala de grises integrada (IGD) se calculó como MGV x área de sección regional. Aunque el sistema de escala de grises utilizado no se calibró de forma independiente contra las secciones teñidas con TB del contenido de PG conocido, todas las secciones histológicas se cortaron en el mismo micrótopo, tenían el mismo grosor y se procesaron como un grupo utilizando el mismo protocolo de tinción. Las diferencias en la tinción del cartílago son, por lo tanto, relativas en lugar de absolutas. Las rótulas intactas de todas las articulaciones se retiraron a la hora del sacrificio y se congelaron y almacenaron inmediatamente antes de los estudios de indentación biomecánicos topográficos para determinar la rigidez y el desfase del cartílago articular (Appleyard et al., 2003).

45 El análisis estadístico para identificar las diferencias en los resultados de los tratamientos (HA versus HA + MPC) o los tratamientos versus 12 semanas posteriores a los controles de BTM, según lo evaluaron los sistemas de calificación morfológica e histológica, se realizó mediante el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis y para las diferencias entre las comparaciones de grupos utilizando el análisis no paramétrico U de Mann-Whitney con $p < 0,05$ considerado significativo.

50 Los datos generados por el análisis histomorfométrico de las secciones histológicas digitalizadas se evaluaron utilizando la prueba t de Student de dos colas con la misma varianza, con $p < 0,05$ considerado significativo. El análisis estadístico de los parámetros biomecánicos de cartílagos de la rótula con respecto a los diferentes tratamientos y entre los tiempos posteriores a BTM se calculó utilizando una prueba t independiente con $p < 0,05$ considerado significativo.

Resultados

60 La evaluación morfológica general de las erosiones del cartílago y la formación de osteofitos en las articulaciones de las ovejas no tratadas 12 semanas después de BTM confirmó que este modelo de OA representaba una forma más agresiva y grave de la enfermedad en comparación con los machos castrados meniscectomizados sometidos al mismo procedimiento quirúrgico. Para este grupo de control femenino no tratado, la puntuación morfológica del cartílago media para el fémur fue del 87% y para la tibia el 75% de las puntuaciones máximas utilizadas para evaluar este parámetro. Las puntuaciones brutas de morfología obtenidas para las articulaciones derivadas de los machos castrados posmeniscectomizados 12 semanas no tratadas sometidas al mismo procedimiento quirúrgico fueron significativamente menores que para las ovejas ovariectomizadas (Figuras 16 y 17), un hallazgo que fue consistente con observaciones previas utilizando meniscectomía lateral bilateral (Parker et al., 2003; Cake et al., 2004).

Si bien ambos tratamientos dieron lugar a puntuaciones de cartílago morfológico femoral promedio más bajas a las 24 y 36 semanas que a la meniscectomización de 12 semanas sin tratamiento (no se muestran los datos), no se detectaron diferencias significativas entre las articulaciones tratadas con MPC y HA. Interpretamos que esto significa
5 que en este modelo de OA grave, la gravedad de las lesiones morfológicas generales (puntajes de erosión y osteofitos) hace que estos parámetros sean demasiado insensibles para detectar diferencias terapéuticas.

Se encontró que las puntuaciones de histopatología de Mankin modificadas para cartílagos del grupo no tratado de 12 a semanas pos-BTM eran consistentes con la extensión del daño del cartílago según se evaluó morfológicamente
10 (Figuras 16 y 17). Contrariamente a los parámetros morfológicos, a las 36 semanas, la puntuación de Mankin media modificada total para los cartílagos femorales en las ovejas ovariectomizadas que recibieron MPC + HA fue más baja que la puntuación correspondiente para las articulaciones que recibieron HA solo y mostró un número de células significativamente más bajo ($p = 0,01$) y una tendencia ($p = 0,06$) para una tinción interterritorial más fuerte del azul de toluidina (IT TB) para los proteoglicanos que HA solo (Figura 18). Estos efectos fueron menos pronunciados para
15 los cartílagos tibiales (Figura 18).

La puntuación del cartílago histopatológico de Mankin modificada más baja observada para las inyecciones de MPC + HA a las 36 semanas posteriores a la meniscectomía en relación con las articulaciones inyectadas con HA se destacó cuando se determinó la proporción de las puntuaciones de Mankin modificadas totales medias para los dos
20 tratamientos intraarticulares (Figura 19). Dado que cada relación se obtuvo de las dos articulaciones tratadas del mismo animal, una proporción = 1 indicaría que ambos tratamientos fueron igualmente efectivos. Sin embargo, para las proporciones > 1 , se puede decir que el tratamiento con MPC + HA es más beneficioso. Como es evidente en la Figura 19, la media de las proporciones obtenidas para los cartílagos femorales fue significativamente más alta (1,71) que la unidad a las 36 semanas pos-BTM, mientras que las proporciones de cartílago tibial (1,12) para los dos
25 tratamientos fueron sólo ligeramente a favor del grupo inyectado con MPC + HA (Figura 19).

A continuación, examinamos el efecto de los tratamientos en las puntuaciones de Mankin a lo largo del tiempo. Se encontraron diferencias significativas en los efectos sobre el cartílago femoral a lo largo del tiempo entre los brazos de tratamiento MPC + HA y HA solo a las 24 y 36 semanas después de la meniscectomía, es decir, 12 y 24 semanas
30 después de la inyección (Figura 20). En el grupo que recibió MPC + HA, las puntuaciones medias a las 24 y 36 semanas fueron progresivamente más bajas que en la línea base de las 12 semanas. Esto se debió a la reducción de las puntuaciones y la mejora en la clonación celular ($P = 0,01$) a las 24 semanas, y en el número de células ($P = 0,04$) y la tinción interterritorial de azul de toluidina para proteoglicanos (PG) ($P = 0,04$) a las 36 semanas al grupo sin tratamiento de 12 semanas (Figura 20). No se observaron tales mejoras en el grupo de HA solo. No se observaron
35 diferencias significativas entre las puntuaciones de patología sinovial para ninguno de los grupos o los tratamientos intraarticulares.

El análisis del espesor del cartílago, el área y la intensidad de la tinción de TB como un índice del contenido de PG para las 3 regiones (interior, media y exterior) de los cóndilos femorales de las articulaciones inyectadas a las 36
40 semanas pos-BTM utilizando métodos de análisis histomorfométricos se muestran en la Figura 21. A las 36 semanas posteriores a BTM, las diferencias significativas entre los grupos de tratamientos eran evidentes. Los cartílagos femorales de las articulaciones inyectadas con MPC + HA fueron significativamente más gruesos (Figura 21A) y ocuparon un área significativamente más grande (Figura 21B) que los cartílagos correspondientes de las articulaciones inyectadas con HA. El mayor volumen de los cartílagos femorales de las articulaciones inyectadas con MPC + HA
45 estuvo acompañado por un mayor contenido de proteoglicanos según se determinó a partir de la densidad de la escala de grises integrada de las secciones teñidas con TB (Figura 21C).

Una vez más, comparando estos parámetros en un análisis basado en el tiempo, se encontraron diferencias significativas en los efectos sobre el cartílago femoral entre el MPC + HA y los brazos de tratamiento de HA solo a las
50 24 y 36 semanas después de la meniscectomía, es decir, 12 y 24 semanas después de la inyección. Usando la misma metodología histomorfométrica, pudimos demostrar que la inyección de MPC + HA administrada 12 semanas después de la meniscectomía dio lugar a un crecimiento o regeneración progresivamente mayor del cartílago femoral rico en proteoglicanos 12 y 24 semanas después (es decir, a las 24 y 36 semanas después de BTM) que HA solo (Figuras 22 a 24). Por lo tanto, los cartílagos femorales a las 24 y 36 semanas pos-BTM de las articulaciones de ovejas
55 meniscectomizadas inyectadas con MPC + HA a las 12 semanas fueron significativamente más gruesos (Figura 22) y en general tenían áreas más grandes (Figura 23) que los valores de referencia de las articulaciones no tratadas a las 12 semanas después de la meniscectomía. Las regiones correspondientes escaneadas de secciones de cartílago femoral derivadas de articulaciones inyectadas con HA no demostraron cambios estadísticamente significativos en relación con los controles sin tratamiento de 12 semanas (Figuras 22 y 23). La densidad integrada en escala de grises
60 como medida del contenido de PG de las secciones de cartílagos femorales fue significativamente mayor para las articulaciones inyectadas de HA y MPC + HA en relación con las mismas regiones de cartílago de las articulaciones del grupo sin tratamiento posterior a BTM de 12 semanas, pero la magnitud del cambio inducido por el MPC + HA fue significativamente mayor que HA solo (Figura 24). Mientras que el grupo MPC + HA desarrolló casi un 60% más de tejido femoral rico en proteoglicanos a las 36 semanas en comparación con el valor inicial ($P < 0,001$), y esta tasa de crecimiento del cartílago no había alcanzado una fase de meseta, el grupo de HA solo había alcanzado una fase de meseta y desarrolló sólo un 30% más de tejido. Esto indicó que el tratamiento con MPC + HA estimuló un aumento
65

significativamente mayor en el cartílago rico en proteoglicanos durante las 24 semanas de seguimiento (es decir, el crecimiento y/o la regeneración del cartílago) en relación tanto con la línea de base como con cualquier efecto temporal del tratamiento con HA solo.

5 Los resultados de los estudios de indentación en los cartílagos de rótula de las articulaciones inyectadas no demostraron ninguna diferencia en las propiedades biomecánicas de los cartílagos para los dos tratamientos, pero se identificaron cambios con respecto al tiempo transcurrido después de la meniscectomía y el grupo pos-BTM no tratado a las 12 semanas. La rigidez de los cartílagos de la rótula del MPC + HA a las 24 semanas posteriores a la meniscectomía fue significativamente mayor que a las 12 semanas ($P = 0,05$) y a las 36 semanas ($P < 0,01$) (datos no mostrados). Sin embargo, ambos tratamientos produjeron cartílago de rótula más grueso a las 36 semanas en comparación con 24 semanas ($P = 0,001$) que también fue inferior al control de 12 semanas no tratado ($P = 0,01$). El retraso de la fase del cartílago de la rótula para ambos grupos de tratamiento a las 24 y 36 semanas fue mayor que en los controles de 12 semanas no tratados ($P = 0,001$) (datos no mostrados).

15 **Análisis**

Los estudios actuales han demostrado que la meniscectomía medial bilateral en ovejas ovariectomizadas indujo cambios patológicos en el cartílago articular de la articulación después de 3 meses que fueron consistentes con OA progresiva y grave. Por lo tanto, los puntajes morfológicos brutos para los cartílagos femorales y tibiales fueron de 87 - 70% del puntaje máximo. Curiosamente, los machos castrados sometidos al mismo procedimiento quirúrgico y sacrificados al mismo tiempo (12 semanas) mostraron lesiones de cartílago menos graves que las observadas para las hembras ovariectomizadas. La extensión de la patología del cartílago también se reflejó en las altas puntuaciones de histopatología de Mankin modificadas agregadas observadas para este grupo que fueron consistentes con la asignación de la OA temprana (Little et al., 1997). Aunque estudios anteriores habían identificado una fuerte asociación de OA en mujeres posmenopáusicas, que se explicó por el agotamiento de los estrógenos de la circulación (Roos et al., 2001; Pelletier et al., 2007 y Nevitt et al., 1996) y recibió apoyo según estudios en ovejas ovariectomizadas (Parker et al., 2003 y Cake et al., 2004), otros estudios más recientes sugieren que la hormona adiposa derivada, la leptina, puede desempeñar un papel más importante en la mediación de la degradación del cartílago y la OA (Dumond et al., 2003 y Teichtahl et al., 2005). Los 3 meses posteriores al período BTM se tomaron como punto de partida para la evaluación de los efectos relativos de las inyecciones intraarticulares de HA o MPC + HA en la tasa de progresión de la patología del cartílago 12 y 24 semanas después de la administración de estos agentes.

Los resultados de este estudio indicaron que una sola inyección intraarticular de 100 millones de MPC dispersada en 2 ml de HA y 2 ml de Profreeze® (un crioprotector comercial) en articulaciones con OA grave y establecida puede reducir, durante un período intermedio de 24 semanas, la progresión de la patología articular y mejorar el crecimiento y/o la regeneración de cartílago rico en proteoglicanos en mayor medida que una inyección única de 2 ml de HA. Sorprendentemente, se observó que los efectos de crecimiento/regenerativos y condroprotectores mediados por MPC son más significativos 24 semanas después de la administración que después de 12 semanas en la mayoría de los parámetros examinados, lo que indica efectos progresivos que aún no han alcanzado una fase de meseta. Las razones de este hallazgo actualmente no están claras, sin embargo, es posible que los factores de crecimiento como los miembros de la superfamilia de TGF-beta, por ejemplo, BMP, liberados por MPC (Ahrens et al., 1993; Aggarwal et al., 2005) soportaran la fase anabólica (compensatoria) del cartílago a las tensiones mecánicas alteradas impuestas en la articulación por la meniscectomía medial. Esta visión fue apoyada por los datos histomorfométricos que demostraron la presencia de volúmenes más altos y tinción más intensa para los proteoglicanos en los grupos inyectados con MPC que al comienzo del tratamiento a las 12 semanas posteriores a la BTM. Estos cambios en la matriz son consistentes con el aumento de la biosíntesis de los condrocitos. Significativamente, se encontró que la magnitud de los parámetros anabólicos generalmente es mayor en los cartílagos de los animales que recibieron el MPC + HA en lugar de HA solo. La capacidad de MPC de preservar e incluso mejorar esta respuesta del cartílago a la sobrecarga mecánica contrasta con los efectos inhibidores conocidos sobre el metabolismo de los condrocitos mediado por muchos tratamientos tradicionales de la OA, incluidos muchos de los medicamentos antiinflamatorios esteroides y no esteroides (NSAID) (McKenzie et al., 1976; Ghosh, 1988; Brandt, 1993 y 1993a; Huskisson et al., 1995).

Durante más de 30 años, se han utilizado múltiples inyecciones de HA intraarticulares como terapia para el tratamiento de la OA de rodilla. Aunque el consenso es que esta forma de tratamiento proporciona alivio sintomático clínicamente, una revisión reciente y un metanálisis de ensayos clínicos publicados sobre HA han cuestionado la validez de esta conclusión sobre la base de los efectos más fuertes del placebo asociados con las inyecciones intraarticulares, dificultad del cegamiento de los investigadores y sesgos de publicación (Brandt et al., 2000; Lo et al., 2003). Si el HA intraarticular exhibe alguna actividad condroprotectora o regenerativa del cartílago también es controvertido. Sin embargo, extensas investigaciones en animales han demostrado que el HA exhibe efectos analgésicos, antiinflamatorios y modificadores de la enfermedad en modelos de OA de conejos y ovinos inducidos por meniscectomía unilateral y bilateral, así como también en la transección del ligamento cruzado anterior en perros. Se ha revisado una discusión de estos datos junto con estudios clínicos preclínicos y de laboratorio con HA de diferente peso molecular (Ghosh et al., 2002).

65 En el presente estudio, solo se evaluó una sola inyección intraarticular de HA, ya sea sola o en combinación con MPC. Sobre la base de nuestros propios datos, llegamos a la conclusión de que el crecimiento de larga duración y los efectos

regenerativos, así como condroprotectores proporcionado por la combinación de MPC + HA fue mediada por MPC. En este sentido, es importante tener en cuenta que el diseño de este estudio permitió que cada animal actuara como su propio control, ya que una articulación recibió HA, mientras que la articulación contralateral recibió la misma cantidad de HA más MPC en el crioprotector, Profreeze®. Dado que ambas articulaciones de la rodilla se desestabilizaron quirúrgicamente en el presente estudio y se inyectaron al mismo tiempo, estamos seguros de que la magnitud y la naturaleza de los esfuerzos mecánicos de soporte de peso que actúan sobre los cartílagos articulares fueron los mismos en ambas articulaciones.

De los estudios actuales, llegamos a la conclusión de que una única administración intraarticular de MPC + HA en articulaciones ovinas con OA grave preexistente da como resultado el crecimiento o la regeneración de cartílago rico en proteoglicanos como se manifiesta por un aumento de la matriz extracelular de cartílago 24 semanas después del tratamiento en relación con tratamiento previo basal y a controles inyectados de HA.

Ejemplo 4: Estudios de regeneración de discos ovinos utilizando métodos MPC inmunoseleccionados

36 carneros merinos emparejados por edad (aproximadamente 18 a 24 meses de edad) se utilizaron para este estudio. En 36 ovejas, tres discos lumbares adyacentes (L3-L4, L4-L5, L5-L6) se inyectaron con 1,0 UI de condroitinasa ABC (Seikagaku Corporation, Japón) en aproximadamente 0,1 ml de solución salina estéril normal para descomponer y eliminar las PG de NP. Los discos lumbares restantes (L1-L2 y L2-L3) no se inyectaron con condroitinasa ABC y sirvieron como controles. Quince semanas (\pm 3 semanas) después de la administración de condroitinasa ABC, se administraron inyecciones de MPC ($0,5 \times 10^6$ células) en medio de congelación Profreeze™ (NAO) o Profreeze™ NAO solo (Lonza Walkersville Ltd.) mezclado con un volumen igual de ácido hialurónico (Euflexxa®, (Ferring Pharmaceuticals) directamente en los núcleos pulposos tratados con condroitinasa ABC de los discos intervertebrales identificados esquemáticamente en la Figura 25. Los grupos experimentales respectivos se sacrificaron 3 y 6 meses después, como se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Resumen del diseño del estudio

Grupo	N.º	Disco	15 \pm 3 semanas antes de la línea basal	Línea basal día 0	Sacrificio	Análisis en el sacrificio
1	n = 6	L1-L2	Sin inyección	Sin inyección	3 meses	Composicional/Histología
		L2-L3	Sin inyección	Sin inyección	3 meses	Composicional/Histología
		L3-L4	Condroitinasa	MPC $0,5 \times 10^6$	3 meses	Composicional/Histología
		L4-L5	Condroitinasa	Sin inyección	3 meses	Composicional/Histología
		L5-L6	Condroitinasa	HA y NAO	3 meses	Composicional/Histología
2	n = 6	L1-L2	Sin inyección	Sin inyección	6 meses	Composicional/Histología
		L2-L3	Sin inyección	Sin inyección	6 meses	Composicional/Histología
		L3-L4	Condroitinasa	MPC $0,5 \times 10^6$	6 meses	Composicional/Histología
		L4-L5	Condroitinasa	Sin inyección	6 meses	Composicional/Histología
		L5-L6	Condroitinasa	HA y NAO	6 meses	Composicional/Histología

A los animales se les tomaron radiografías simples laterales de la columna lumbar bajo anestesia de inducción en los siguientes puntos temporales: día 0 (inyección de condroitinasa ABC (Seikagaku Corporation, Japón), día de administración del artículo de prueba (15 + 3 semanas después de la inducción de la degeneración del disco lumbar) y 3 meses y 6 meses después de la implantación del artículo de prueba. La evaluación de las radiografías se realizó utilizando un índice de altura intervertebral (DHI) calculado al promediar las mediciones de las partes anterior, media y posterior de la DIV y dividiéndolo por el promedio de las alturas del cuerpo intervertebral adyacente, según lo descrito por (Masuda et al., 2004)

Las IRM se tomaron de la columna lumbar bajo anestesia de inducción en los puntos de tiempo siguientes: día 0 (inyección de condroitinasa ABC [Seikagaku Corp Japón]), día de administración del artículo de prueba (15 + 3 semanas después de la inducción de la degeneración del disco lumbar), 3 meses y 6 meses después de la implantación del artículo de prueba. Los discos se clasificaron a partir de las exploraciones de MRI utilizando el Sistema de Clasificación de Pfirrmann (Pfirrmann et al., 2001).

Los segmentos de movimiento espinal que se designaron para el análisis histoquímico y bioquímico se aislaron cortando a través de los cuerpos vertebrales craneal y caudal cerca de las placas finales cartilaginosas usando una sierra para huesos. Estas secciones vertebrales se fijaron en bloque en Histochoice® durante 56 h y se descalcificaron en varios cambios de ácido fórmico al 10% en formalina tamponada neutra al 5% durante 2 semanas con agitación constante hasta que se confirmó la descalcificación completa utilizando un gabinete de rayos X Faxitron HP43855A (Hewlett Packard, McMinnville, Estados Unidos).

Múltiples cortes sagitales de las muestras descalcificadas, de aproximadamente 5 mm de grosor, se deshidrataron a través de soluciones de etanol graduadas mediante métodos histológicos estándar y se incluyeron en cera parafínica.

Las secciones de parafina de 4 µm de espesor se montaron en portaobjetos de microscopio de vidrio Superfrost Plus (Menzel-Glaser), se secaron a 85 °C durante 30 min y luego a 55 °C durante la noche. Luego, las secciones se desparafinizaron en xileno (4 cambios x 2 min) y se rehidrataron a través de lavados de etanol graduados (100-70% v/v) en agua del grifo. Una sección de todos los bloques preparados a partir de las rodajas sagitales se tiñó con hematoxilina y eosina. La sección codificada fue examinada por un histopatólogo independiente que comparó las características histológicas de aquellos niveles que fueron sometidos a inyección de enzimas sólo con aquellos que fueron inyectados con enzimas y posteriormente recibieron MPC. Se usó un sistema de clasificación semicuantitativo de cuatro puntos para evaluar las características microscópicas de todo el disco como se muestra en la Tabla 2. También se prepararon tinciones de tinte adicionales que incluyen azul alcian (para especies de glicosaminoglicanos en general) y safranina O (específica para especies de sulfato de condroitina) para demostrar el grado de síntesis de la matriz del disco.

