

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 922 247**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 38/49 (2006.01)

A61P 9/08 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.12.2016** **PCT/JP2016/088646**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.06.2017** **WO17111153**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.12.2016** **E 16879037 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2022** **EP 3395350**

54 Título: **Fármaco medicinal para tratar el infarto cerebral**

30 Prioridad:

25.12.2015 JP 2015254410

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

12.09.2022

73 Titular/es:

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY (50.0%)
291-85, Minami 1-jo Nishi 17-chome Chuo-ku
Sapporo-shi, Hokkaido 060-8556, JP y
NIPRO CORPORATION (50.0%)

72 Inventor/es:

HONMOU OSAMU;
NAKAZAKI MASAHITO;
SASAKI MASANORI;
SASAKI YUKO y
OKA SHINICHI

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 2 922 247 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

Fármaco medicinal para tratar el infarto cerebral

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un medicamento para tratar un trastorno vascular isquémico, que comprende células madre mesenquimatosas tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. Más específicamente, la presente invención se refiere a un medicamento para tratar un trastorno vascular isquémico que reduce el riesgo de hemorragia cerebral asociada con una terapia de reperfusión para la oclusión de vasos, tal como terapia trombolítica, y puede prolongar el intervalo terapéutico tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Antecedentes de la técnica

15 Infarto cerebral se refiere a un estado patológico en el que se produce isquemia cerebral debido a una oclusión o estenosis de arterias cerebrales y el tejido cerebral experimenta necrosis o un estado similar. Para el infarto cerebral (en particular una fase aguda o fase superaguda del infarto cerebral) o el infarto de miocardio, trombólisis o eliminación física de un coágulo sanguíneo es la elección de primera línea para el tratamiento para prevenir la necrosis debida a isquemia. Sin embargo, la reperfusión para la oclusión de vasos tiene el problema de que se asocia a menudo con un riesgo de hemorragia cerebral.

La terapia i.v. con t-PA tiene mayor actividad de trombólisis y menor riesgo de hemorragia que otros agentes trombolíticos tales como urocinasa y, por tanto, es el tratamiento habitual en una terapia de reperfusión de una fase superaguda o fase aguda de infarto cerebral. Sin embargo, puesto que el efecto terapéutico del t-PA disminuye y el riesgo de hemorragia aumenta a lo largo del tiempo, la terapia debe comenzar habitualmente en el plazo de 4,5 horas desde la aparición. Por tanto, se demanda una nueva terapia que suprima la disfunción endotelial con el fin de reducir el riesgo de hemorragia y prolongar el intervalo terapéutico para el t-PA.

Mientras tanto, se sabe que las células madre mesenquimatosas (MSC) proporcionan la protección del cerebro (parénquima y vaso sanguíneo). Se confirma mediante el uso de un modelo de infarto experimental que la administración de MSC después de un infarto cerebral mejora la función conductual y reduce el volumen de lesiones isquémicas (documentos no de patentes 1 a 3, documento de patentes 1). Además, el tratamiento de pacientes con infarto cerebral mediante la administración intravenosa de MSC se ha realizado muchas veces y se ha notificado la mejora de la función motora y de la lesión (documento no de patentes 4, documento de patentes 2). Li, Shu-Jun, *et al.* describen la introducción dirigida de activador tisular del plasminógeno (TPA) en el locus AAVS1 en células madre mesenquimatosas (MSC) y su expresión estable y eficaz (Li, Shu-Jun, *et al.* "Targeted introduction of tissue plasminogen activator (TPA) at the AAVS1 locus in mesenchymal stem cells (MSCs) and its stable and effective expression." Biochemical and biophysical research communications 437, 1 (2013): 74-78.

40 Lista de referencias

Bibliografía de patentes

Documento de patentes 1: documento WO2002/000849

Documento de patentes 2: documento WO2009/002503

Bibliografía no de patentes

Documento no de patentes 1: Iihoshi S. *et al.*, Brain Res. 2004, 1007: 1-9.

Documento no de patentes 2: Nomura T. *et al.*, Neuroscience. 2005, 136: 161-169.

Documento no de patentes 3: Honma T. *et al.*, Exp. Neurol. 2006, 199: 56-66.