Los procedimientos de inmunohistoquímica también se realizaron utilizando un casete de Sequenza y un sistema de inmunotinción Coverplate descartable como se describió anteriormente (Melrose et al., 2003; Melrose et al., 2002; Melrose et al., 2000; Melrose et al., 2002a; Melrose et al., 1998; Panjabi et al., 1985; Race et al., 2000; Smit, 2002). La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó inicialmente incubando las secciones de tejido con 3% de H₂O₂. Luego se predigieron con combinaciones de condroitinasa ABC (0,25 U/ml) en tampón de Tris-acetato 20 mM pH 8,0 durante 1 hora a 37 °C, hialuronidasa testicular bovina 1000 U/ml durante 1 hora a 37 °C en fosfato tampón pH 5,0, seguido de tres lavados en Tris-HCl 20 mM pH 7,2 NaCl 0,5M (TBS) o proteinasa-K (DAKO S3020) durante 6 minutos a temperatura ambiente para exponer los epítomos antigénicos. Luego, los tejidos se bloquearon durante 1 h en suero porcino normal al 20% y se sondaron con una serie de anticuerpos primarios contra proteoglicanos y colágenos grandes y pequeños (Tabla 3). Las secciones de control negativo también se procesaron omitiendo el anticuerpo primario o sustituyendo un anticuerpo primario compatible con isotipo irrelevante por el anticuerpo primario auténtico de interés. Para esta etapa, se utilizaron anticuerpos de control IgG (DAKO Code X931) o IgM (DAKO Code X942) de ratón compatible con el isotipo comercial (DAKO). Los productos DAKO X931 y X942 son anticuerpos monoclonales IgG₁ de ratón (clon DAK-GO1) e IgM monoclonal (clon DAK-GO8) dirigidos contra glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, una enzima que no está presente ni es inducible en tejidos de mamíferos. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina para la detección utilizando 0,05% de diclorhidrato de 3,3'-diaminobencideno y 0,03% de H₂O₂ en TBS, Nova RED, nitroazul de tetrazolio / fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo / yodo violeta de nitrotetrazolio (NBT/BCIP/INT) o New Fuchsin como sustratos. Los portaobjetos teñidos se examinaron mediante microscopía de campo brillante y se fotografiaron utilizando un sistema de cámara digital de fotomicroscopio Leica MPS 60.

Tabla 2: Sistema de clasificación de los cambios histológicos en los discos lumbares inferiores (placa terminal ósea BEP, placa terminal cartilaginosa CEP)

Grado	Anillo fibroso	Núcleo pulposo	Placa terminal cartilaginosa	Márgenes / hueso subcondral
1	Láminas intactas Matriz interlamelar estrecha	Homogeneidad Ausencia de hendiduras	Espesor uniforme Acoplamiento intacto al hueso	Grosor parejo de BEP Solo hueso lamelar
	Unión de anillo intacto Vasos solo en el exterior 1/3		Calcificación uniforme <1/5 de profundidad Distribución celular uniforme	Unión distinta con CEP Pocas intrusiones vasculares en CEP
2	Separación y desorganización lamelar menor. Ampliación menor de la matriz Desorganización menor de la unión Lesión del borde sin reacción reparadora	Hendidura menor Necrosis de células menores Desplazamiento posterior menor de anillo Formación de condrona menor	Adelgazamiento menor del cartílago Pequeñas fisuras transversales Engrosamiento irregular de la zona calcificada Pocos canales vasculares invasores condronas pequeñas.	BEP ligeramente desigual Nódulos de Schmorl Remodelación mínima de BEP Pequeños osteofitos marginales
3	Ampliación moderada de la matriz Moderada fisura de la unión Desgarros radiales que no implican 1/3 metaplasia condroide mínima externa Degeneración quística Vasos en lesión de 1/3 de borde externo y medio con reacción reparadora menor	Hendidura moderada Necrosis celular moderada Degeneración quística Desplazamiento posterior dentro del anillo Extensión centripeta del colágeno Formación de condrona	Adelgazamiento del cartílago marcado Engrosamiento marcado de la zona calcificada Muchas fisuras transversales Muchos canales vasculares Muchas condronas	BEP moderadamente desigual Nódulos vascularizados de Schmorl Engrosamiento trabecular moderado Defecto en las laminillas óseas Tejido de abrosis mínima en los espacios

		moderada		de la médula Osteofitos medianos.
4	Desorganización lamelar extensa Radiación de desgarros que se extienden hacia el exterior 1/3 Metaplasia condroide extensa Vasos en todas las zonas Lesión del borde con reacción reparadora marcada	Pérdida completa del núcleo Formación de cuerpos sueltos Formación de condrona marcada	Pérdida total de cartílago. Calcificación del cartílago residual.	Marcado BEP desigual Nodos de Schmorl osificados Osteofitos grandes Engrosamiento trabecular marcado Fibrosis marcada de los espacios medulares Formación de cartílago

Tabla 3. Anticuerpos primarios frente a proteoglicano y epítomos de proteínas del núcleo de colágeno

Epítomo de anticuerpo primario	Clon (isotipo)	Referencias
PGs grandes		
Agregano	AD 11-2A9 (IgG)	26,30
Versicano	12C5 (IgG)	26,28
Colágeno		
Tipo I	I8H5 (IgG ₁)	23,28
Tipo II	II-4CII (IgG ₁)	28
Epítomo de anticuerpo primario	Clon (isotipo)	Referencias
Tipo IV	CIV-22 (IgG ₁)	28
Tipo VI	Policlonal de conejo	28
Tipo IX	Mouse monoclonals D1-9 (IgG ₁), B3-1 (IgG _{2b})	35

5 Las muestras de anillo fibroso y núcleo pulposo se diseccionaron de los bloques procesados cortados en dados finos y se liofilizaron porciones representativas de la zona de tejido de peso húmedo conocido hasta peso constante. Las porciones por triplicado (1-2 mg) de los tejidos secos se hidrolizaron en HCl 6 M a 110 °C durante 16 h y las alícuotas de los digeridos neutralizados se analizaron para determinar la hidroxiprolina como una medida del contenido de colágeno en los tejidos (Sakai et al., 2005). Las porciones por triplicado de tejidos secos (~2 mg) también se digirán con papaína y se analizarán alícuotas del tejido solubilizado en busca de glicosaminoglicano sulfatado utilizando el colorante metacromático azul de 1,9-dimetilmetileno como medida de PG (Sakai et al., 2005).

15 Los segmentos de movimiento se envolvieron en una gasa empapada en solución salina, se sellaron en bolsas de polietileno de doble espesor y se congelaron a -30 °C hasta la prueba biomecánica. Se ha demostrado que este tratamiento no altera las características biomecánicas del tejido (Panjabi et al., 1985). Se realizaron pruebas biomecánicas para medir la rigidez de cada disco en compresión axial, flexión, extensión, flexión lateral y torsión axial en condiciones definidas controladas por ordenador que se aproximan a la carga fisiológica (Panjabi et al., 1985; Race et al., 2000; Smit, 2002; Wilke et al., 1999). Los detalles completos del protocolo de prueba están documentados en otra parte (Panjabi et al., 1985; Race et al., 2000; Smit, 2002; Wilke et al., 1999). Las muestras para la prueba (unidades espinales funcionales, FSU) comprendían dos vértebras adyacentes, el disco intermedio y los ligamentos asociados. Se probaron tres FSU por columna: un nivel que sólo se degradó con C-ABC, uno en el que el disco se degradó con C-ABC y que posteriormente se trató sólo con ácido hialurónico y el nivel central se degradó con C-ABC y que posteriormente se trató con ácido hialurónico y con MPC. Cada FSU se montó en dos copas de aleación de aluminio y se aseguró con tres pernos y cemento dental de polimetacrilato en frío (Vertex SC Self Curing, Dentimex BV, Zeist, Holanda). Se tuvo cuidado de asegurar que la línea media del disco intervertebral se posicionara horizontalmente. Los segmentos de movimiento se centrarán en las copas colocando una clavija a través del canal vertebral en un agujero en una de las copas. Todas las pruebas se realizaron en un baño de agua salina mantenido a 37 °C. Antes del comienzo de las pruebas, cada FSU se cargará previamente a una tensión de 0,5 MPa hasta que se

logre un estado reproducible de hidratación. Esto se usó como la línea de base antes de cada prueba. La tensión de precarga de 0,5 MPa simula una posición relajada y se basó en la medición in vivo de la presión intradiscal.

5 Las pruebas mecánicas se realizaron utilizando una máquina de pruebas de materiales servohidráulicos dinámicos modelo 8511 (INSTRON Pty Ltd, High Wycombe, Reino Unido) equipada con una celda de carga de 'seis grados de libertad' para permitir el monitoreo y control simultáneos de las fuerzas en los tres planos. La máquina estaba controlada por un ordenador personal y un software de diseño personalizado que también registra y analiza los datos. Los datos de prueba se adquirieron en histéresis estable a partir del final de cinco ciclos de carga sinusoidal de 0,1 Hz en carga axial o control de torsión. Las pruebas se realizaron con compresión axial pura, flexión lateral izquierda y derecha, flexión/extensión combinada y torsión axial pura.

15 La compresión axial pura a 200N se produjo en la FSU con poca o ninguna flexión o flexión que acompañaba a la carga. Todas las pruebas de compresión se realizaron mediante contacto puntual en la superficie de la copa craneal. El eje neutro de flexión (NAB) se determina aplicando una carga cíclica a la articulación a través de un punto en la copa de aleación de aluminio que sostiene la muestra para lograr una flexión insignificante. Este proceso de prueba y error permite la compresión axial más pura posible con un contacto de carga de punto rígido. A pesar de la ligera variabilidad entre los especímenes, este punto se encuentra en el plano sagital aproximadamente 10 mm anterior al canal espinal pero ligeramente posterior al centroide del disco. Las marcas se colocaron 10 mm anterior y posterior y a la izquierda y derecha de la NAB para colocar las cargas de compensación para las pruebas de flexión. Se aplicó una carga de compresión máxima de 200 N en cada punto para producir 2 Nm de flexión y 200 N de compresión axial.

25 La flexión conservadora y las cargas de compresión se eligieron para asegurar que los discos, elementos posteriores, placas finales y otras estructuras ligamentosas no se dañaran. La flexión pura no se produjo utilizando este método de carga. En su lugar, estaba presente una combinación de flexión y compresión axial para las pruebas combinadas de flexión/extensión y flexión lateral. Creemos que esto estaba justificado dado que la carga in vivo rara vez produciría flexión pura, sino una combinación de compresión y flexión. En cualquier caso de carga, todas las cargas se aplicaron de manera consistente a cada muestra, lo que permite comparaciones directas de la respuesta mecánica.

30 Para las pruebas de torsión se aplicarán 5 Nm de torsión axial pura. Esto estaba dentro del rango fisiológico de los pares estimados y aplicados en otros estudios. Se utilizará un novedoso sistema de prueba de torsión diseñado a medida para aplicar la torsión pura a cada FSU. Este sistema utiliza un mecanismo de placa de tornillo/empuje para convertir el desplazamiento axial del accionador Instron en rotación pura. Una tabla de cojinetes X-Y garantiza que la FSU no tenga un centro de rotación fijo impuesto durante la prueba. Esto es importante, ya que el centro de rotación no es constante durante la rotación axial. La copa inferior se fijó a un transductor de par de torsión con la copa superior fijada a la mesa de rodamientos X-Y y al mecanismo de la placa de tornillo/empuje.

40 Todas las pruebas se realizaron inicialmente en la FSU intacta. Una vez completado, el disco se aisló cortando a través de los elementos posteriores utilizando una pequeña hoja de sierra que atravesó el foramen neural y cortando posteriormente. Este corte atraviesa las articulaciones cigapofisarias y los ligamentos interespinoso y supraespinoso, dejando intactos el disco intervertebral, los ligamentos posterior y longitudinal. El corte se realizó en forma de cuña y se incrementó posteriormente para garantizar que no haya contacto entre las articulaciones cigapofisarias. Todas las pruebas se repitieron en el disco aislado.

45 El análisis de los datos incluyó parámetros como la rigidez en la región lineal durante el quinto ciclo de carga, la histéresis y la energía de deformación y la extensión de la zona neutral. Los datos de los niveles de control se compararon con los niveles degenerados/inyectados con MPC y se realizaron análisis de varianza de medidas repetidas en cada uno de los parámetros biomecánicos.

50 Resultados

Todos los animales en los grupos inyectados con MPC mantuvieron un peso corporal normal y no mostraron evidencia de efectos secundarios adversos durante la duración del experimento.

55 En los discos inyectados con condroitinasa-ABC, el agotamiento de PG por esta enzima produjo una disminución del 38% en el índice de altura del disco (DHI) en todos los discos inyectados después de 3 meses. Esta pérdida de altura del disco confirmó el estado degenerado del núcleo pulposo antes de los tratamientos y hasta ahora se conoce como DHI pre-MPC. Tres meses después de la inyección de HA o MPC + HA en los discos degenerados no se produjo ningún aumento significativo en el DHI en relación con el DHI anterior al MPC (Figura 26). Sin embargo, a los 6 meses posteriores al tratamiento, los discos inyectados con MPC + HA mostraron un aumento medio del 52% en el DHI en relación con las puntuaciones correspondientes a los 3 meses (Grupo 1) (Figuras 26 y Tabla 4). Por el contrario, los discos inyectados con HA sólo mostraron una mejoría media del 23,1% en las puntuaciones DHI durante el mismo período (Figuras 26 y Tabla 4). Significativamente, el DHI promedio de los discos inyectados con bajo contenido de MPC + HA fue comparable 6 meses después del tratamiento con los puntajes DHA para los discos de control inyectados con ABC (sin degeneración) sin condroitinasa (Figura 26).

65 En la Tabla 4 se muestra un análisis estadístico del DHI durante 6 meses respecto a 3 meses después de la inyección

de HA o MPC + HA.

5 La administración de MPC ovino junto con un portador adecuado, como el ácido hialurónico de alto peso molecular (HA), en el núcleo pulposo de las IVD degeneradas creadas experimentalmente, se ha demostrado en los experimentos actuales para acelerar la regeneración de la matriz extracelular del disco según lo evalúa en forma radiográfica por la recuperación de la altura del disco. Esta interpretación se basa en el supuesto de que en la columna vertebral cargada la altura del disco se mantiene por la presencia dentro del NP y el anillo interno de altas concentraciones de proteoglicanos de matriz que, junto con sus moléculas de agua unidas, confieren una alta presión de hinchamiento a esta estructura. De hecho, el uso de la condroitinasa-ABC para inducir la degeneración del disco al comienzo de estos experimentos se basó en la capacidad de esta enzima de degradar y eliminar la mayoría de los proteoglicanos de la matriz extracelular de NP.

10 Los datos obtenidos hasta la fecha sugieren que el efecto terapéutico mediado por el MPC es un proceso relativamente lento. En el presente estudio, la dosis de $0,5 \times 10^6$ MPC fue particularmente eficaz.

15 Aunque los experimentos actuales se terminaron 6 meses después de inyectar MPC en el disco, se encontró que el nivel de recuperación de la altura del disco obtenido para las inyecciones de MPC de dosis baja estaba cerca de los valores observados para los controles internos no inyectados con condroitinasa ABC, lo que sugiere que la máxima extensión de la reconstitución de NP se logró durante este período.

20

Tabla 4: Extensión de la restauración de la altura del disco 3 y 6 meses después de la inyección intradiscal de células precursoras mesenquimales (MPC) + Hialuronano (HA) o HA solo en discos lumbares degenerados de ovino

	DHI DE INYECCIÓN PRE-MPC	DHI DE INYECCIÓN 3 MESES DESPUÉS DE MPC	DHI DE INYECCIÓN 6 MESES DESPUÉS DE MPC
	No inyectado Sólo cABC cABC+HA cABC+HA+MPC	No inyectado Sólo cABC cABC+HA cABC+HA+MPC	No inyectado Sólo cABC cABC+HA cABC+HA+MPC
MEDIA	0,054 0,04 0,04 0,04	0,055 0,0416667 0,0433333 0,0383333	0,0566667 0,0516667 0,0533333 0,0583333
Desviación estándar	0,015 0,01 0,01 0,01	0,01 0,014 0,008 0,014	0,015 0,017 0,008 0,007
% de cambio de 3 meses a 6 meses			0,2 23,9 23,1 52,174
Significancia estadística (valores P)			0,83 0,31 0,059 0,0142
P < 0.05 = significativo	DHI = índice de altura de disco	cABC = condroitinasa ABC	

REFERENCIAS

- Aggarwal et al. (2005) *Blood*. 105: 1815 - 1822.
- Ahrens et al. (1993) *DNA Cell Biol*. 12: 871 - 880.
- 5 Allcock et al. (1977) *Macromolecul* 10:824.
- Anseth et al. (2002) *J. Control Release* 78:199-209.
- Appleyard et al. (1999) *Osteoarthritis and Cartilage* 7:281-294.
- Appleyard et al. (2003) *Osteoarthritis Cartilage* 11: 65-77.
- Arnoczky et al. In: *Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues*. Eds, Woo S L-Y and Buckwalter. American
- 10 Academy of Orthopaedic Surgeons, Park Ridge, Ill: 1988, pp. 487-537.
- Bellamy et al. (2006) *Cochrane Database Syst Rev* 2006(2):CD005321
- Brandt (1993) *Agents and Actions* 40: 232 - 234.
- Brandt (1993a) *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 19:29-44.
- Brandt et al. (2000) *Arthritis Rheum*. 43: 1192-1203.
- 15 Bregni et al., *Blood* 80:1418-22.
- Burkhardt et al. (2001) *Osteoarthritis Cartilage* 9: 238-47.
- Cake et al. (2000) *Osteoarthritis Cartilage* 8: 404-411.
- Cake et al. (2003) *Osteoarthritis and Cartilage* 11: 872 - 8.
- Cake et al. (2004) *Osteoarthritis and Cartilage* 12: 974 - 81.
- 20 Cake et al. (2005) *Osteoarthritis Cartilage* 13: 1066-75.
- Cake et al. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2008 (en prensa).
- Dumond et al. (2003) *Arthritis Rheum*. 48: 3009 - 12.
- Englund (2004) *Arthritis Rheum* 50:2811-9.
- Ghosh et al. (1983) *J Orthop Res* 1:153-173.
- 25 Ghosh et al. (1983a) *J Surg Res* 35:461-473.
- Ghosh (1988) In: *Bailliere's Clinical Rheumatology, International Practice and Research*. Ed. P Brooks, Tindall, Saunders, London, UK, pp 309-338.
- Ghosh et al. (1990) *Clin. Orthop*. 252: 101-113.
- Ghosh (1991) *J Rheumatol*. 18:143-6.
- 30 Ghosh et al. (1993) *Curr. Ther. Res*. 54: 703-713.
- Ghosh et al. (1993a) *Semin. Arthritis Rheum*. 22 (Suppl. 1): 18-30.
- Ghosh et al. (1993b) *Semin Arthritis Rheum* 22 (Suppl 1): 31-42.
- Ghosh et al. (1993c) *Agents Actions Suppl* 39: 89-93.
- Ghosh et al (2002) *Semin. Arthritis Rheum*. 32: 10-37.
- 35 Gronthos et al. (1995). *Blood* 85:929-940.
- Gronthos et al. (2003) *Journal of Cell Science* 116: 827-1835.
- Huskinson et al. (1995) *Journal of Rheumatology* 22:1941-6.
- Hwa et al. (2001) *J. Rheumatol*.28: 825-834.
- Jorgensen et al. (1987) *J Bone Joint Surg Br*. 69: 80-3.
- 40 Little et al. (1997) *J Rheumatol*. 24: 2199-2209.
- Lo et al. (2003). *JAMA*. 290:3115 - 3127.
- Masuda et al. (2004) *Spine* 30:5-14.
- McKenzie et al. (1976) *Ann. Rheum. Dis*. 35: 487-497.
- McNicholas et al. (2000) *J Bone Joint Surg Br*. 82: 217-21.
- 45 Melrose et al. (2003) *J Histochem Cytochem* 5:1331-1341.
- Melrose et al. (2002) *Spine* 27:1756-1764.
- Melrose et al. (2000) *Histochem Cell Biol* 114:137-46.
- Melrose et al. (2002a) *Histochem Cell Biol* 117:327-33.
- Melrose et al. (1998) *J Vase Surg* 28:676-686.
- 50 Moon et al. (1984) *Clin Orthop Related Res* 182:264-9.
- Nevitt et al. (1996) *Arch Intern Med* 156: 2073-80.
- Oakley et al. (2004) *Osteoarthritis Cartilage* 12: 667-79.
- Parker et al. (2003) *J. Rheumatol*. 6(2): 116-127.
- Pelletier et al. (2007) *Arthritis Res Ther*. 9: R74.
- 55 Pfirrmann et al. (2001) *Spine* 26:1873-1878.
- Panjabi et al. (1985) *J Orthop Res* 3:292-300.
- Race et al. (2000) *Spine* 25:662-9.
- Richette and Bardin (2004) *Joint Bone Spine* 71:8-23.
- Roos et al. (1998) *Arthritis Rheum* 41: 687-93.
- 60 Roos et al. (2001) *Osteoarthritis and Cart*. 9: 316 - 24.
- Sakai et al. (2005). *Spine* 30:2379 - 87.
- Simmons et al. (1994) *Advances in Bone Marrow Purging and Processing: Fourth International Symposium*, 271-280.
- Smit (2002) *Eur Spine J* 11:137-44.
- Smith and Ghosh (2001) *Experimental models of osteoarthritis in: Osteoarthritis*, Eds: Moskowitz et al. WB Saunders Company; pp 171-199.
- 65 Smith et al. (1997) *Pathol. Biol. [Paris]*. 45: 313-320.

Teichtahl et al. (2005) Medical Hypothesis 65: 312-12.
Wang et al. (2003) Biomaterials 24:3969-3980.
Wilke et al. (1999) Spine 24:755-62.
Zannettino et al. (1998) Blood 92:2613-2628.

5

REIVINDICACIONES

1. Células precursoras mesenquimales (MPC) TNAP⁺ para usar en el tratamiento o la prevención de una enfermedad derivada de la degradación y/o la inflamación del tejido conectivo que es rico en proteoglicanos, en donde la administración de la población celular resulta en la preservación o la generación de cartílago que es rico en proteoglicanos.
2. La población celular para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en las que el tejido conectivo es cartílago.
3. La población celular para uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en las que la población celular se administran a un espacio articular.
4. La población celular para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el espacio articular está en una articulación de rodilla, articulación de cadera, articulación de tobillo, articulación de hombro, articulación de codo, articulación de muñeca, mano o dedo o una articulación del pie o una articulación de disco intervertebral.
5. La población celular para uso de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4, en donde la población celular se administran por inyección intraarticular.
6. La población celular para uso de acuerdo con la reivindicación 1 a 5, en donde la enfermedad es tendinitis, dolor de espalda, degradación del tendón del manguito rotatorio, síndrome del túnel carpiano, síndrome de DeQuervain, discos cervicales y/o lumbares degenerativos, síndrome de intersección, síndrome de la distrofia simpática refleja (RSDS), tenosinovitis estenosante, epicondilitis, síndrome de la salida torácica, atrapamiento del nervio cubital, síndrome del túnel radial, lesión por esfuerzo repetitivo (RSI), osteoartritis, artritis reumatoide, artritis psoriásica, artritis seronegativa, artritis asociada con enfermedad inflamatoria del intestino o espondilitis anquilosante y trastornos degenerados del disco intervertebral.
7. La población celular para uso de acuerdo con la reivindicación 1 a 5, en donde la enfermedad es osteoartritis, artritis reumatoide, tendinitis, dolor de espalda, degradación del tendón del manguito rotatorio, síndrome del túnel carpiano, síndrome de DeQuervain, discos cervicales y/o lumbares degenerativos.
8. La población celular para uso de acuerdo con la reivindicación 1 a 7, que también comprende la administración de ácido hialurónico (HA).
9. La población celular para uso de acuerdo con la reivindicación 1 a 7, en donde la enfermedad derivada de la degradación y/o inflamación del tejido conectivo es un trastorno degenerativo del disco intervertebral y la población celular se administran a una articulación del disco intervertebral.
10. La población celular para uso de acuerdo con la reivindicación 1 a 9, en donde la población celular se cultivan expandidas.
11. La población celular para uso de acuerdo con la reivindicación 1 a 10, en donde la población celular es una población celular alogénica.
12. Uso de MPC TNAP⁺ en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad derivada de la degradación y/o inflamación del tejido conectivo que es rico en proteoglicanos, en donde la administración de la población celular resultan en la conservación o generación de cartílago que es rico en proteoglicanos.

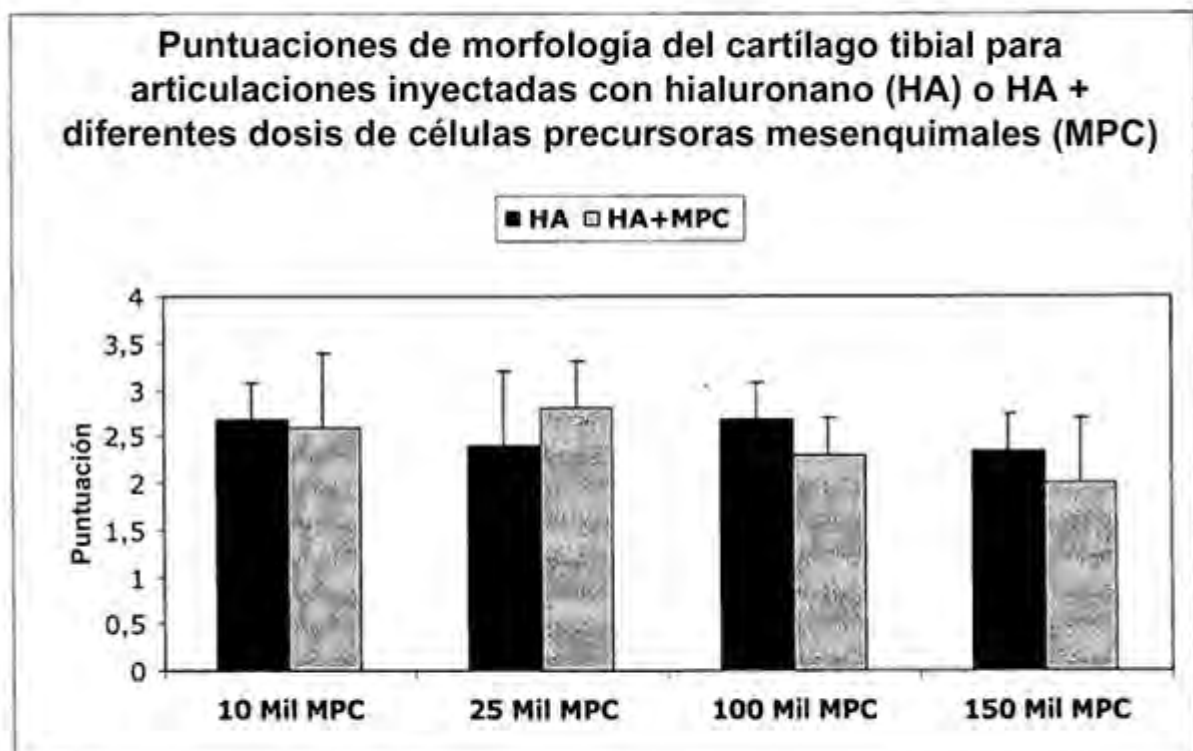
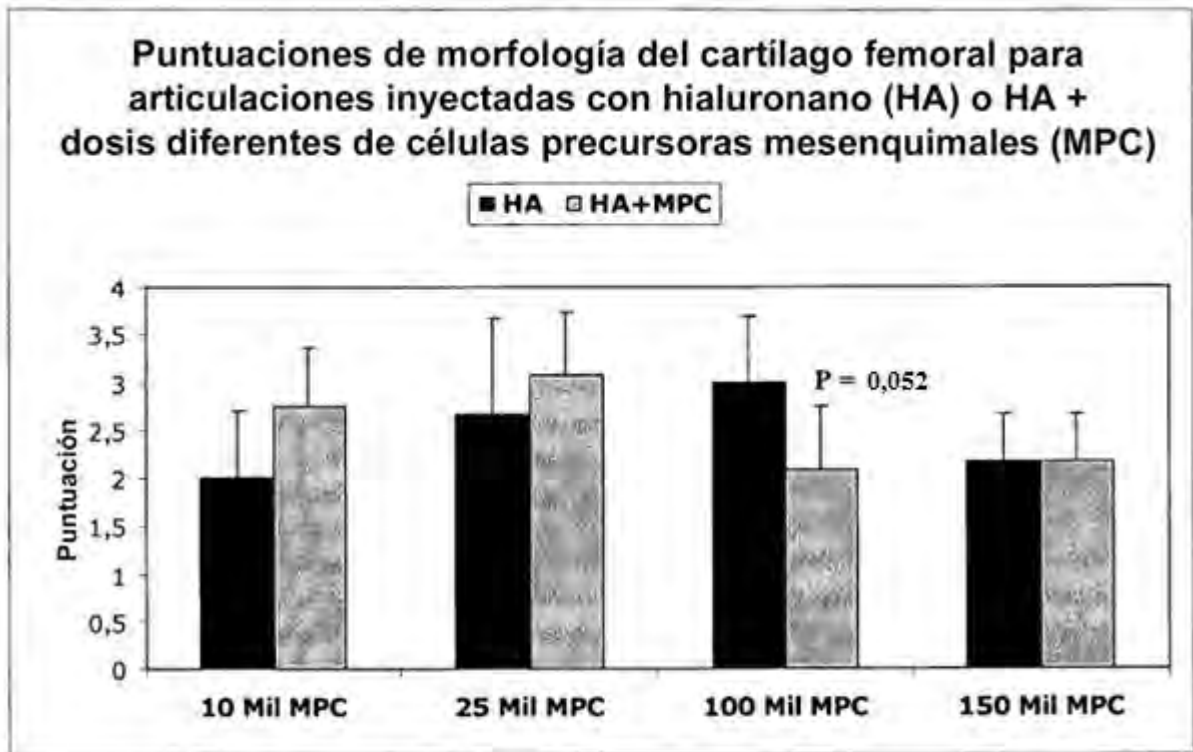


Figura 1

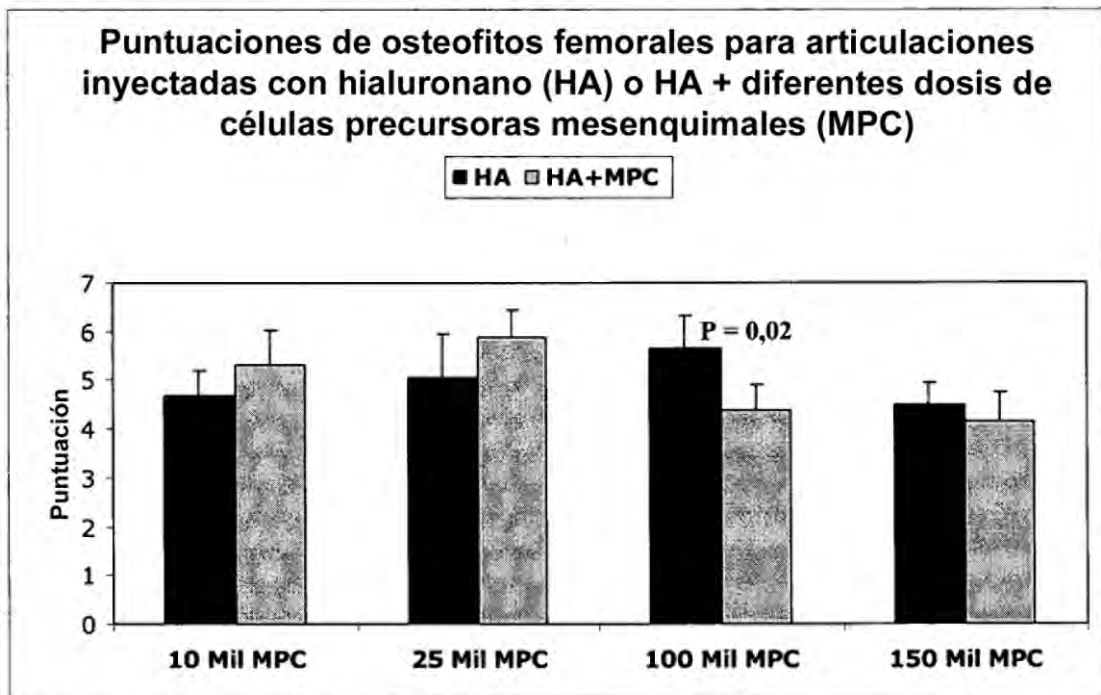


Figura 1 (continuación)

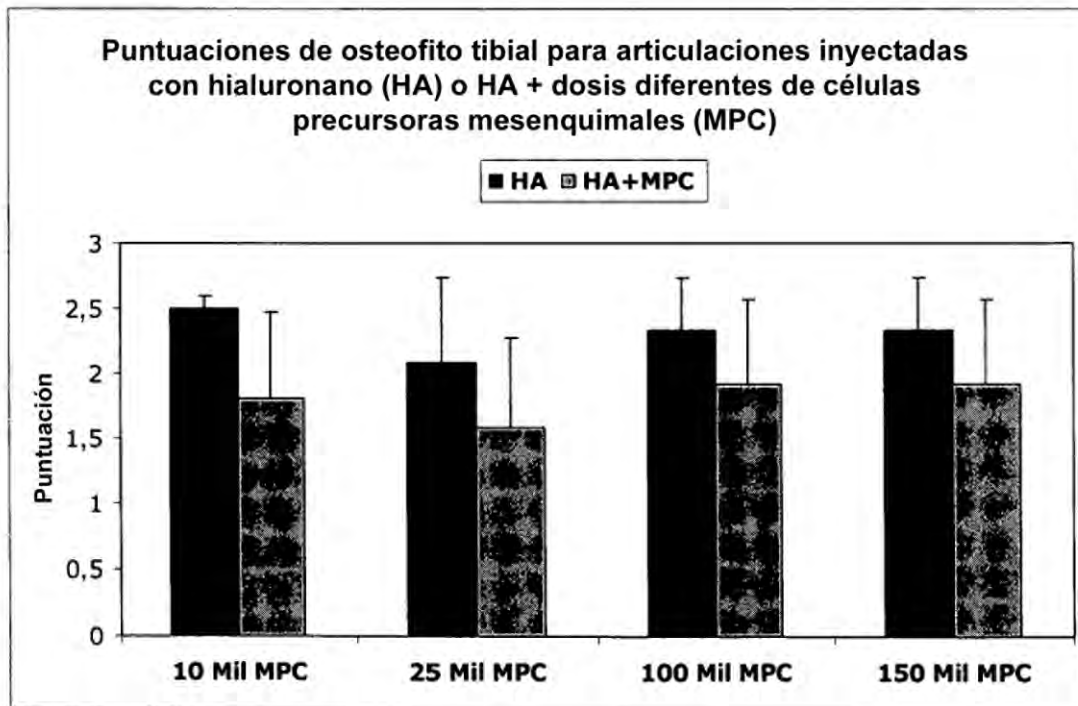
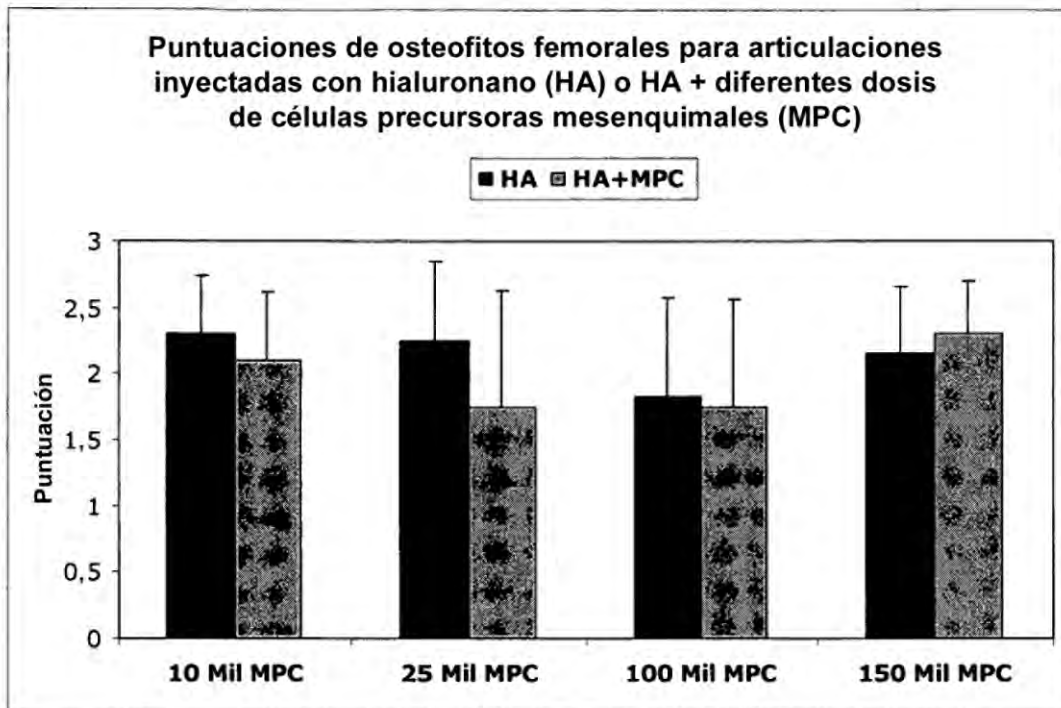


Figura 2

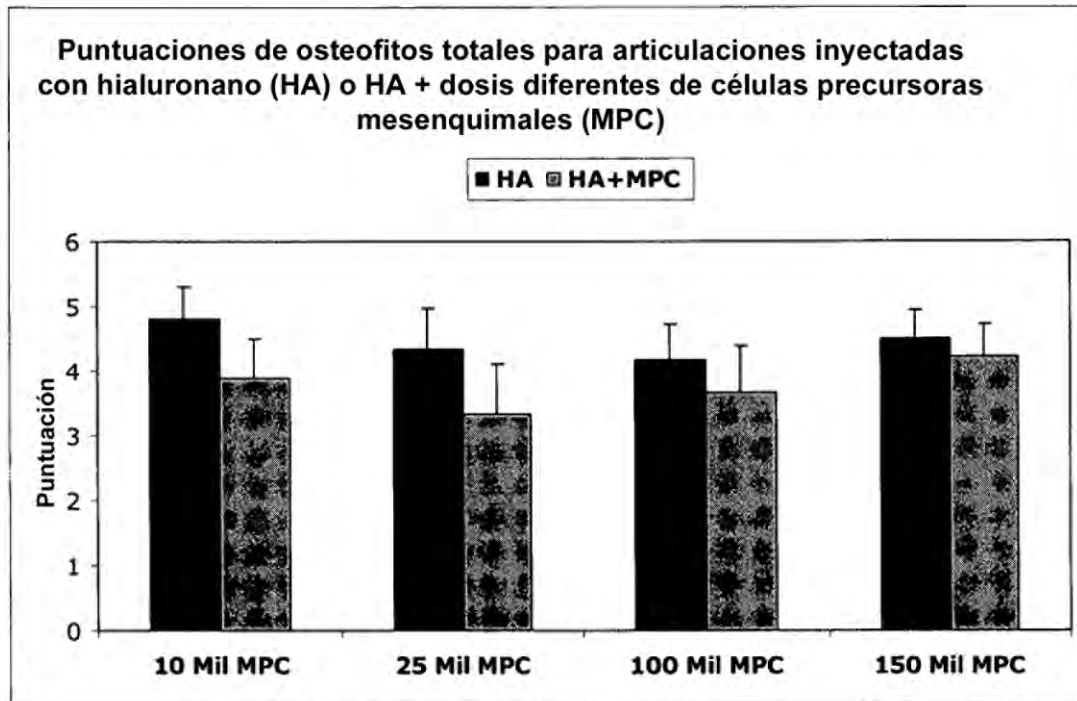


Figura 2 (continuación)