Documento no de patentes 4: Honmou O. *et al.*, Brain. 2011, 134: 1790-1807.

Sumario de la invención

60 Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo método para tratar la hemorragia cerebral asociada con una terapia de reperfusión para la oclusión de vasos y, en particular, proporcionar medios para reducir el riesgo de hemorragia cerebral asociada con terapia trombolítica y tratar la disfunción motora y la disfunción cerebral superior asociadas con un trastorno vascular isquémico.

Solución al problema

Los inventores han hallado que, mediante la administración por vía intravenosa de MSC, en combinación con terapia trombolítica con rt-PA, a un modelo de oclusión transitoria de la arteria cerebral media que se ha inducido insertando una sutura intraluminal en la arteria, se suprime marcadamente el infarto hemorrágico y se presenta una mejora significativa de la función motora a lo largo del tiempo.

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

También se divulga lo siguiente:

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a los siguientes puntos (1) a (18).

(1) Un medicamento para tratar un trastorno vascular isquémico, que comprende células madre mesenquimatosas, en el que el medicamento se usa en combinación con una terapia de perfusión para la oclusión de vasos;

(2) el medicamento según el punto (1) anterior, en el que el medicamento reduce el riesgo de hemorragia cerebral asociada con la terapia de perfusión para la oclusión de vasos;

(3) el medicamento según los puntos (1) o (2) anteriores, en el que la terapia de perfusión para la oclusión de vasos comprende uno cualquiera o más seleccionados de administración de un agente trombolítico, un inhibidor de la agregación plaquetaria y un agente anticoagulante, y eliminación física de un coágulo sanguíneo;

(4) el medicamento según uno cualquiera de los puntos (1) a (3) anteriores, en el que la terapia de perfusión para la oclusión de vasos comprende la administración del agente trombolítico;

(5) el medicamento según el punto (4) anterior, en el que el agente trombolítico es un activador del plasminógeno (t-PA);

(6) el medicamento según uno cualquiera de los puntos (3) a (5) anteriores, en el que el medicamento prolonga el intervalo en el que puede administrarse el agente trombolítico;

(7) el medicamento según uno cualquiera de los puntos (1) a (6) anteriores, en el que el trastorno vascular isquémico es un trastorno cerebrovascular isquémico o infarto de miocardio;

(8) el medicamento según uno cualquiera de los puntos (1) a (6) anteriores, en el que el trastorno vascular isquémico es una fase superaguda o fase aguda de un trastorno cerebrovascular isquémico o infarto agudo de miocardio;

(9) el medicamento según uno cualquiera de los puntos (1) a (8) anteriores, en el que las células madre mesenquimatosas son células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea;

(10) un medicamento para prevenir la hemorragia cerebral asociada con una terapia de perfusión para la oclusión de vasos, que comprende células madre mesenquimatosas;

(11) el medicamento según el punto (10) anterior, en el que la terapia de perfusión para la oclusión de vasos comprende uno cualquiera o más seleccionados de administración de un agente trombolítico, un inhibidor de la agregación plaquetaria y un agente anticoagulante, y eliminación física de un coágulo sanguíneo;

(12) el medicamento según los puntos (10) u (11) anteriores, en el que la terapia de perfusión para la oclusión de vasos comprende la administración del agente trombolítico;

(13) el medicamento según el punto (12) anterior, en el que el agente trombolítico es un activador del plasminógeno;

(14) el medicamento según uno cualquiera de los puntos (11) a (13) anteriores, en el que el medicamento prolonga el intervalo en el que puede administrarse el agente trombolítico;

(15) el medicamento según uno cualquiera de los puntos (10) a (14) anteriores, en el que el medicamento se usa para un paciente con un trastorno vascular isquémico;

(16) el medicamento según el punto (15) anterior, en el que el trastorno vascular isquémico es un trastorno cerebrovascular isquémico o infarto de miocardio;

(17) el medicamento según los puntos (15) o (16) anteriores, en el que el trastorno vascular isquémico es una fase superaguda o fase aguda de un trastorno cerebrovascular isquémico o infarto de miocardio;

(18) el medicamento según uno cualquiera de los puntos (10) a (17) anteriores, en el que las células madre

mesenquimatosas son células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea.

Efectos ventajosos de la invención

Según la presente invención, se logra un efecto sinérgico de reducción del riesgo de hemorragia cerebral asociada con una terapia de perfusión para la oclusión de vasos, tal como terapia con t-PA, y de mejora de un efecto terapéutico (mejora de la función motora, disminución en la lesión por infarto) de las MSC. Además, mediante la reducción del riesgo de hemorragia cerebral, puede prolongarse el intervalo en el que puede aplicarse una terapia trombolítica tal como terapia con t-PA, que se considera habitualmente que es de 4,5 horas después de la aparición.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La figura 1 ilustra el esquema del protocolo experimental. DWI se adquiere 60 minutos después de la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO); después de agrupar en 4 grupos al azar, se recanaliza la oclusión y se administra rt-PA o solución salina fisiológica (90 minutos después de la oclusión); y se administra además un medio o MSC después de 30 minutos.

[Figura 2] La figura 2 ilustra la aparición de hemorragia aguda después de la combinación de la terapia con rt-PA y la administración de MSC. A: imágenes de los respectivos grupos (solución salina fisiológica + medio, rt-PA + medio, solución salina fisiológica + MSC, rt-PA + MSC), B: tasa de incidencia de hemorragia cerebral el día 1, C: volumen de hemorragia evaluado a partir de T2WI-IRM el día 1 (** $P < 0,01$, * $P < 0,05$, prueba de Tukey a posteriori).

[Figura 3] La figura 3 ilustra un resultado de la cimgografía en gelatina. A: nivel de expresión de MMP-9 (desde la izquierda, marcador, simulado, contralateral: solución salina fisiológica + medio, rt-PA + medio, solución salina fisiológica + MSC, rt-PA + MSC, ipsilateral: solución salina fisiológica + medio, rt-PA + medio, solución salina fisiológica + MSC, rt-PA + MSC). B: actividad de MMP-9 mediante la medición por densitometría (** $P < 0,01$, prueba de Tukey a posteriori).

[Figura 4] La figura 4 ilustra las características de la lesión isquémica mediante el análisis por IRM. A: DWI antes de la oclusión (columna 1), T2WI el día 4 (columna 2), día 7 (columna 3), día 14 (columna 4), día 28 (columna 5) después de la perfusión en los respectivos grupos. B: volúmenes de lesión de los respectivos grupos evaluados a partir de DWI (antes de la oclusión) y T2WI los días 1, 4, 7, 14, 21, 28 después de la perfusión. C: rCBF evaluado a partir de PWI (** $P < 0,01$, * $P < 0,05$, prueba de Tukey a posteriori).

[Figura 5] La figura 5 ilustra un resultado de la prueba de carga en cinta sin fin. Velocidades máximas a las que las ratas pudieron correr sobre una cinta sin fin el día 1, el día 4, el día 7, el día 14, el día 21, el día 28 después de la perfusión en los respectivos grupos (** $P < 0,01$, * $P < 0,05$, prueba de Tukey a posteriori).

Descripción de las realizaciones

1. Medicamento para tratar un trastorno vascular isquémico

La presente invención se refiere a un medicamento para tratar un trastorno vascular isquémico, que comprende células madre mesenquimatosas, en el que el medicamento se usa en combinación con una terapia de perfusión para la oclusión de vasos que comprende la administración de un activador tisular del plasminógeno.

[Células madre mesenquimatosas]

Las células madre mesenquimatosas usadas en la presente invención son células madre que tienen multipotencia y autorrenovación presentes en una cantidad muy pequeña en las células del estroma del tejido mesenquimatoso y se sabe que no sólo se diferencian en células del tejido conjuntivo tales como osteocitos, condrocitos y adipocitos, sino que también tienen potencia de diferenciación en células nerviosas y miocardiocitos.