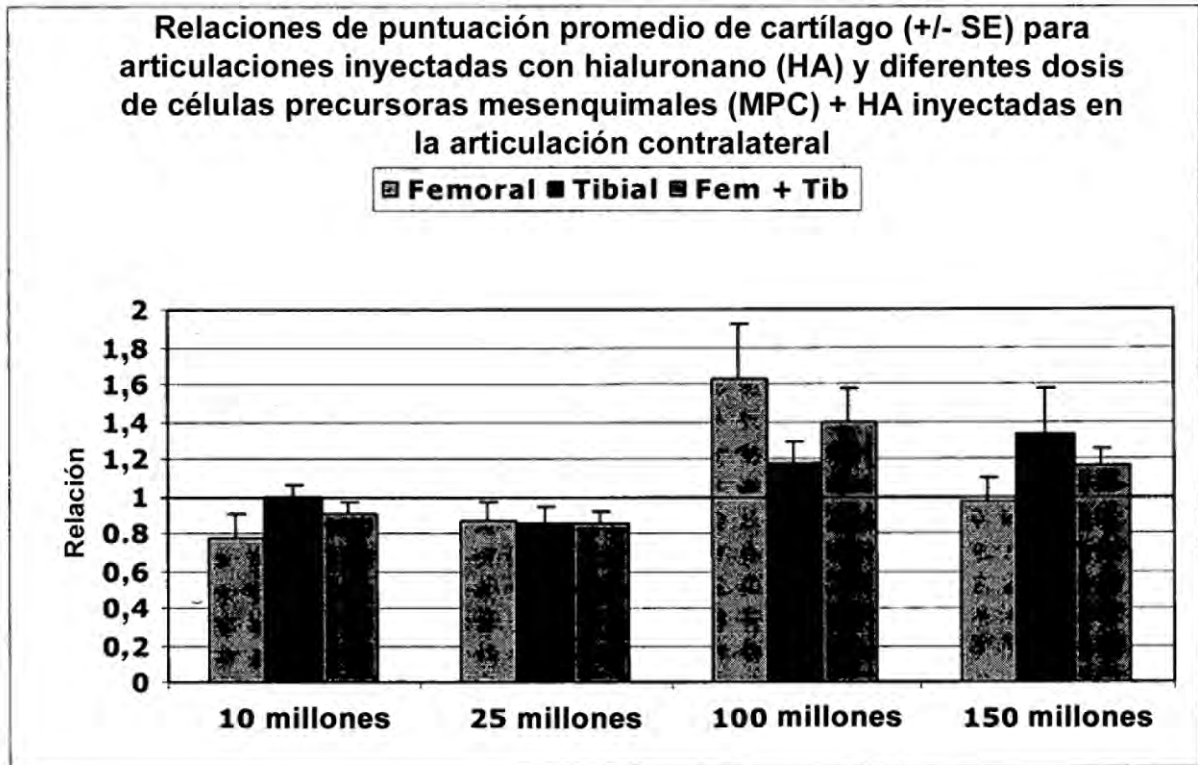


Figura 3

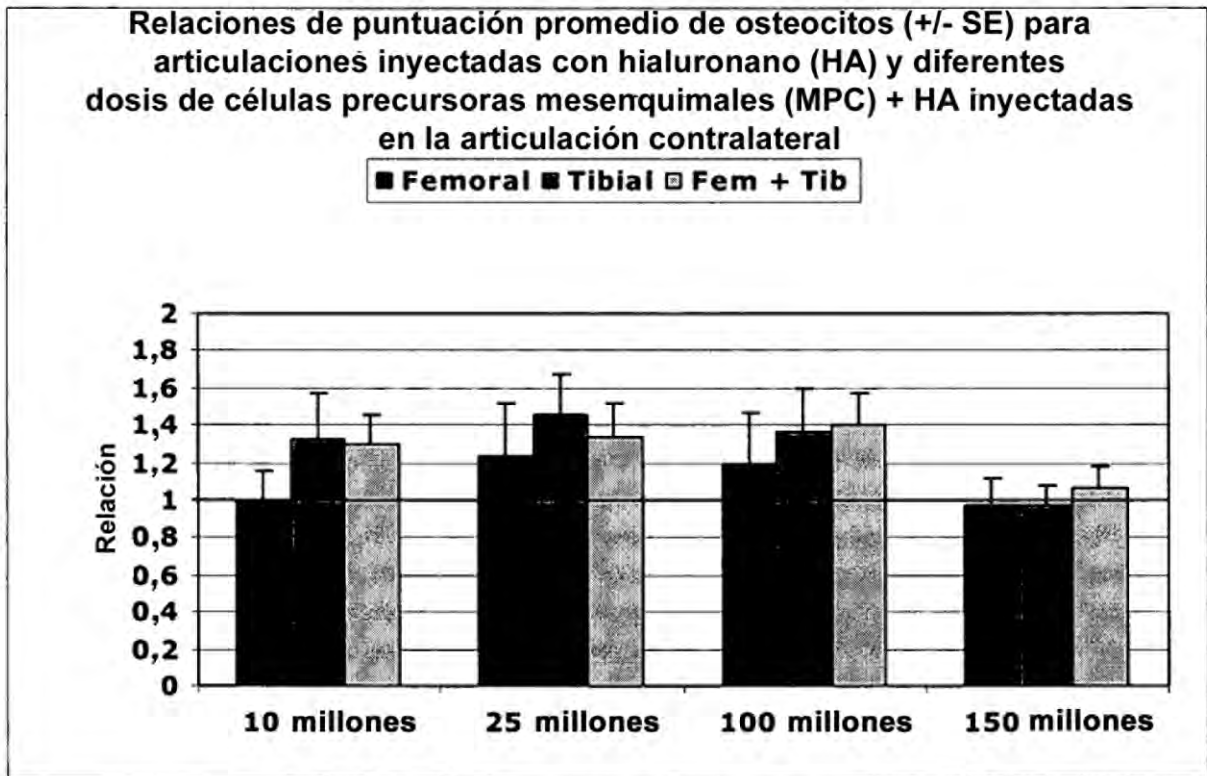


Figura 4

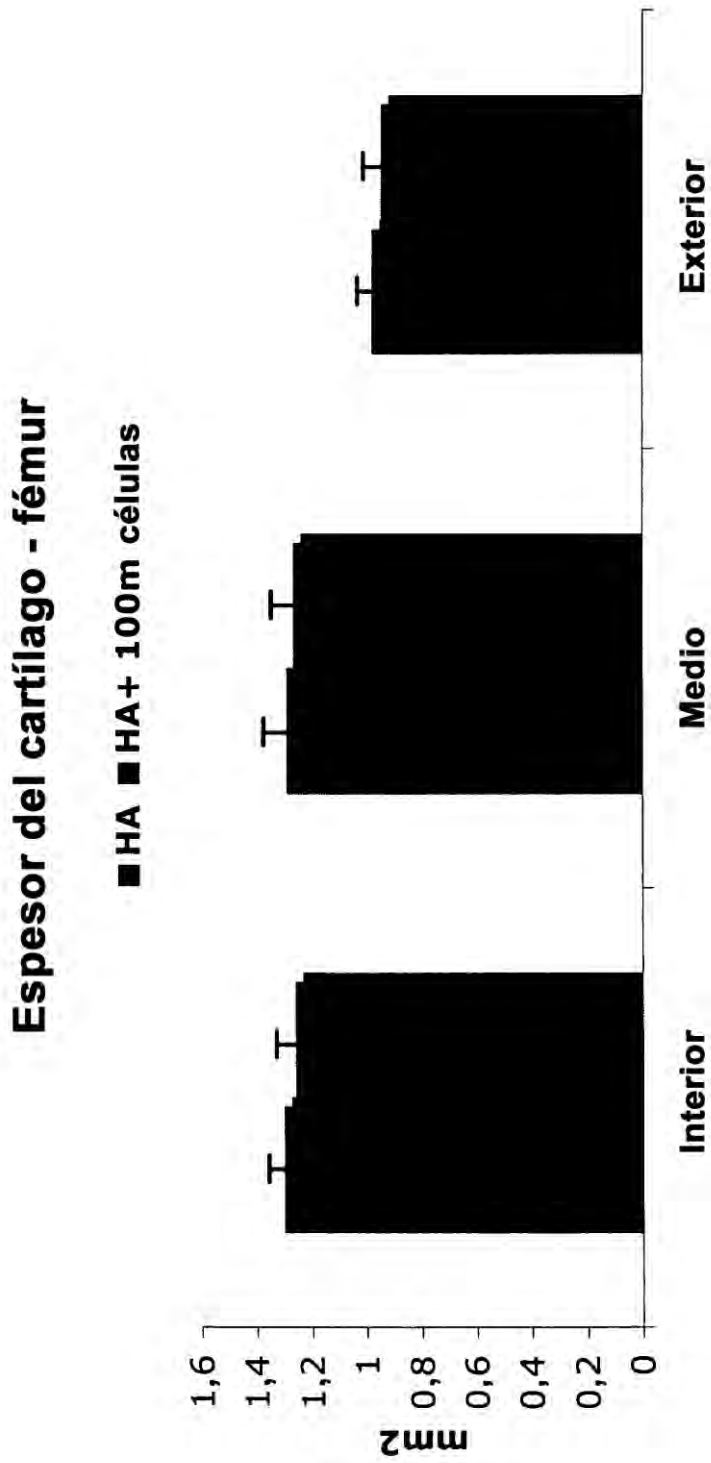


Figura 5

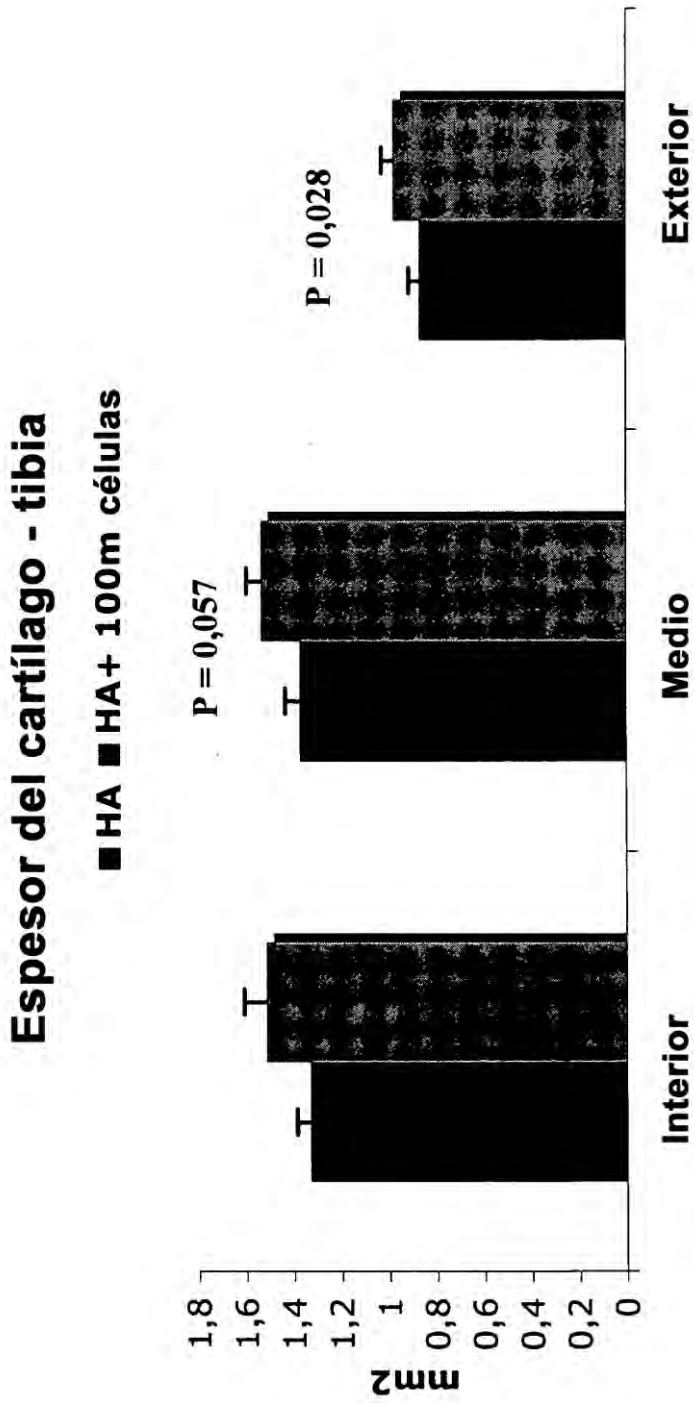


Figura 5 (continuación)

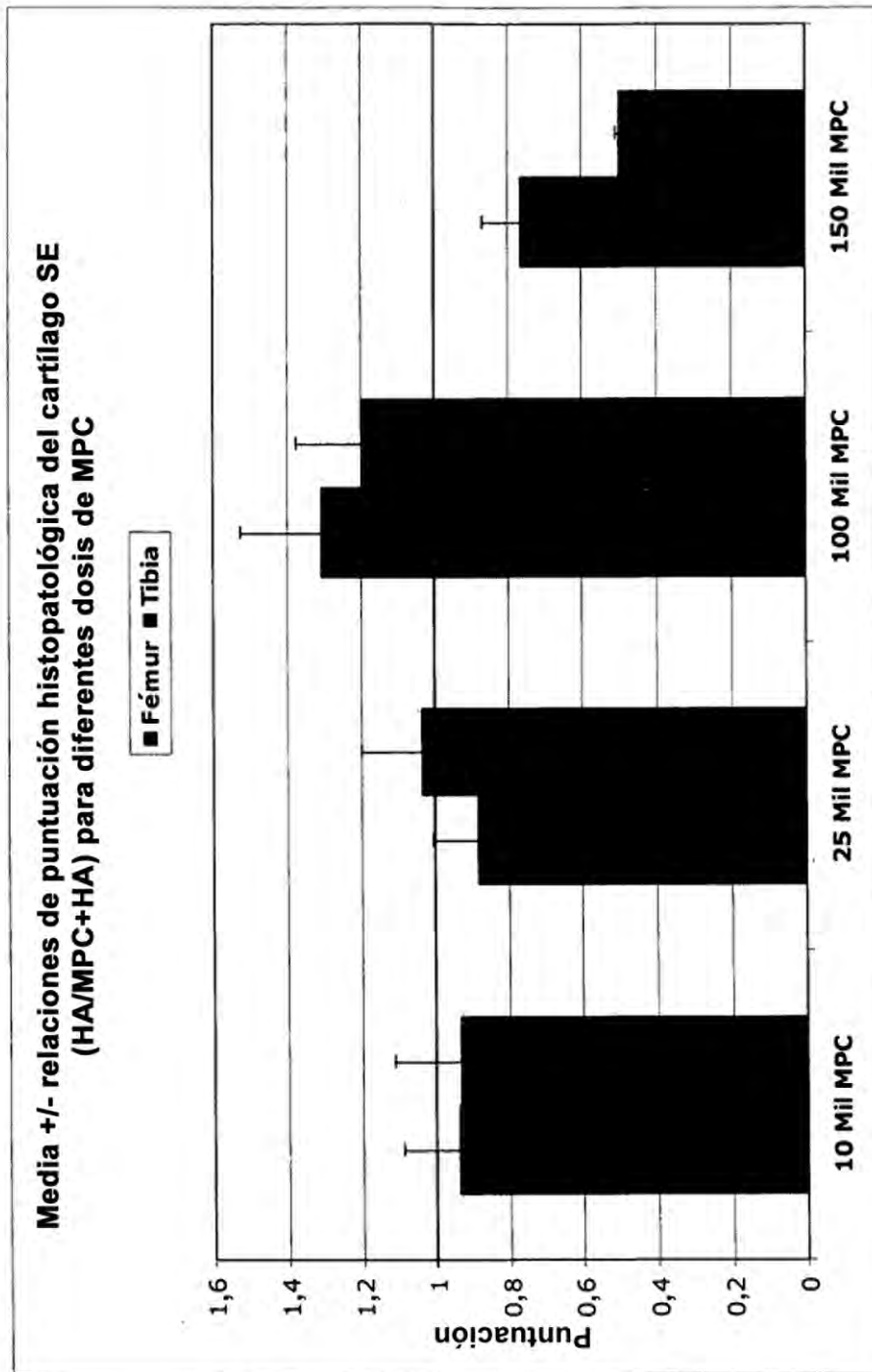


Figura 6

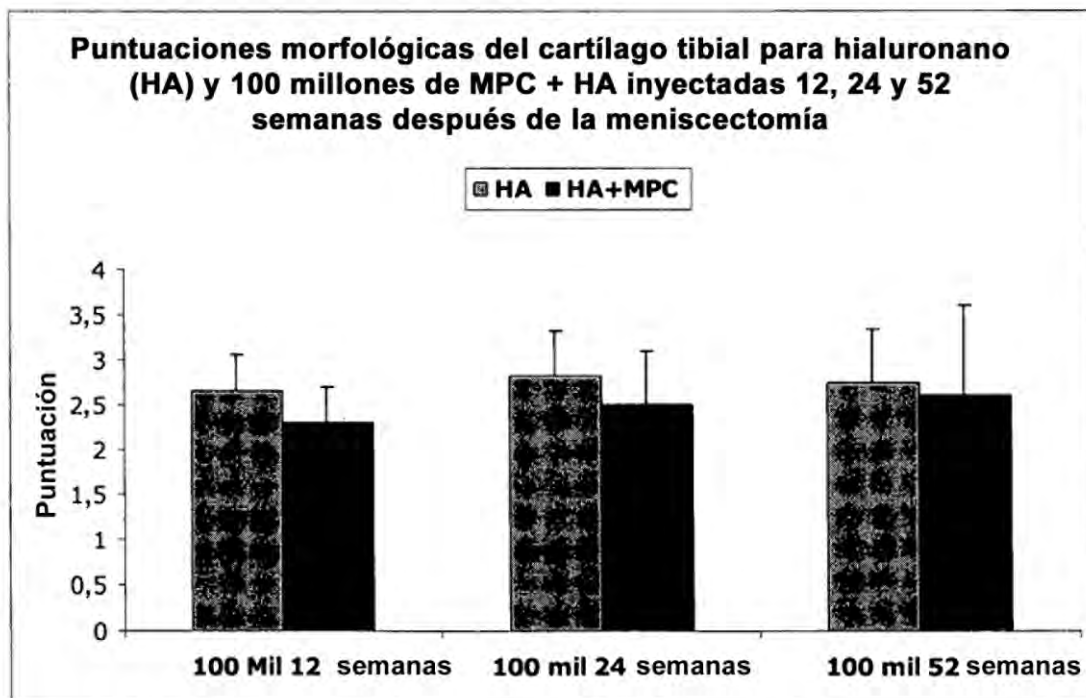
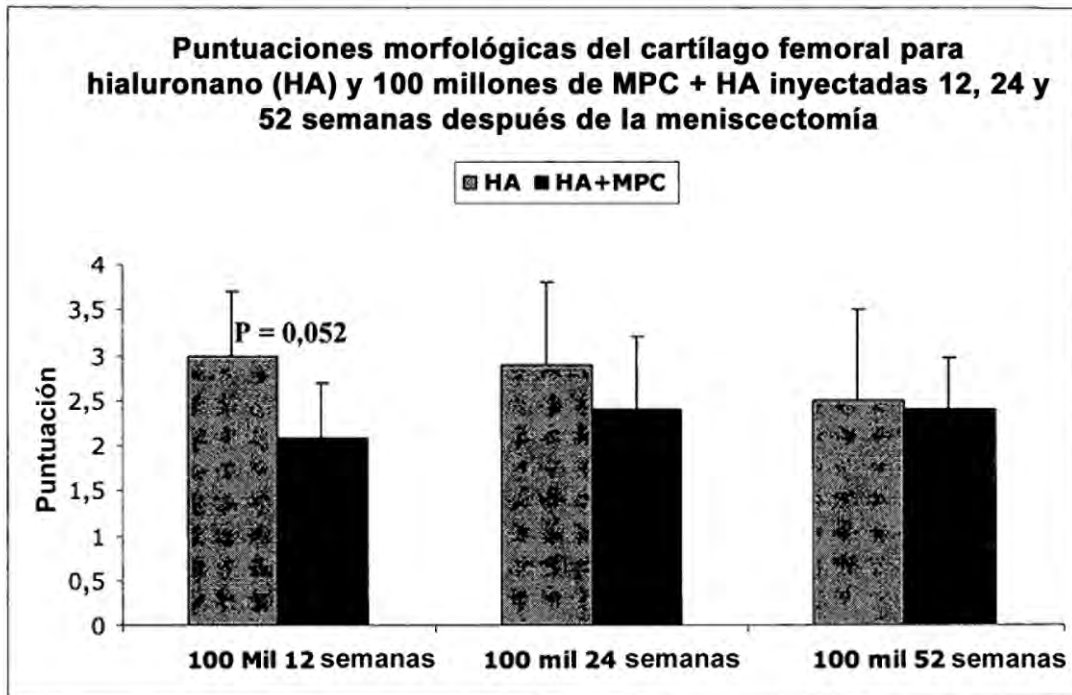


Figura 7

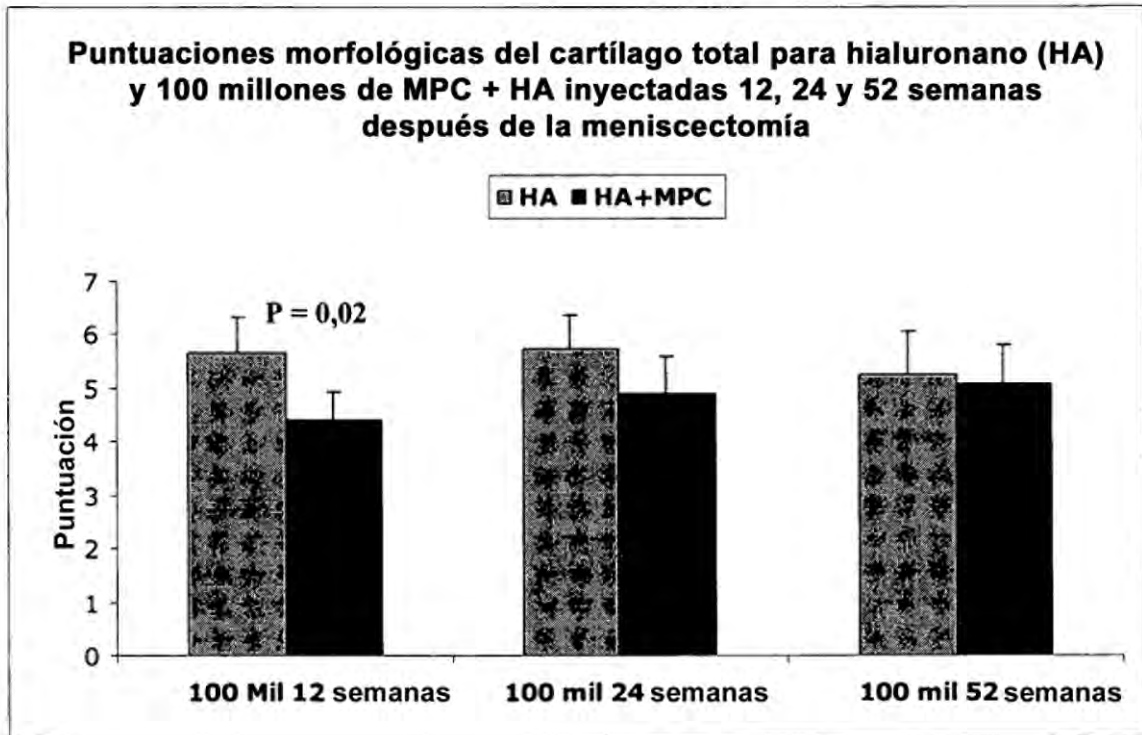


Figura 7 (continuación)