Las fuentes de las células madre mesenquimatosas incluyen la médula ósea, la sangre periférica, la sangre del cordón umbilical, los embriones fetales y el cerebro, pero son preferiblemente células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea (células madre mesenquimatosas de médula ósea), en particular, células madre mesenquimatosas de médula ósea humana. Las células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea tienen las ventajas de que 1) puede esperarse un efecto marcado, 2) el riesgo de efectos secundarios es bajo, 3) puede esperarse un suministro suficiente de células del donante y 4) las terapias con las mismas no son invasivas y pueden autoinjertarse y, por tanto, 5) el riesgo de infección es bajo, 6) no hay que preocuparse por el inmunorechazo, 7) no tienen problemas éticos, 8) son fáciles de aceptar socialmente y 9) se convierten fácilmente en una terapia ampliamente usada como atención médica general. Además, la terapia de trasplante de médula ósea es una terapia que ya se usa en el centro clínico y su seguridad está confirmada. Además, las células madre derivadas de médula ósea son altamente migratorias y, no sólo por el trasplante al sitio local, sino también por administración intravenosa, pueden suministrarse al tejido lesionado y allí puede esperarse un efecto terapéutico.

Las células pueden ser células obtenidas induciendo la diferenciación de células ES o células madre pluripotentes inducidas (células iPS o similares), una línea celular establecida o células aisladas del organismo vivo y proliferadas. Las células pueden derivar de células alogénicas o células autólogas, pero preferiblemente son células madre mesenquimatosas derivadas de células autólogas (derivadas de las propias células del paciente).

Las células madre mesenquimatosas usadas en la presente invención están preferentemente en un estado indiferenciado. Esto se debe a que las células en un estado indiferenciado tienen una alta tasa de reproducción y una alta tasa de supervivencia después de la introducción en el organismo vivo. Los inventores han desarrollado un método para obtener tales células, cuyos detalles se describen en el documento WO2009/002503.

En el método mencionado anteriormente desarrollado por los inventores, las células separadas de un aspirado de médula ósea en condiciones en las que las células no entran en contacto sustancial con un anticoagulante (heparina) se proliferan en un medio que contiene suero humano (preferiblemente suero autólogo) y que no contiene anticoagulante (heparina) o un anticoagulante en una concentración muy baja.

La densidad de las células en el medio tiene un efecto sobre las propiedades y la dirección de diferenciación de las células. En el caso de las células madre mesenquimatosas, las densidades celulares en un medio de más de 8.500 células/cm² cambian las propiedades de las células y, por tanto, se prefiere pasar las células a una densidad celular menor de o como máximo igual a 8500/cm² y se prefiere más pasar las células en un punto de tiempo cuando la densidad celular sea igual a o mayor de 5500/cm².

En el método mencionado anteriormente que desarrollaron los inventores, se usa un medio que contiene suero humano y, por tanto, teniendo en cuenta la carga sobre el donante de suero, es deseable que el número de cambios de medio sea el menor posible y, por ejemplo, el cambio de medio se realiza al menos una vez a la semana y más preferiblemente de 1 a 2 veces a la semana.

En el cultivo, las células se pasan repetidamente hasta que el número total de células alcanza 10⁸ o más. El número de células requeridas puede variar dependiendo del propósito de uso, pero, por ejemplo, el número de células madre mesenquimatosas requeridas para el trasplante para tratar una enfermedad cerebral isquémica, tal como infarto cerebral, se considera igual a o mayor de 10⁷. Según el método que desarrollaron los inventores, pueden obtenerse 10⁷ células madre mesenquimatosas en aproximadamente 12 días.

Las MSC proliferadas pueden almacenarse mediante técnicas tales como la crioconservación (por ejemplo, en un ultracongelador a -152°C) hasta su uso según sea necesario. En la crioconservación, se usa un medio (un medio para células de mamíferos tal como RPMI) como medio de crioconservación que contiene suero (preferiblemente suero humano, más preferiblemente suero autólogo), dextrano, DMSO. Por ejemplo, las células pueden suspenderse en un medio de crioconservación que contiene 20,5 ml de RPMI esterilizado por filtración habitual, 20,5 ml de suero propio recogido de un paciente, 5 ml de dextrano y 5 ml de DMSO y crioconservarse a -150°C. Los ejemplos de DMSO y dextrano incluyen, pero no se limitan a, Cryoserv fabricado por Nipro Corporation y Low Molecular Dextran L Injection fabricado por Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., respectivamente.