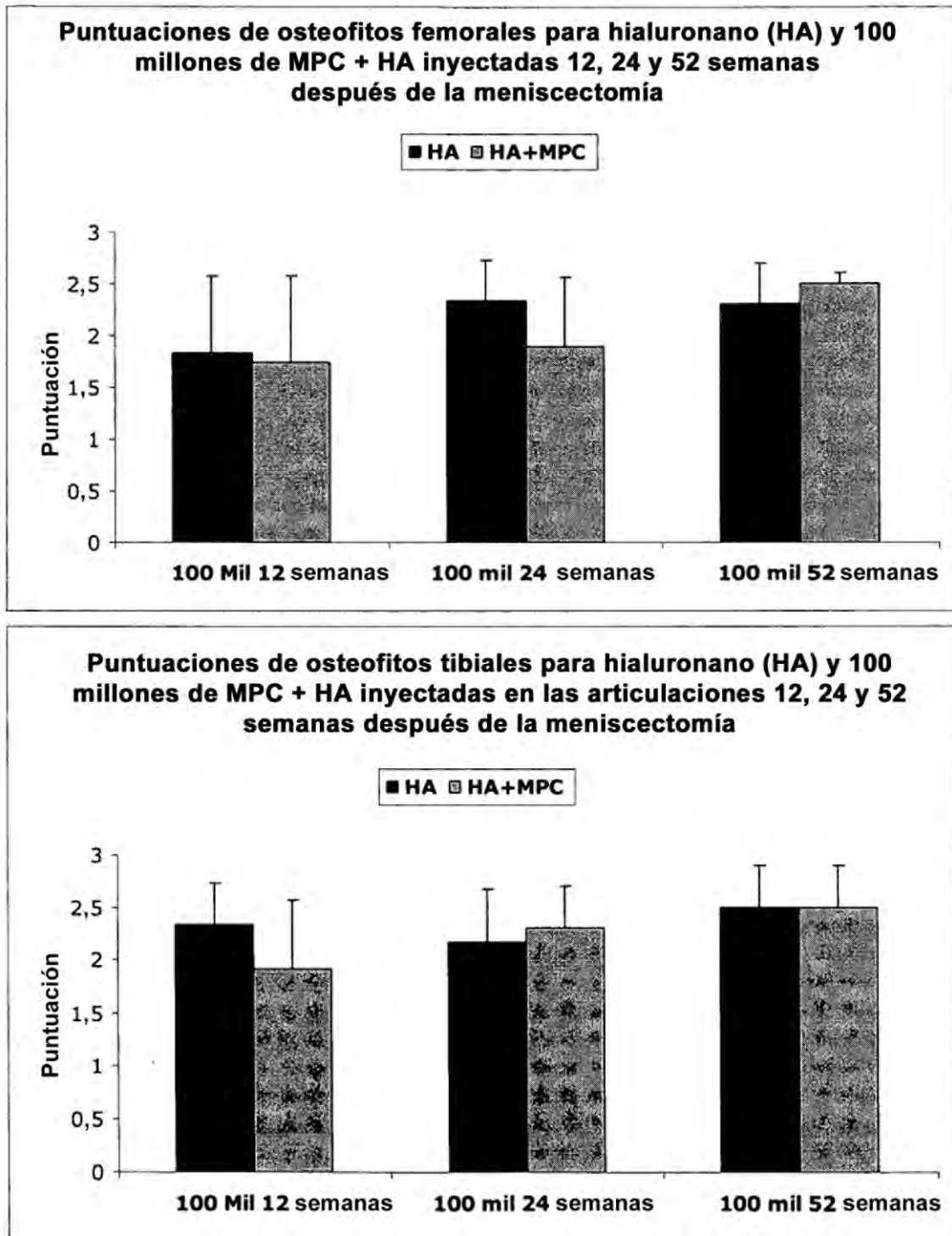


Figura 8

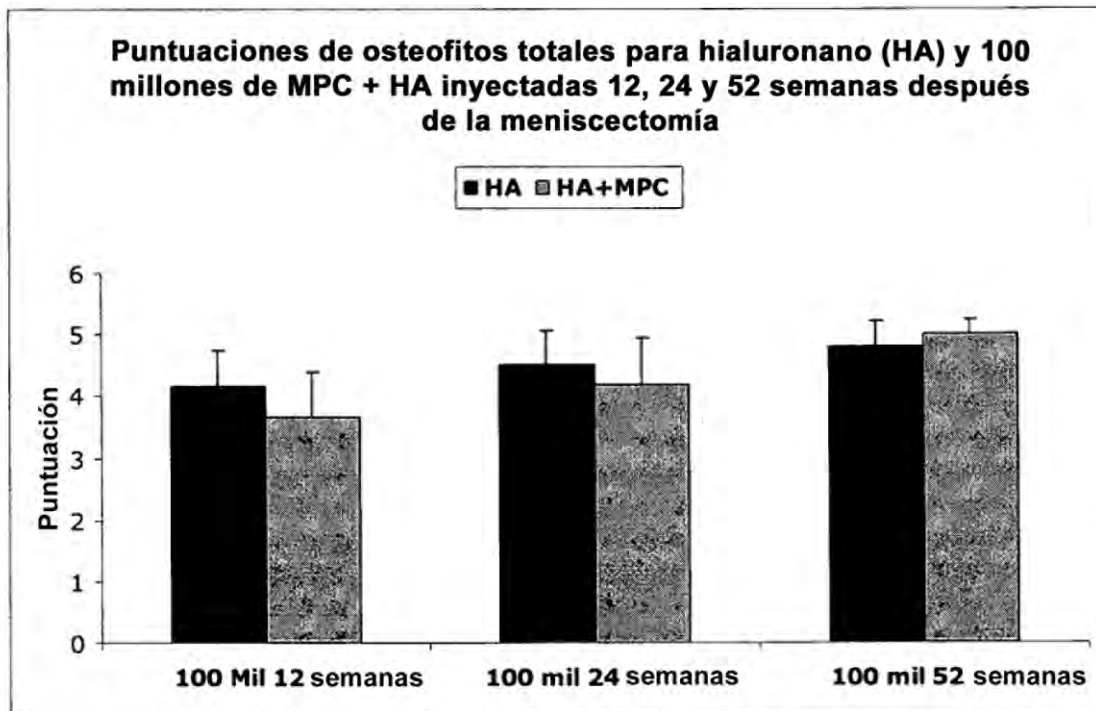


Figura 8 (continuación)