Cuanto mayor sea el número de MSC contenidas en el medicamento según la presente invención, más preferible es. Sin embargo, es práctico que sea el número mínimo en el que las MSC sean eficaces teniendo en cuenta el momento en que se administran a un sujeto y el tiempo requerido para el cultivo. Por consiguiente, en un aspecto preferido del medicamento según la presente invención, el número de células madre mesenquimatosas es de 10⁷ o más, preferiblemente 5 × 10⁷ o más, más preferiblemente 10⁸ o más, de manera adicionalmente preferible 5 × 10⁸ o más.

El medicamento según la presente invención es preferiblemente una formulación para administración parenteral, más preferiblemente una formulación para administración sistémica parenteral y particularmente una formulación para administración intravenosa. Los ejemplos de la forma de dosificación adecuada para la administración parenteral incluyen inyecciones tales como inyecciones de tipo disolución, inyecciones de tipo suspensión, inyecciones de tipo emulsión e inyecciones preparadas en el momento de uso e injertos. La formulación para administración parenteral está en forma de una disolución o suspensión aséptica isotónica acuosa o no acuosa, se formula en una forma de dosificación unitaria apropiada en combinación con, por ejemplo, un portador o vehículo farmacológicamente aceptable, tal como, específicamente, agua estéril o solución salina fisiológica, un medio (medio particularmente usado en el cultivo de células de mamíferos, tal como RPMI), una disolución tampón fisiológica tal como PBS, un aceite vegetal, un emulsionante, una suspensión, un tensioactivo, un estabilizador, un excipiente, un vehículo, un conservante, un aglutinante o similar, según sea apropiado.

Los ejemplos de una disolución acuosa para inyección incluyen disoluciones tampón fisiológicas tales como solución salina fisiológica, un medio y PBS, disoluciones isotónicas que contienen glucosa u otro adyuvante farmacéutico, por ejemplo, D-sorbitol, D-manosa, D-manitol, cloruro de sodio o similares, que pueden usarse en combinación con un agente solubilizante adecuado, por ejemplo, alcohol, más específicamente; etanol, polialcohol, propilenglicol, polietilenglicol y tensioactivos no iónicos, por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50, o similares.

[Trastorno vascular isquémico]

El medicamento según la presente invención se usa para tratar un trastorno vascular isquémico. El trastorno vascular isquémico se refiere a un estado que presenta un trastorno vascular local (por ejemplo, degeneración u oclusión) debido a la disminución en la circulación sanguínea arterial, y los ejemplos del mismo incluyen trastornos cerebrovasculares isquémicos y cardiopatías isquémicas.

[Trastorno cerebrovascular isquémico]

El medicamento según la presente invención se usa para tratar un trastorno cerebrovascular isquémico. Tal como se ha descrito anteriormente, se sabe que las MSC proporcionan la protección del cerebro (el parénquima y el vaso sanguíneo) y ya se han usado en terapias para un trastorno cerebrovascular isquémico tal como infarto cerebral mediante administración intravenosa.

Los ejemplos del trastorno cerebrovascular isquémico incluyen infarto cerebral (por ejemplo, infarto cerebral aterotrombótico, trombosis cerebral, embolia cerebral, infarto lagunar, enfermedad ateromatosa de ramas (BAD), síndrome de Trousseau, trastorno de la coagulación sanguínea, disección arterial, infarto venoso, vasculitis, síndrome de anticuerpos antifosfolípidicos, accidente isquémico transitorio (AIT), y similares.

[Cardiopatía isquémica]

El medicamento según la presente invención también se usa para tratar una cardiopatía isquémica tal como infarto de miocardio. El infarto de miocardio se refiere a un estado en el que se desarrolla una oclusión o estenosis en el vaso sanguíneo coronario que suministra oxígeno y nutrición al corazón, reduciendo el flujo sanguíneo, para dejar el músculo cardíaco en un estado isquémico y necrosado.

El medicamento según la presente invención es adecuado para la terapia de reperfusión para la oclusión de vasos, particularmente una fase superaguda (en el plazo de 8 horas) o fase aguda (de 8 horas a 24 horas) de un trastorno cerebrovascular isquémico o infarto agudo de miocardio (en el plazo de 3 días desde la aparición), a los que se les aplica la terapia trombolítica, pero el momento de la aplicación se determina según sea apropiado según los síntomas del paciente.

[Agente trombolítico]

Para un trastorno vascular isquémico (particularmente una fase aguda o fase superaguda de un trastorno cerebrovascular isquémico o infarto de miocardio), la reperfusión del vaso sanguíneo ocluido mediante trombólisis, la eliminación física del coágulo sanguíneo, o similar, es la elección de primera línea para el tratamiento para prevenir la necrosis debida a isquemia.

Los ejemplos del agente trombolítico incluyen urocinasa, pro-urocinasa, activador tisular del plasminógeno (t-PA), nasaruplasa, estreptocinasa, y similares.

Cualquier t-PA que se use en la actualidad es t-PA recombinante (rt-PA). Los ejemplos de rt-PA incluyen alteplasa y tisocinasa, que tienen una secuencia de aminoácidos idéntica a un t-PA nativo y también pamiteplasa, en la que se ha realizado una modificación de aminoácidos para prolongar la semivida, y similares. Los medicamentos que contienen t-PA actualmente en el mercado de Japón incluyen la inyección de ACTIVACIN (R), la inyección de GRTPA (R) y la inyección de Cleactor (R), entre los que los dos primeros están aprobados para su aplicación en un trastorno cerebrovascular isquémico e infarto agudo de miocardio. Además, este último está aprobado para su aplicación en infarto agudo de miocardio y embolia pulmonar aguda.

Si bien los agentes trombolíticos pueden mejorar la isquemia al disolver los coágulos y prevenir la necrosis del tejido cerebral, están asociados con un riesgo de hemorragia. Además, el momento de la administración está limitado, por ejemplo, a un intervalo en el plazo de 6 horas desde la aparición para la urocinasa y un intervalo en el plazo de 4,5 horas desde la aparición para el t-PA.

Dado que el t-PA activa la plasmina, que disuelve la fibrina, un componente principal de los coágulos sanguíneos, y por tanto tiene una mayor capacidad para lisar el coágulo sanguíneo que otros agentes trombolíticos, se ha convertido en el medicamento de elección de la terapia trombolítica en la actualidad. Además, el t-PA tiene efectos tanto como inhibidor de la agregación plaquetaria como agente anticoagulante. Sin embargo, tal como se describió anteriormente, su aplicación está limitada por el riesgo de hemorragia cerebral y el breve intervalo de 4,5 horas para su administración.

El medicamento según la presente invención puede reducir el riesgo de hemorragia cerebral y prolongar el intervalo para la administración, usándose el intervalo terapéutico del mismo en combinación con un medicamento que contiene t-PA.

[Inhibidor de la agregación plaquetaria (antiagregante plaquetario)]

El inhibidor de la agregación plaquetaria (antiagregante plaquetario) puede prevenir la formación de coágulos inhibiendo la agregación de plaquetas. Los ejemplos del inhibidor de la agregación plaquetaria incluyen, pero no se limitan a, aspirina, clopidogrel, cilostazol, ticlopidina, y similares.

5 [Agente anticoagulante (anticoagulante)]

El agente anticoagulante (anticoagulante) puede prevenir la formación de coágulos inhibiendo la función de los factores de coagulación. Los ejemplos del agente anticoagulante incluyen, pero no se limitan a, heparina, heparina de bajo peso molecular, argatrobán, danaparoides sódico, dalteparina, nadroparina, bemiparina, fondaparinux, agentes antitrombina tales como argatrobán, y similares.

El medicamento según la presente invención puede aplicarse antes de, después de o al mismo tiempo que la terapia de reperfusión para la oclusión de vasos. El medicamento según la presente invención (MSC) puede administrarse fácilmente a la parte afectada mediante administración intravenosa, una manera fácil y sencilla.

[Eliminación física de un coágulo sanguíneo]

El método para la eliminación física de un coágulo sanguíneo incluye, pero no se limita a, terapia de extracción mecánica de coágulos mediante una operación intravascular o similar, endarterectomía carotídea, y similares. Además, el método también puede ser reperfusión por una revascularización quirúrgica, tratamiento con endoprótesis vascular, degeneración vacuolar, aspiración terapéutica, ruptura por onda supersónica, o similares.