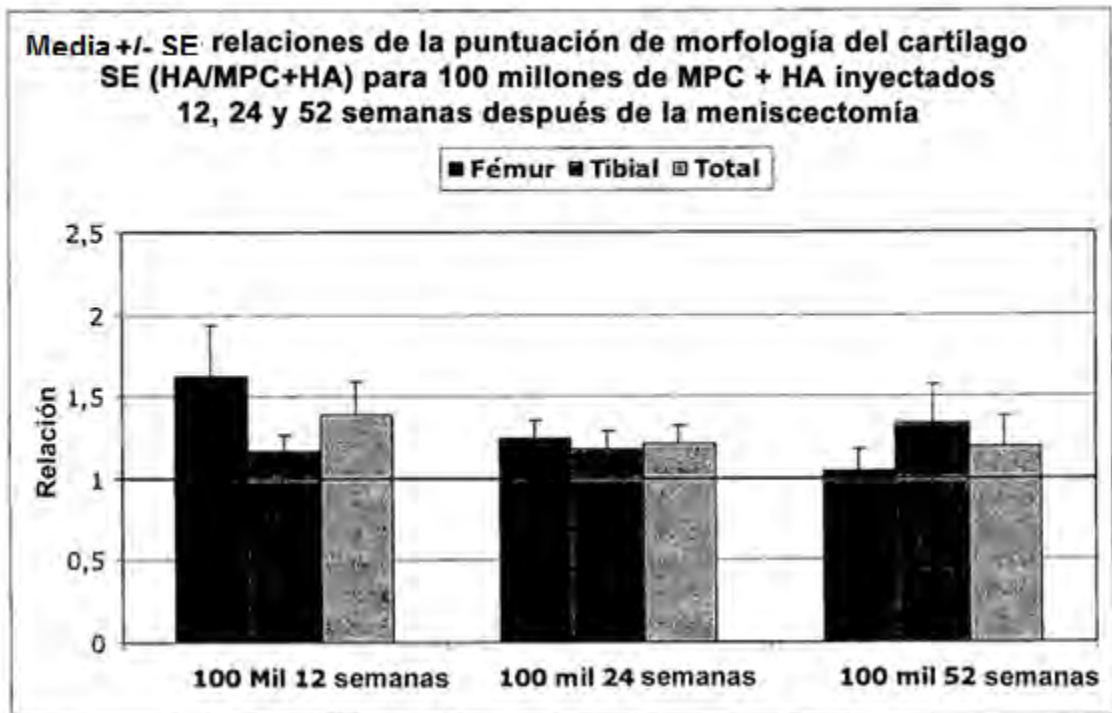


Figura 9

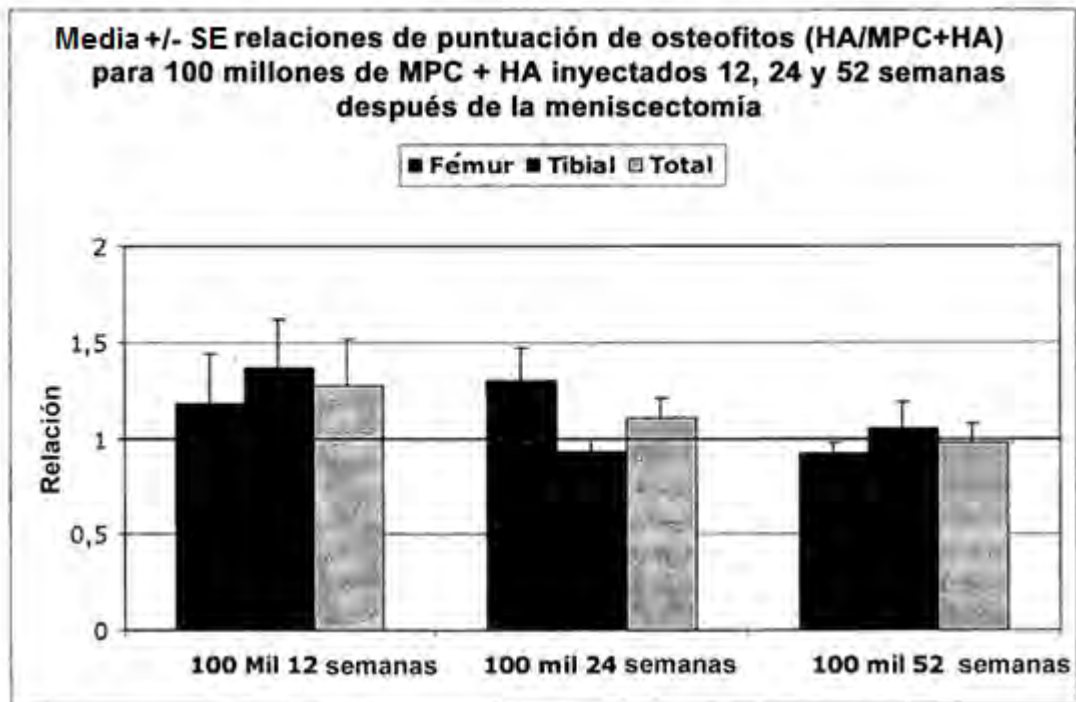


Figura 10

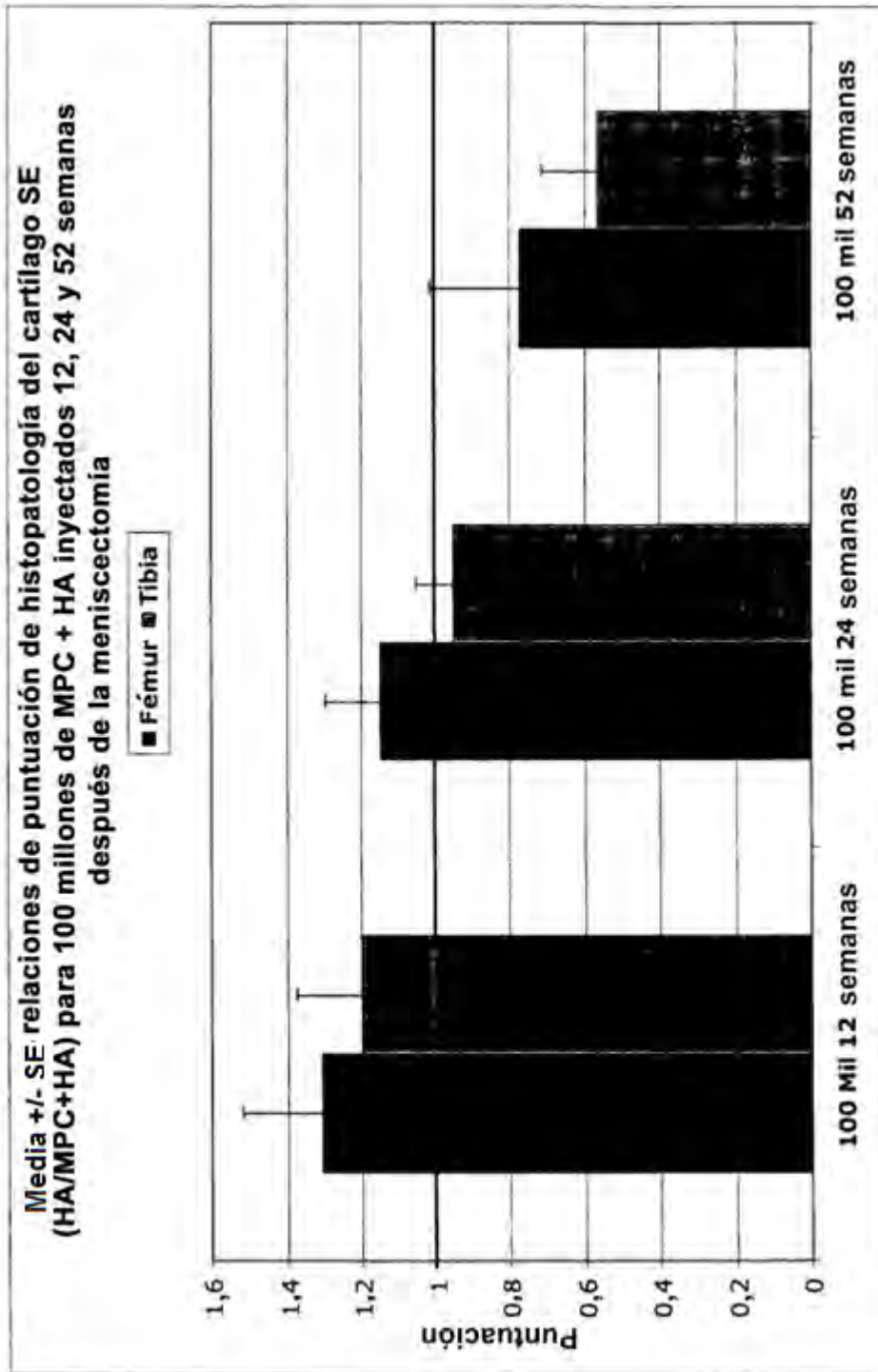


Figura 11

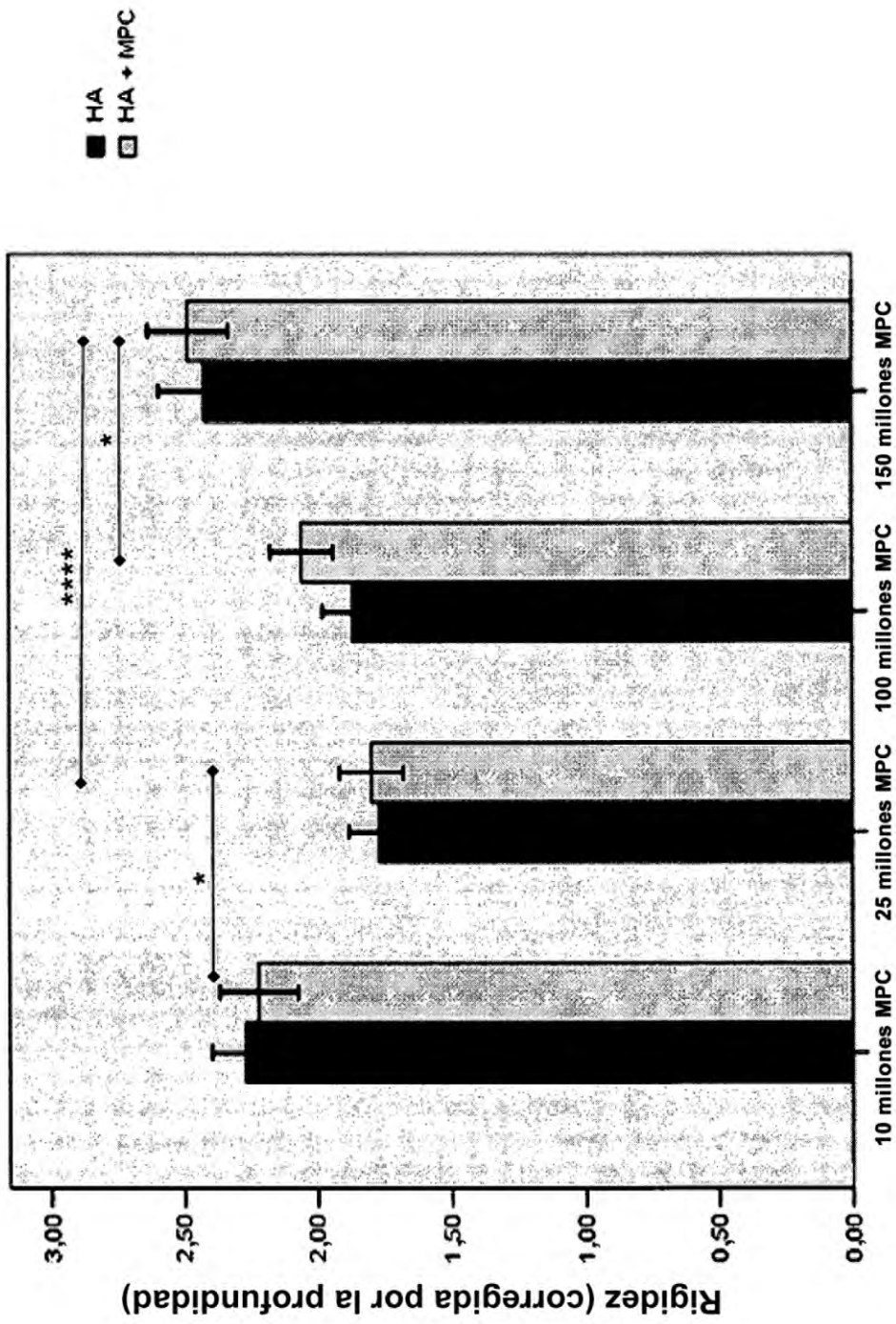


Figura 12

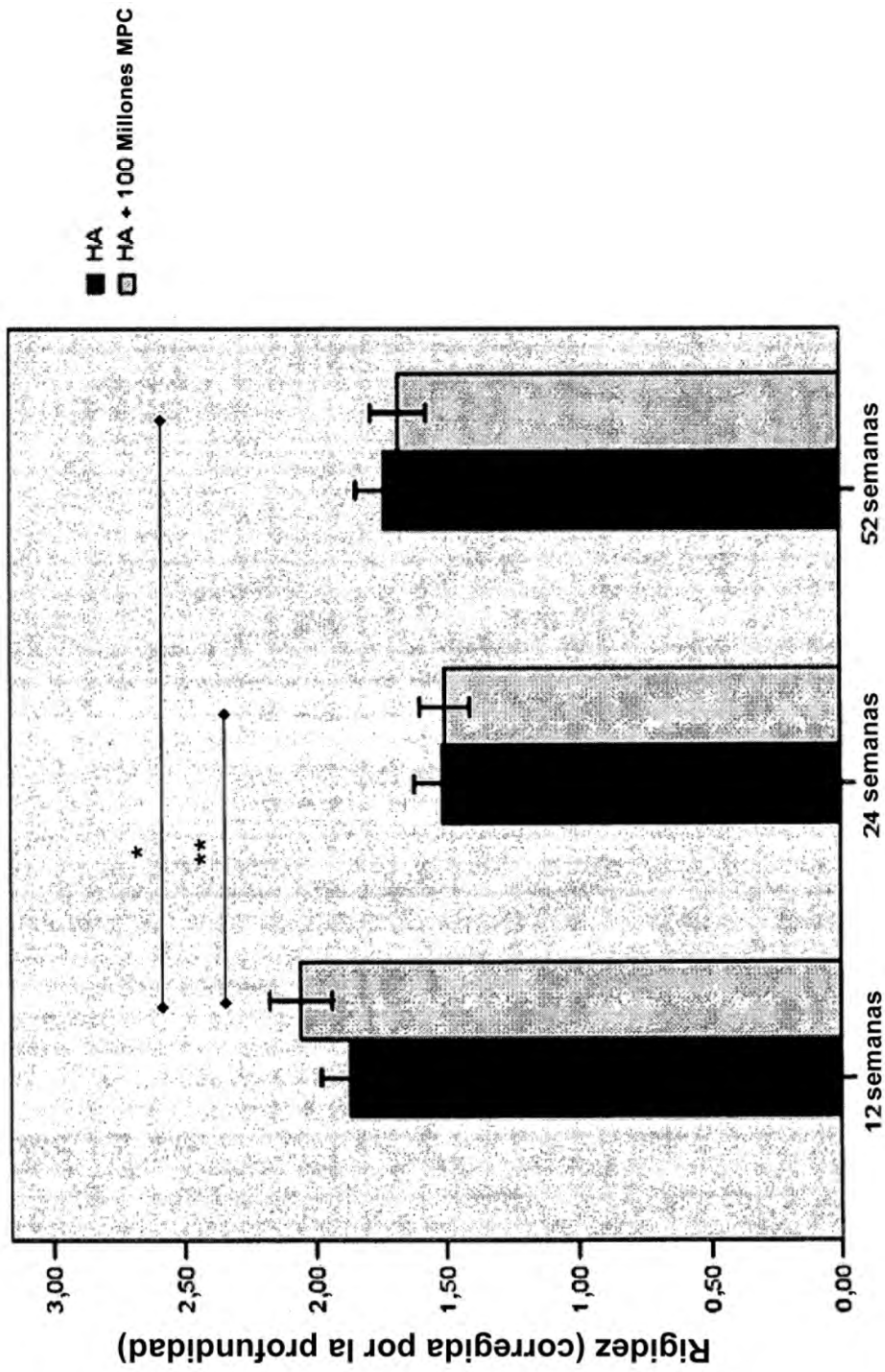


Figura 13

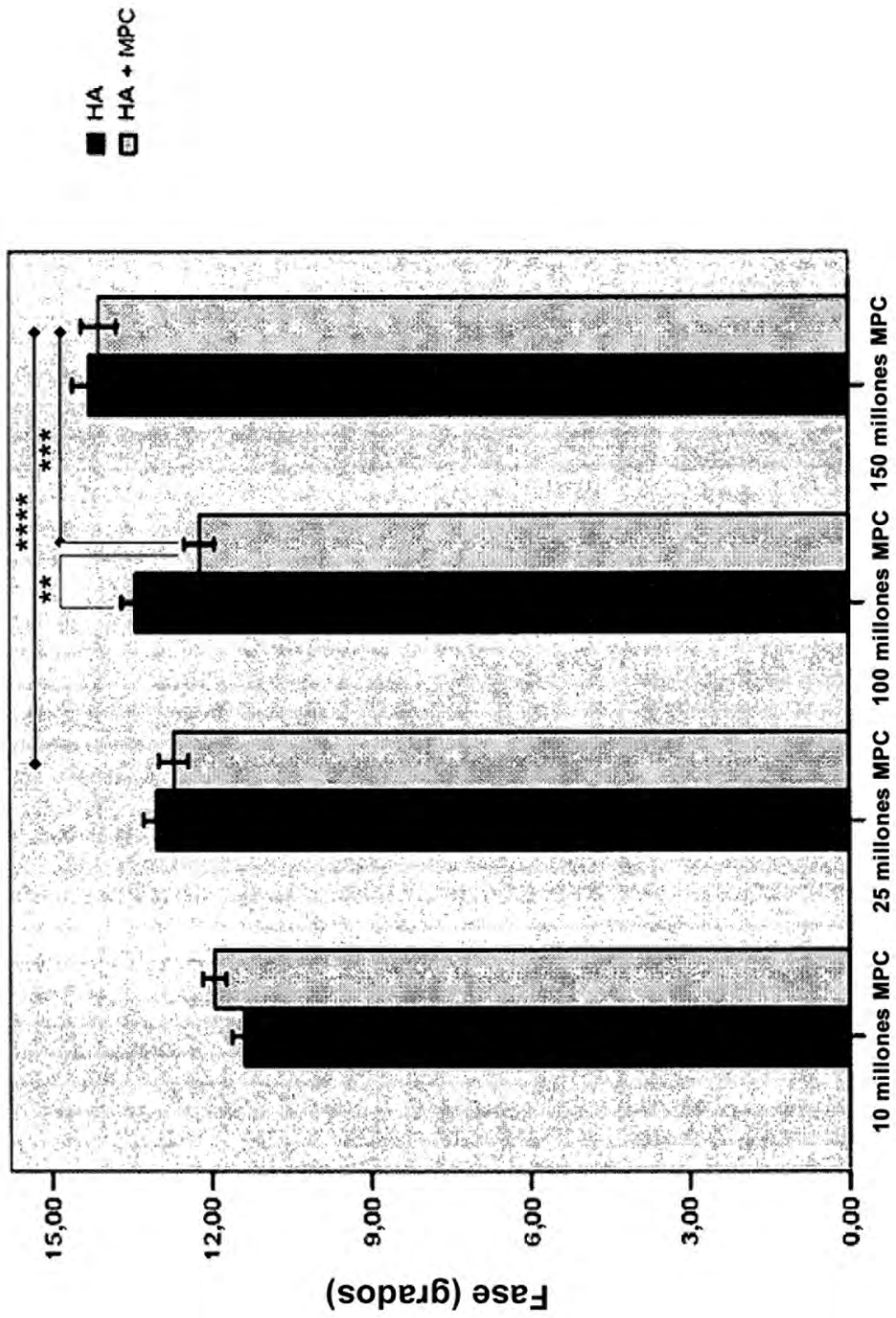


Figura 14

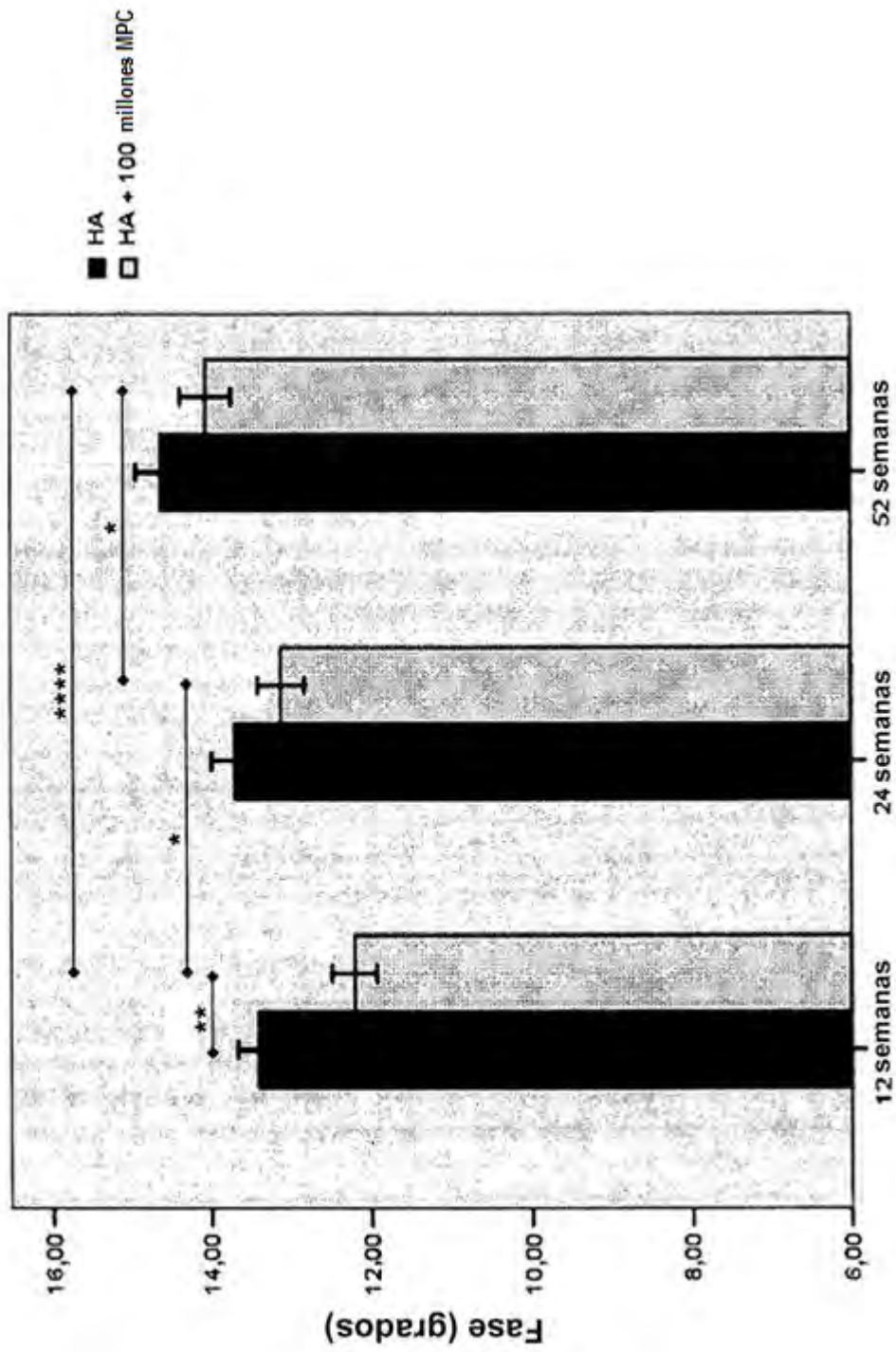


Figura 15

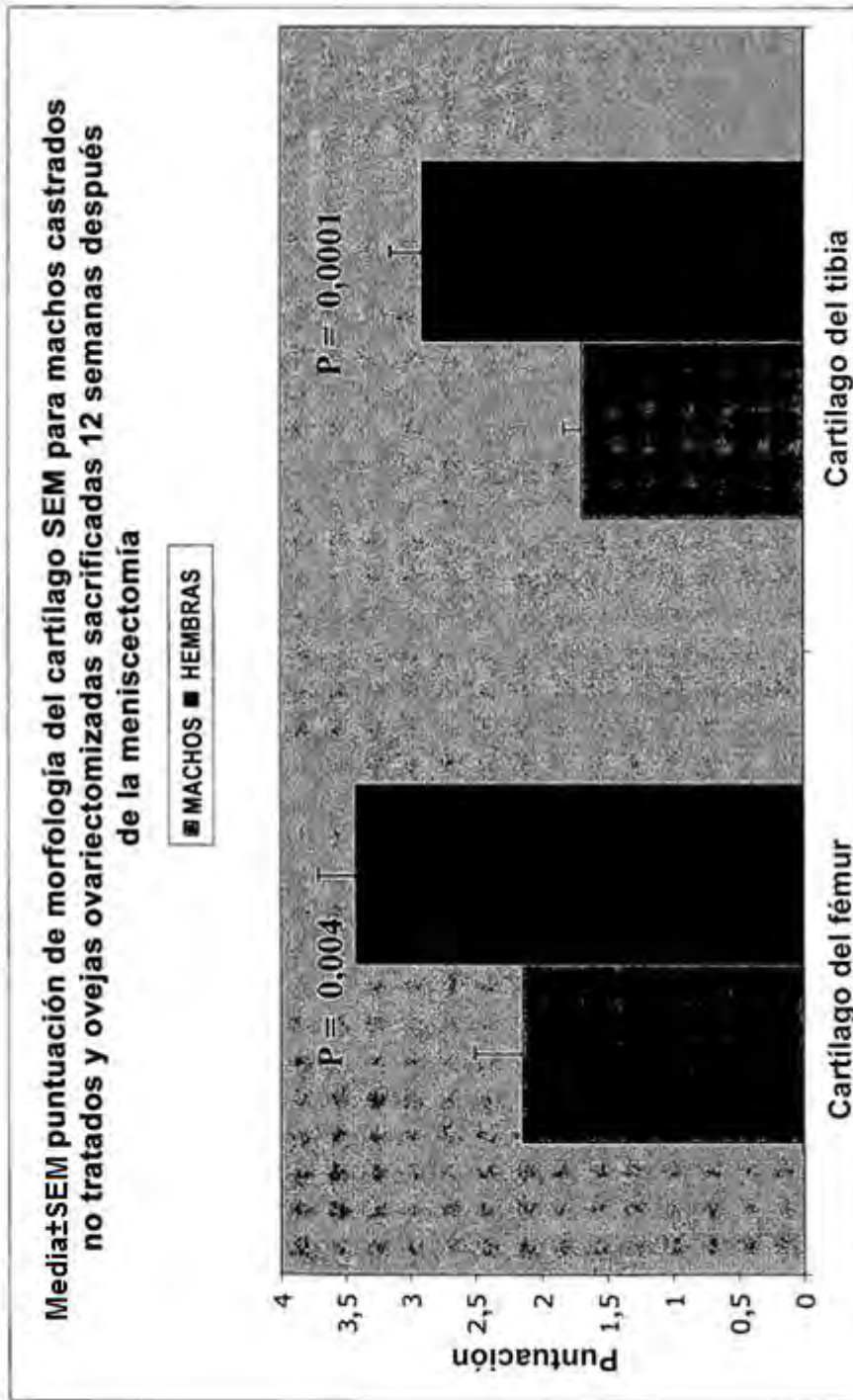


Figura 16

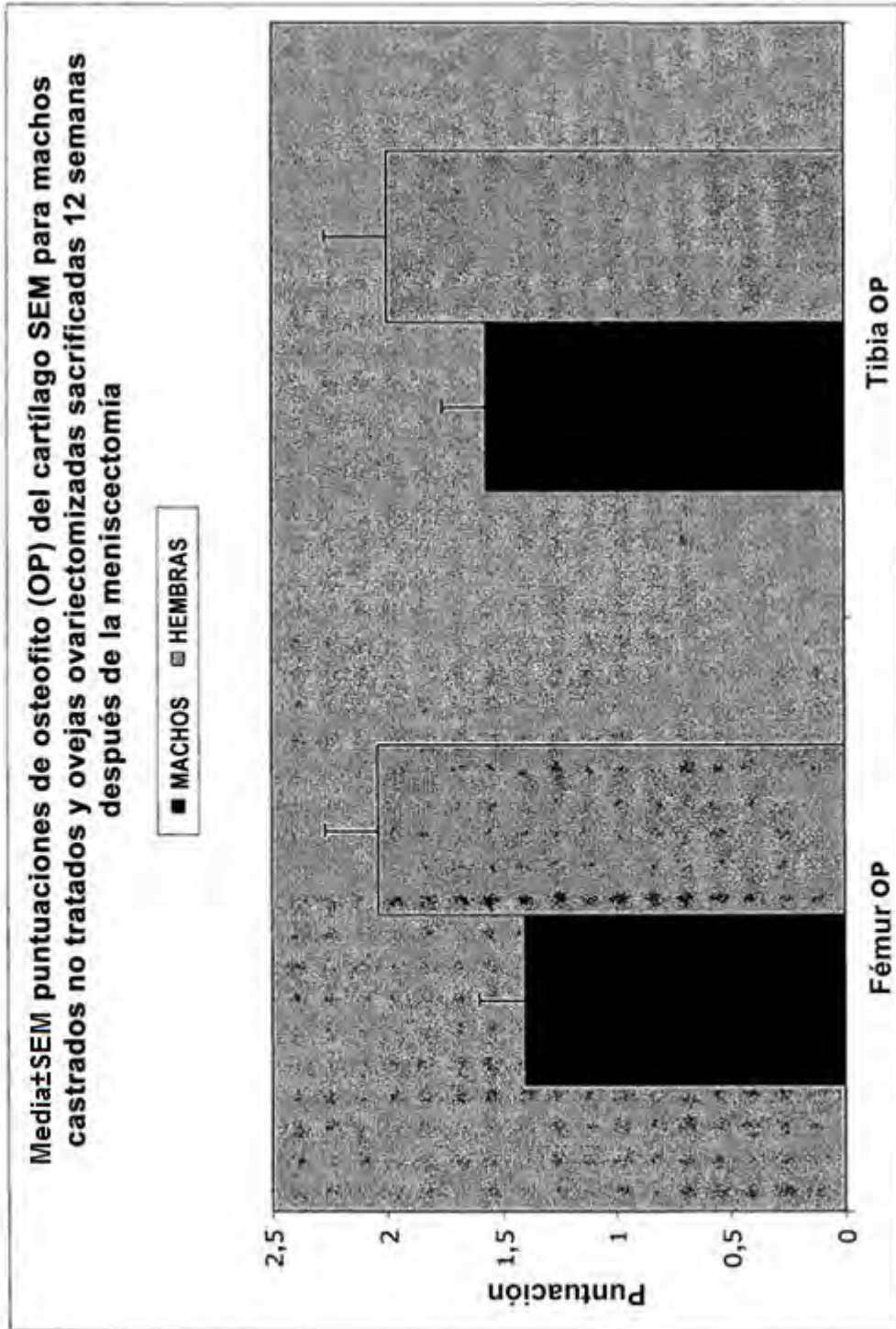


Figura 17

Fémur

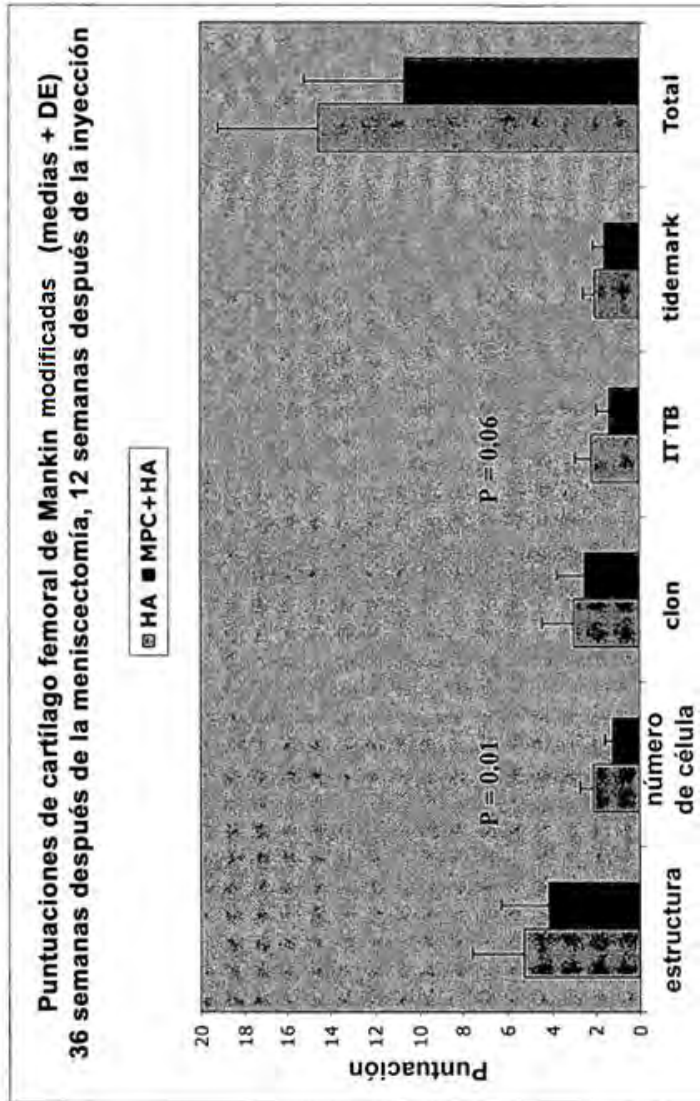
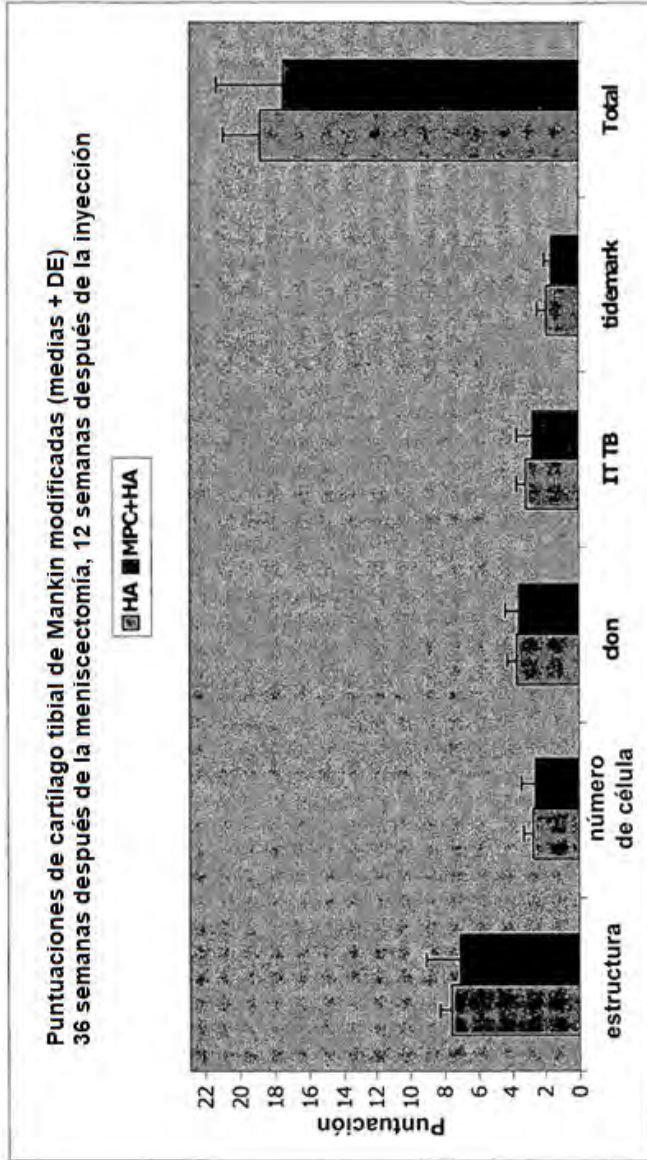


Figura 18

Tibia



Puntuación de HA = puntuación de MPC

Figura 18 (continuación)

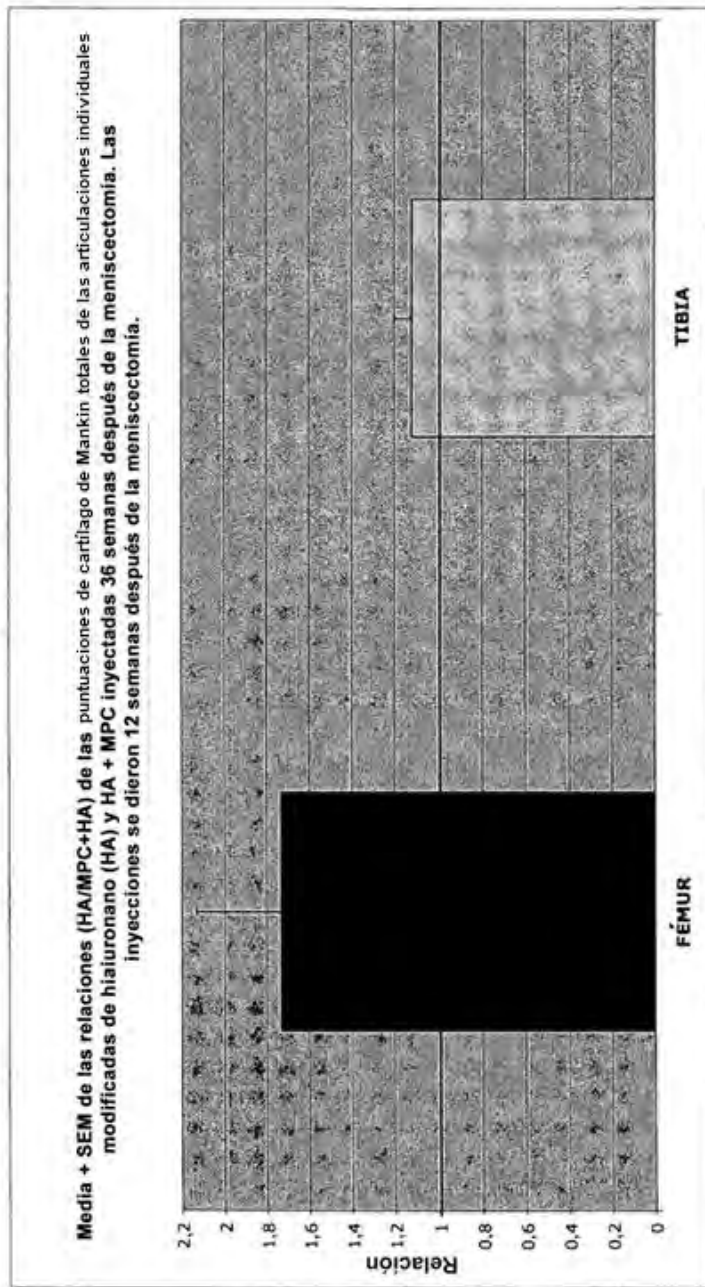
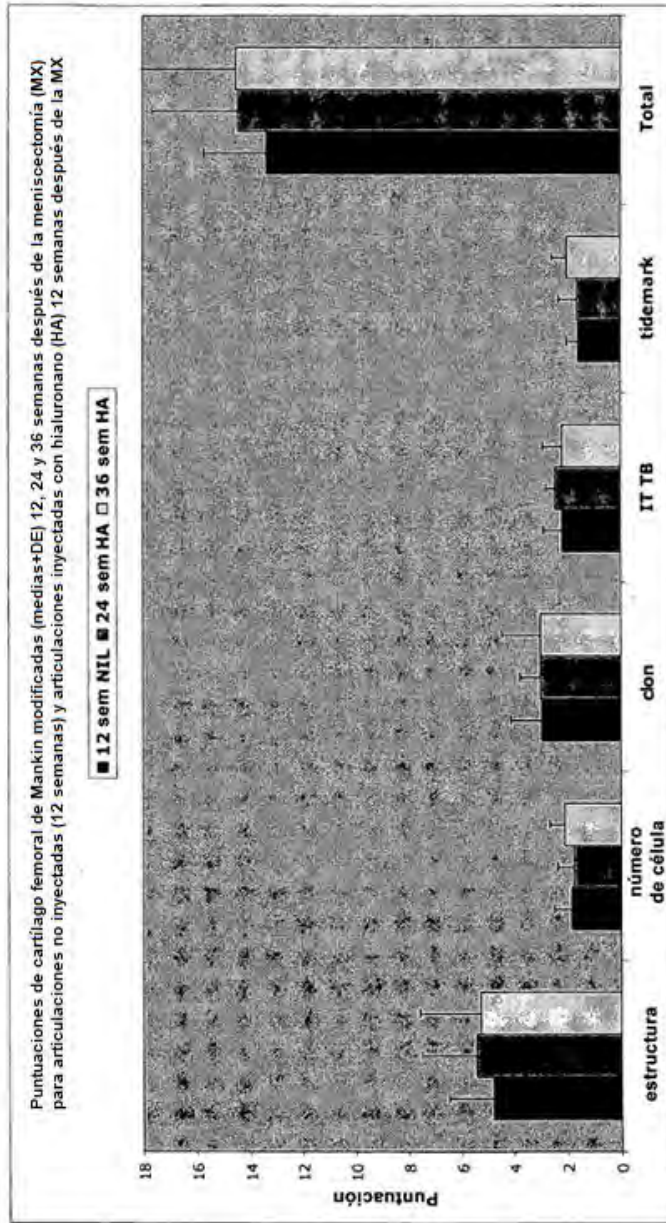


Figura 19



HA

Figura 20

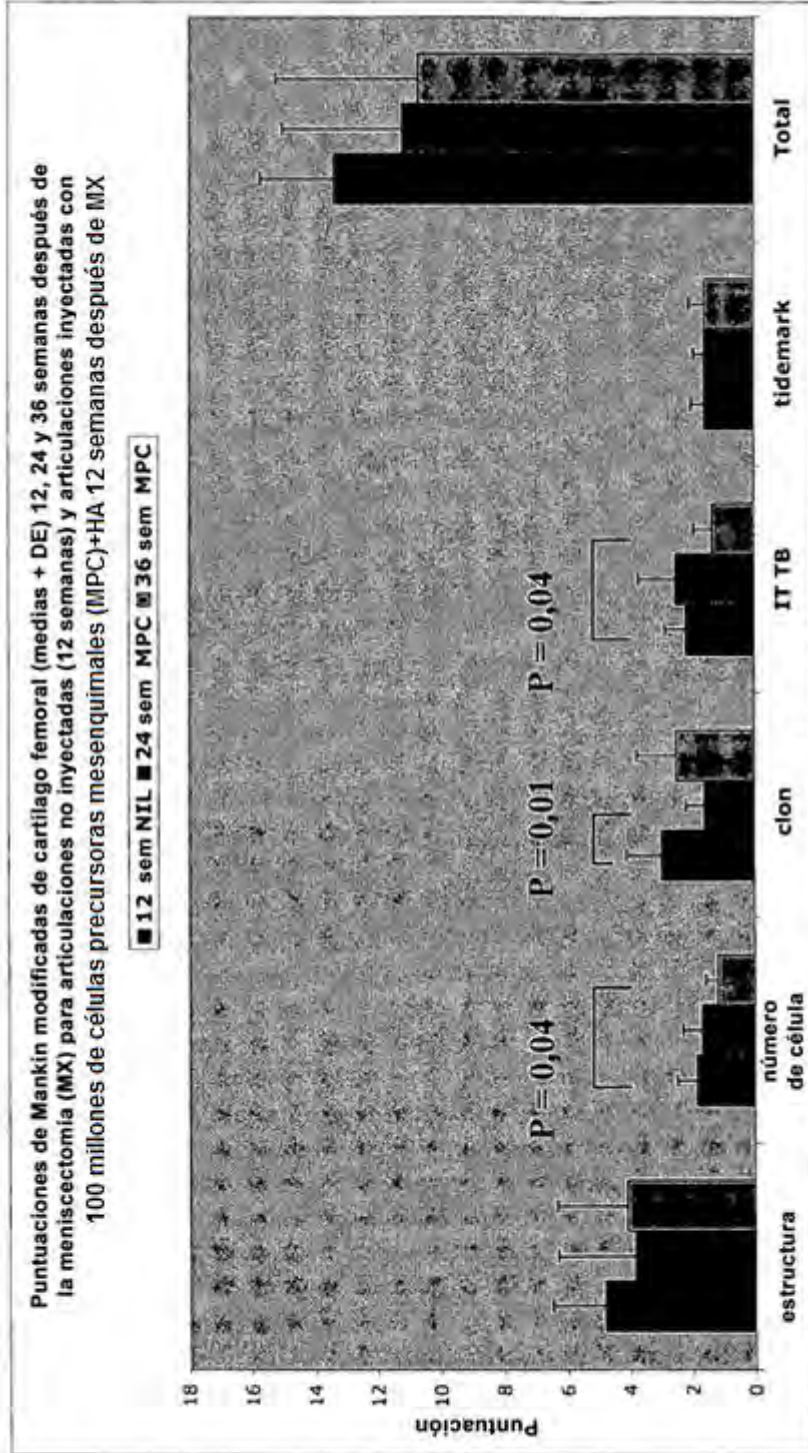


Figura 20 (continuación)

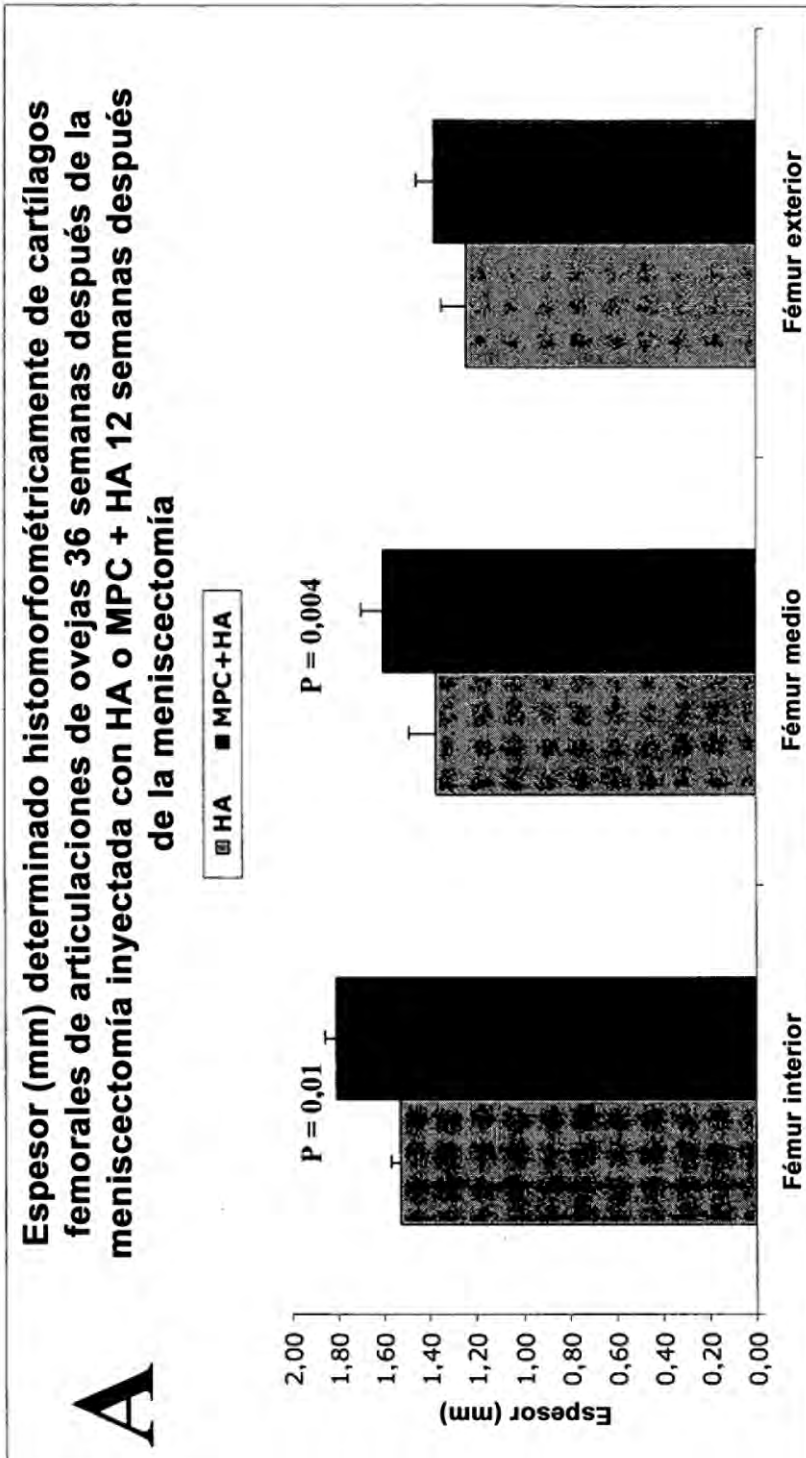


Figura 21

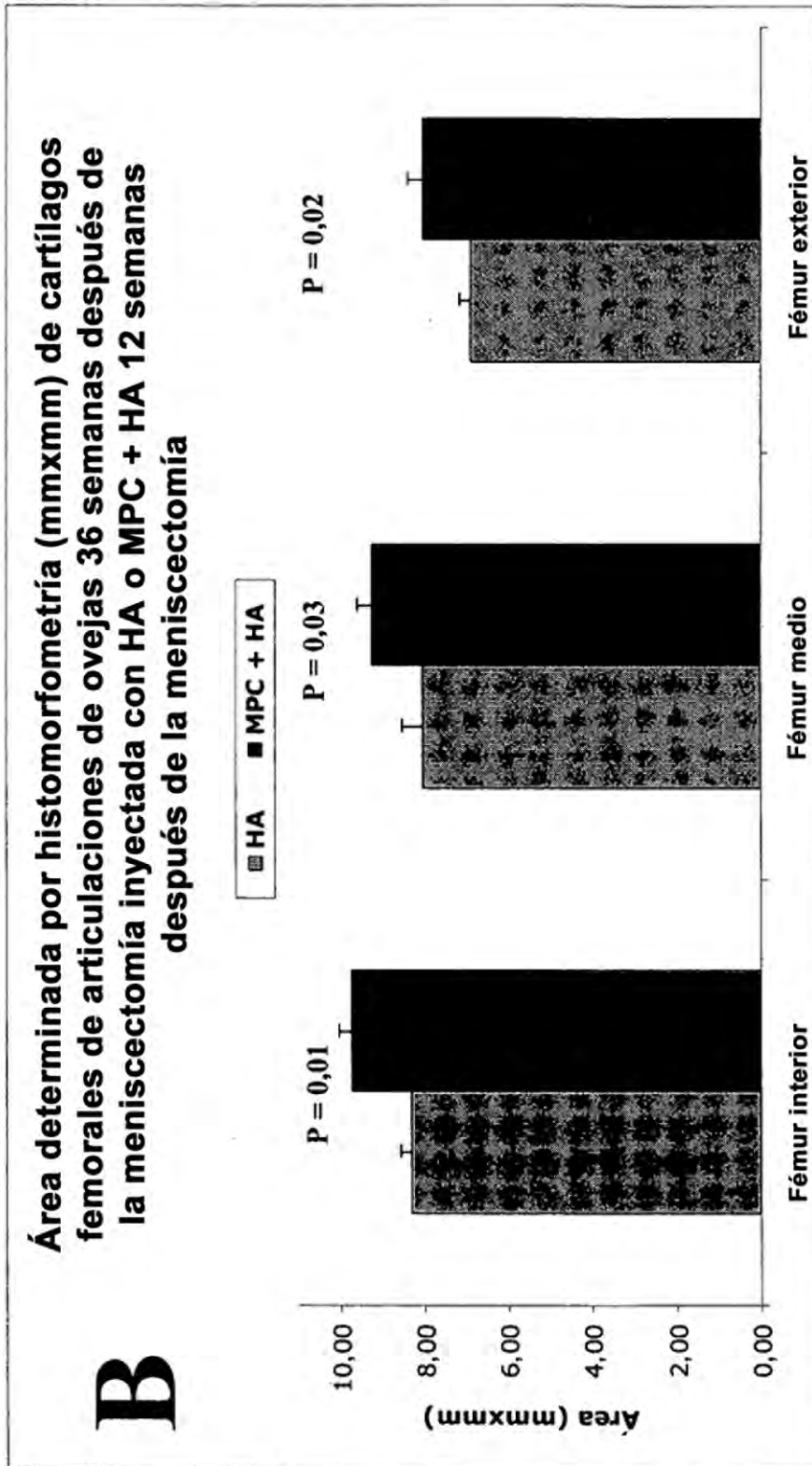


Figura 21 (continuación)

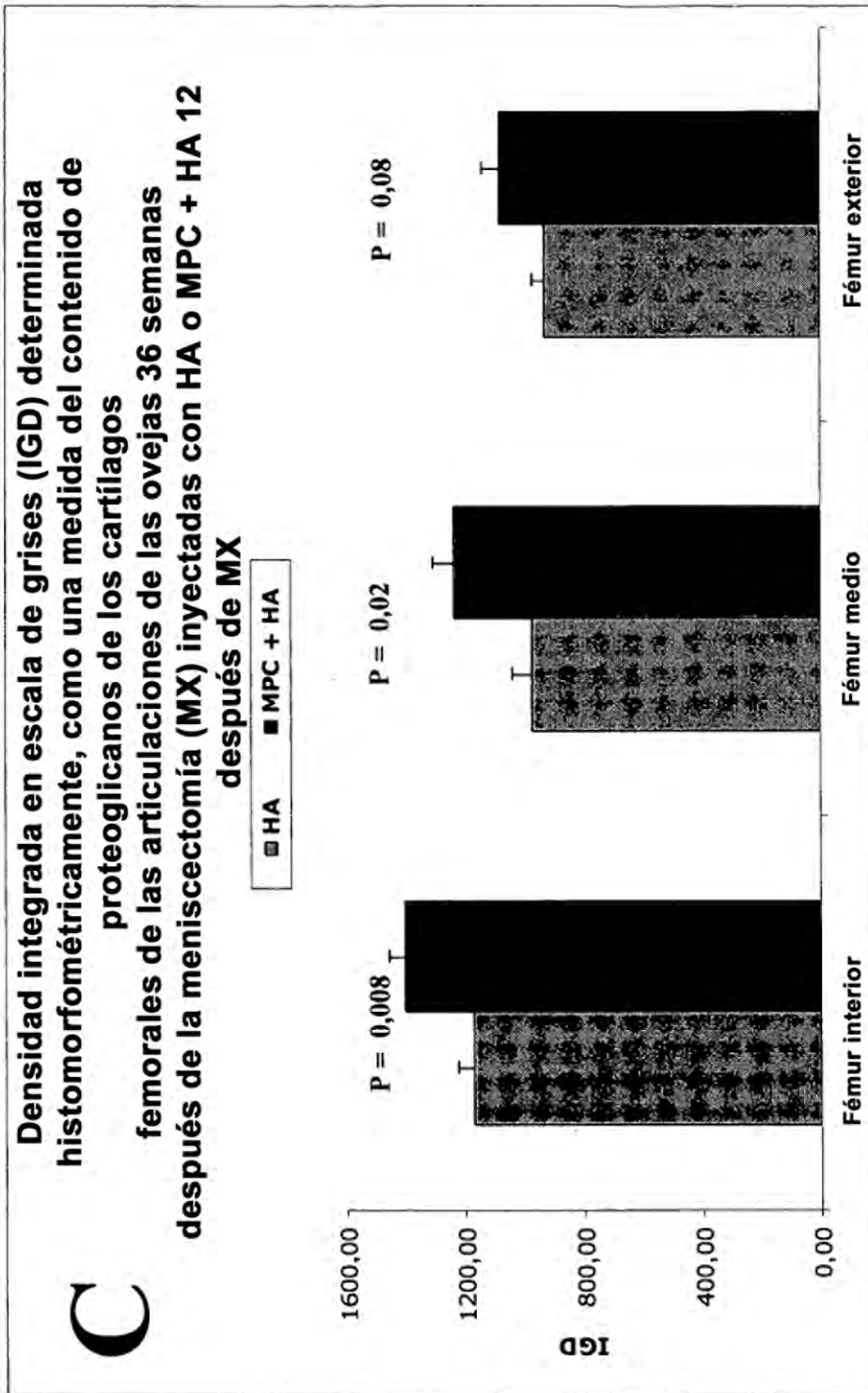


Figura 21 (continuación)

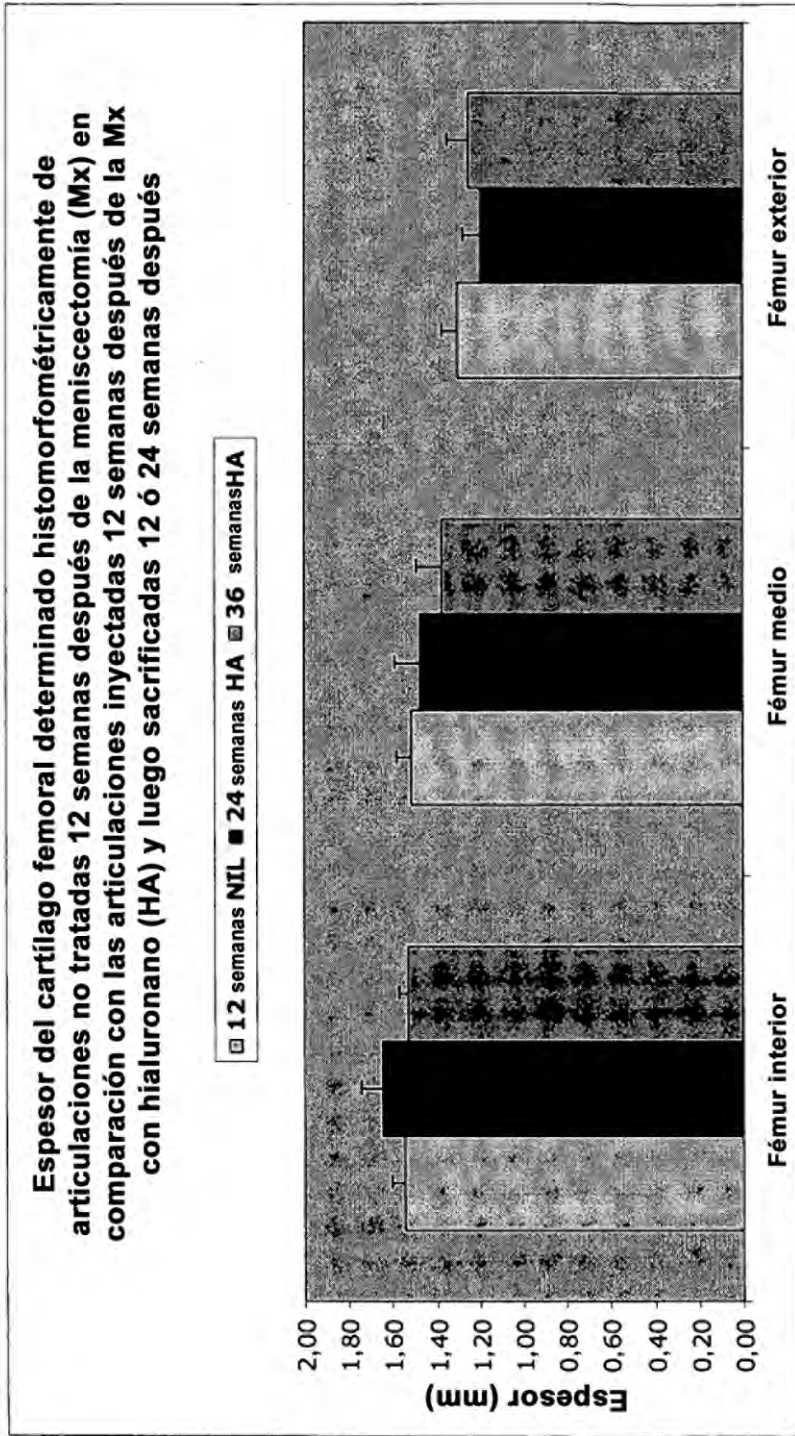


Figura 22

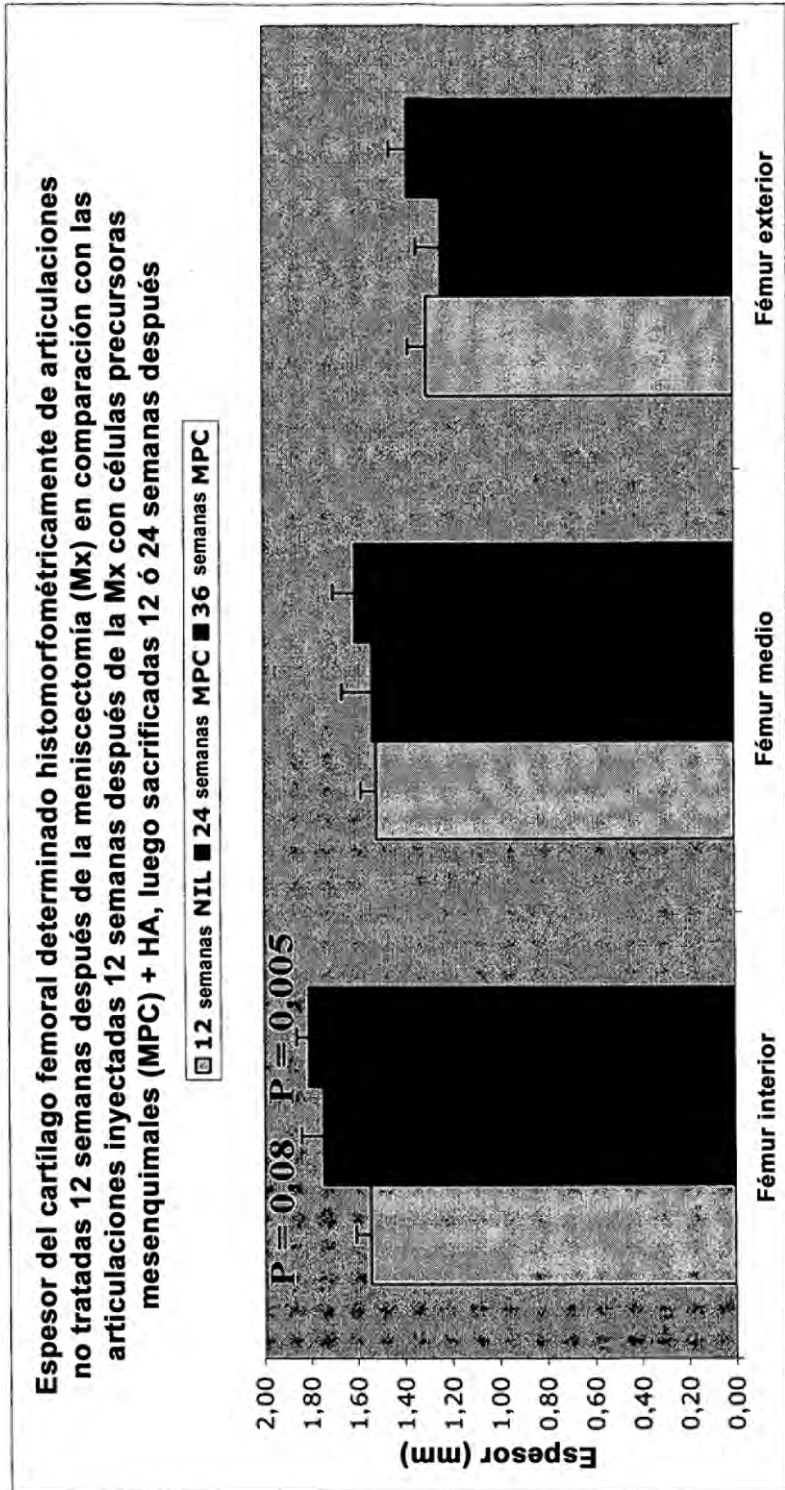


Figura 22 (continuación)

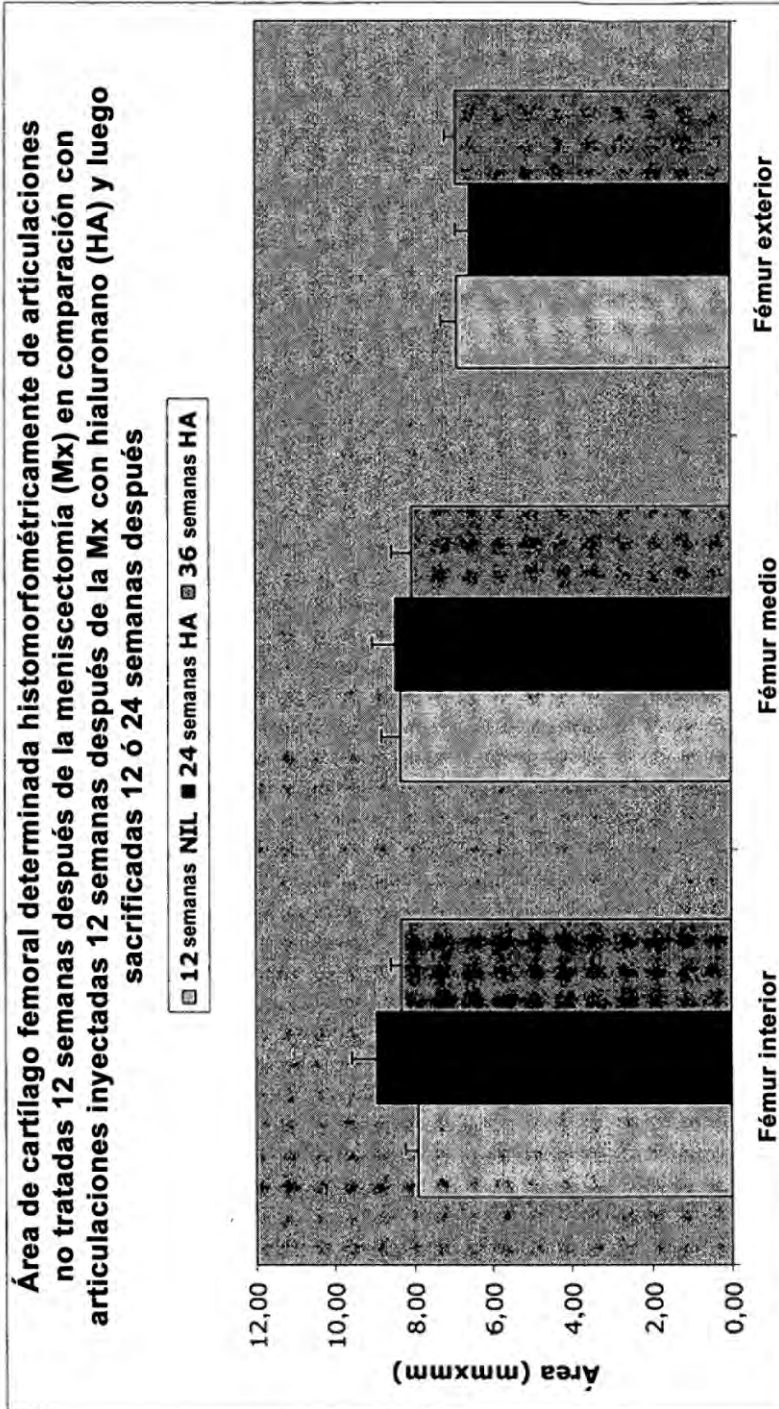


Figura 23

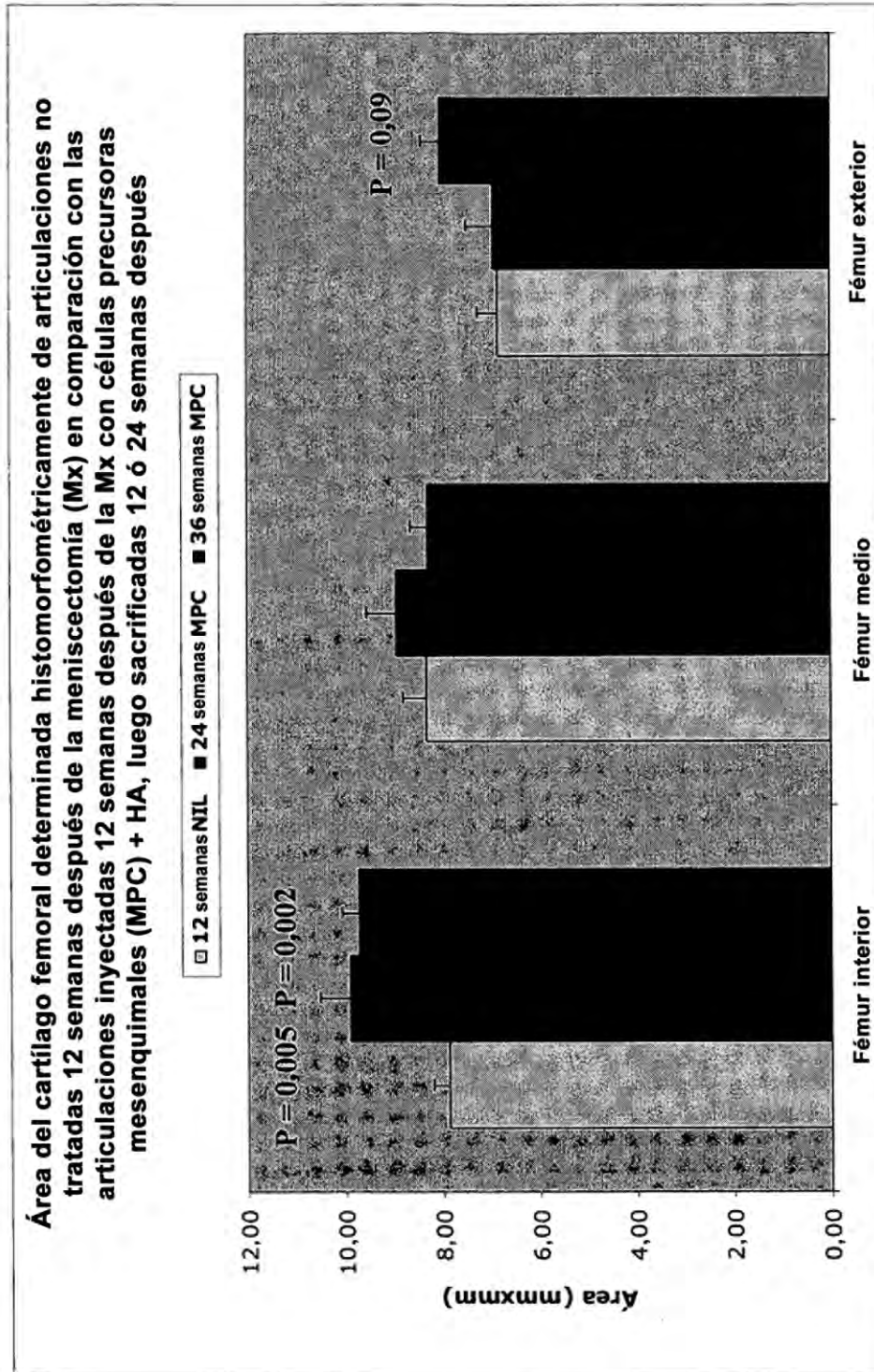


Figura 23 (continuación)

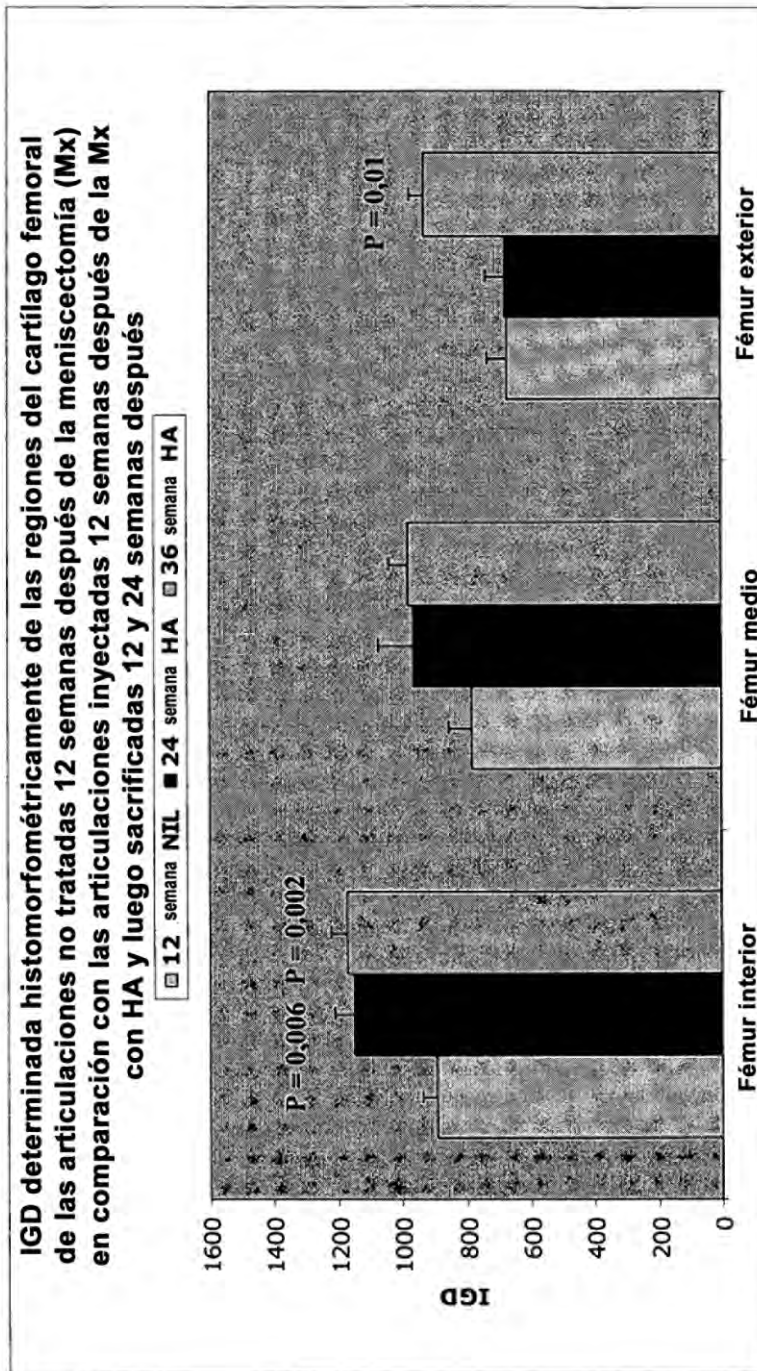


Figura 24

IGD determinada histomorfométricamente para las regiones del cartilago femoral de las articulaciones no tratadas 12 semanas después de la meniscectomía (Mx) en comparación con las articulaciones inyectadas 12 y 24 semanas después de la Mx con MPC + HA y luego sacrificadas 12 y 24 semanas después

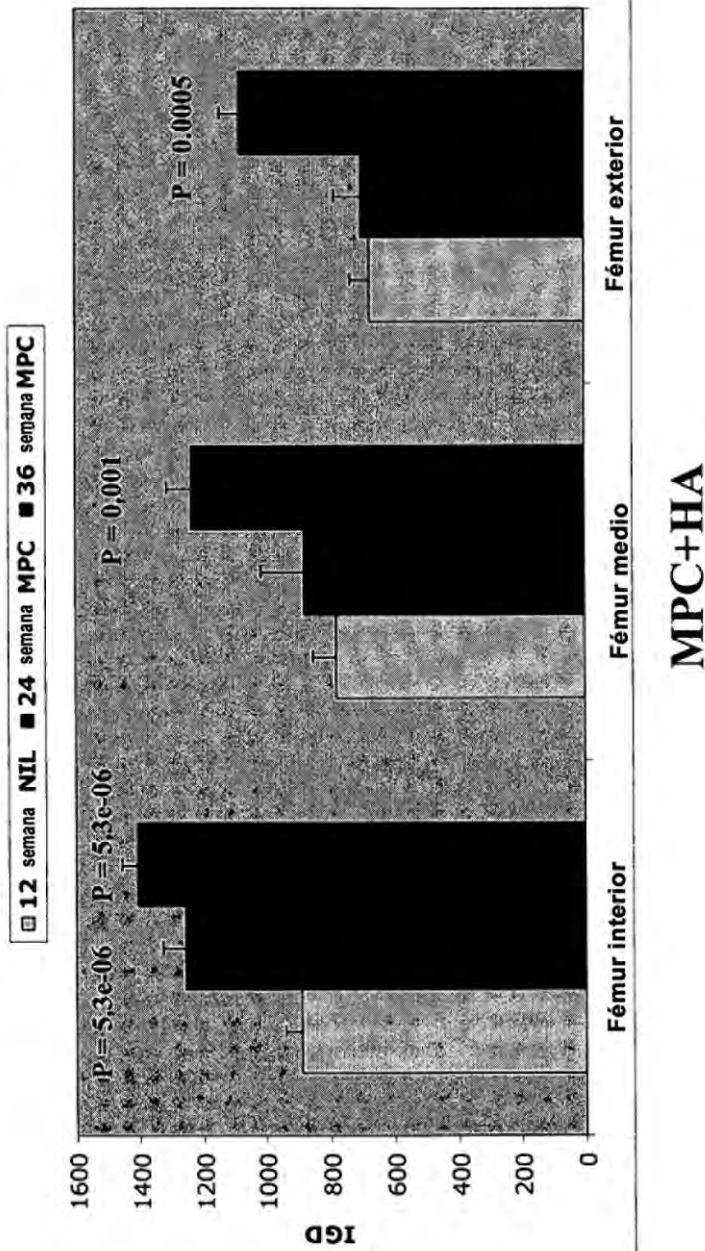


Figura 24 (continuación)

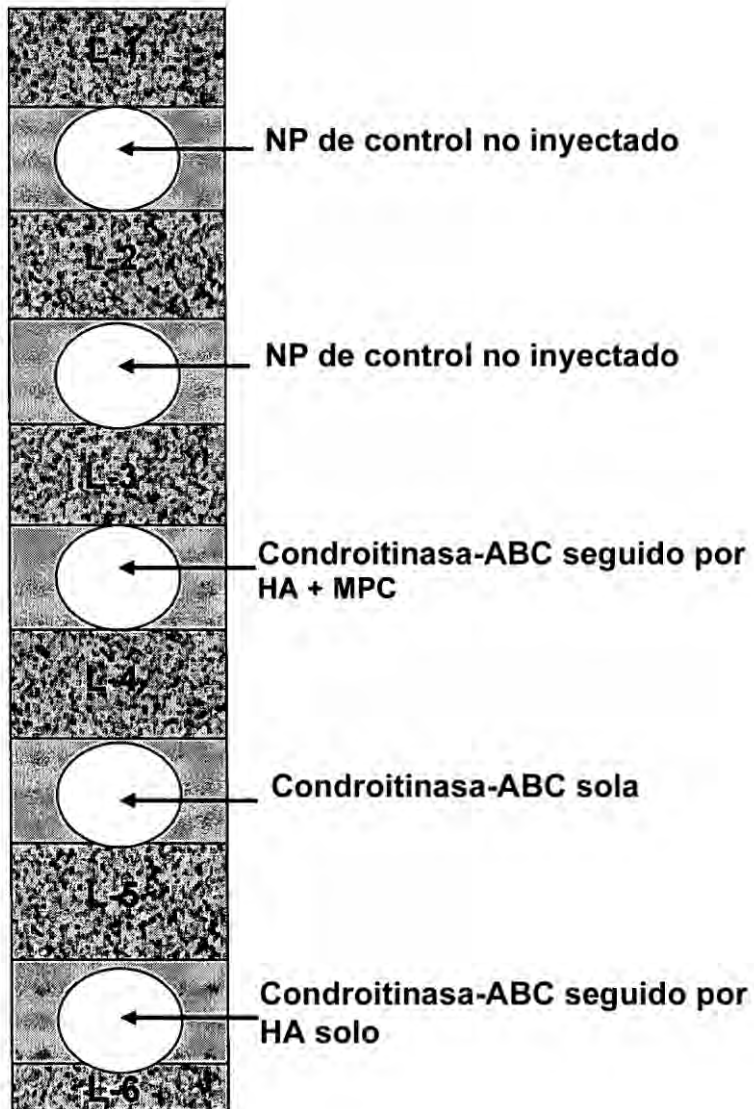


Figura 25

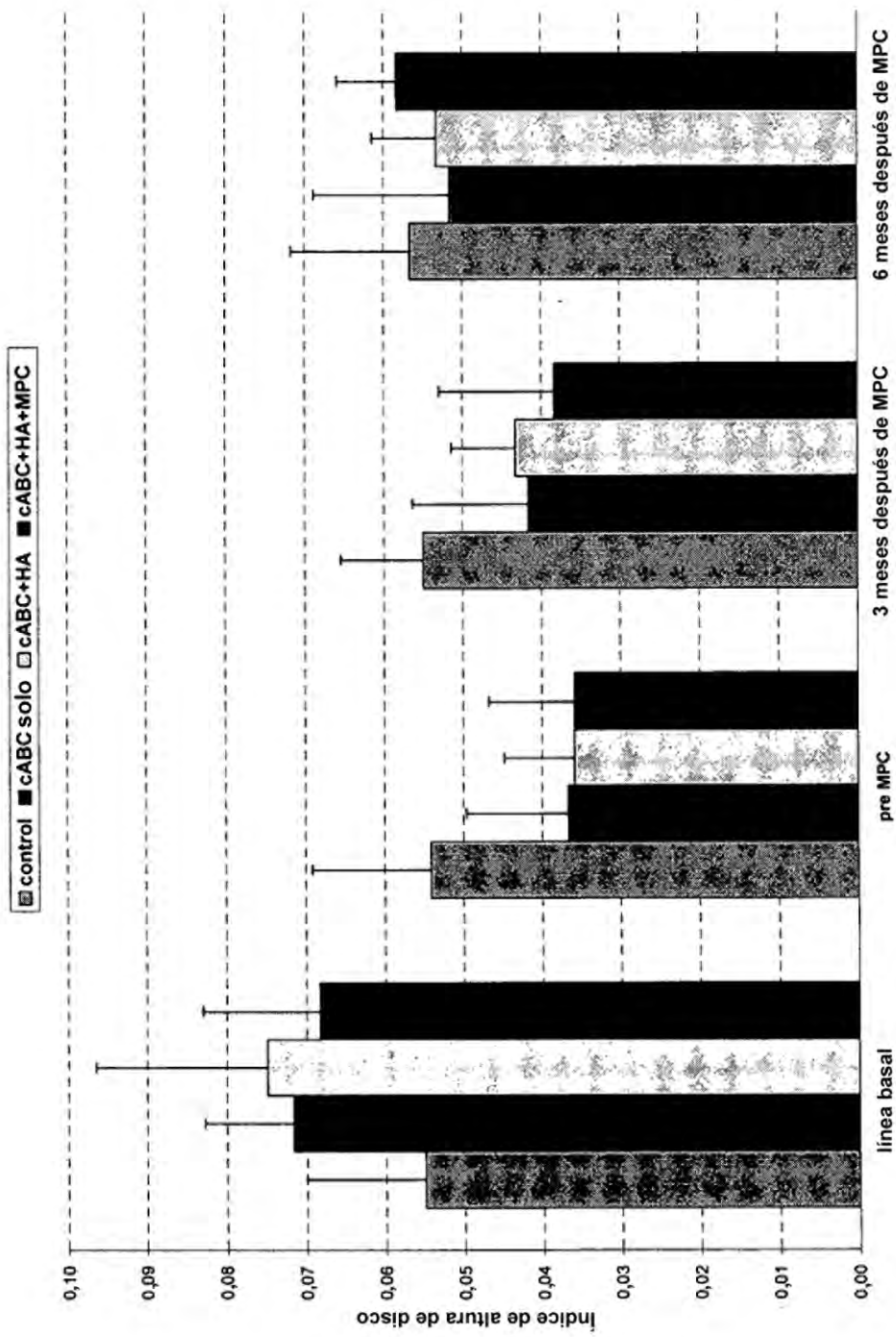


Figura 26