[Efecto sinérgico]

Cuando se usa en combinación con una terapia de reperfusión para la oclusión de vasos (por ejemplo, administración de un medicamento que incluye un agente trombolítico, un inhibidor de la agregación plaquetaria y un agente anticoagulante, o eliminación física de un coágulo sanguíneo), el medicamento según la presente invención puede reducir el riesgo de hemorragia cerebral asociada con la terapia de reperfusión para la oclusión de vasos. En particular, si bien la aplicación de agentes trombolíticos está limitada debido a su corto intervalo para la administración, el medicamento según la presente invención puede prolongar el intervalo en el que pueden administrarse los agentes trombolíticos. Por ejemplo, usando t-PA en combinación con el medicamento según la presente invención, puede esperarse que el intervalo para la administración de t-PA se prolongue al menos 4,5 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas o más.

Además, el agente trombolítico mejora el efecto terapéutico de las MSC mejorando la microcirculación y aumenta marcadamente el efecto de mejora de la función motora y el efecto de reparación tisular por las MSC en comparación con el de cuando se administra individualmente. De esta manera, el uso combinatorio de un medicamento que contiene un agente trombolítico y el medicamento según la presente invención produce un efecto sinérgico que no puede predecirse a partir de una única administración.

2. Agente preventivo para hemorragia cerebral asociada con terapia de reperfusión para la oclusión de vasos

La presente invención también proporciona un medicamento para prevenir la hemorragia cerebral asociada con la terapia de reperfusión para la oclusión de vasos que comprende la administración de un activador tisular del plasminógeno, que comprende células madre mesenquimatosas. Tal como se describió anteriormente, la terapia de reperfusión para la oclusión de vasos en el trastorno vascular isquémico se asocia con el riesgo de hemorragia cerebral, pero el medicamento según la presente invención puede suprimir la activación de la metaloproteinasa de la matriz (MMP)-9 y suprime de ese modo la disfunción endotelial asociada con la misma y reduce el riesgo de hemorragia cerebral.

En particular, el medicamento según la presente invención posibilita aplicar terapia trombolítica a pacientes a los que no ha sido posible aplicarles convencionalmente terapia trombolítica previniendo la hemorragia cerebral asociada con la administración de un agente trombolítico, que es t-PA, y prolongando el intervalo para la administración del mismo. El medicamento según la presente invención puede mejorar la disfunción motora asociada con un trastorno cerebrovascular isquémico mediante los efectos de regeneración y reparación tisular que tienen las MSC y fomentar la curación de la lesión por infarto, y el agente trombolítico mejora además este efecto de las propias MSC mejorando la microcirculación.

Tal como se describió anteriormente, el medicamento según la presente invención protege el endotelio vascular y suprime la disfunción endotelial y, por tanto, reduce el riesgo de hemorragia cerebral y permite una terapia de reperfusión segura para la oclusión de vasos tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, así como tiene reparación tisular en el sitio del infarto, que es una función original de las MSC, y efecto que mejora la función motora y mejora la disfunción cerebral superior, lo que permite una terapia totalmente nueva para un trastorno vascular isquémico.

Ejemplos

La presente invención se describirá específicamente por los ejemplos a continuación, pero la presente invención no está limitada por estos ejemplos.

5 1. Método

(1) Preparación de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea de rata

10 Se realizó el experimento según las Regulaciones para Experimentos con Animales en la Universidad Médica de Sapporo. Según los informes previos, se diluyó la médula ósea obtenida de fémur de ratas SD adultas hasta 25 ml con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), se añadieron FBS inactivado con calor al 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 0,1 mg/ml, y se incubó la médula ósea durante 3 días a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂ (Kim S. *et al.*, Brain Res. 2006, 1123:27-33. Ukai R. *et al.*, J. Neurotrauma. 2007, 24:508-520.). Se cultivó la médula ósea hasta confluencia y se desprendieron las células adherentes con tripsina-EDTA y se sometieron a pases a una densidad de 1×10^4 células/ml tres veces para obtener células madre mesenquimatosas (MSC).

(2) Modelo de infarto cerebral

20 Como modelo de infarto cerebral, se usó el modelo de oclusión transitoria de la arteria cerebral media de rata (tMCAO). Según los informes previos, se anestesiaron ratas SD macho adultas (de 280 a 330 g: n = 171) con ketamina (75 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) y se insertó una sutura intraluminal de 20,0 a 22,0 mm (MONOSOF) a partir de una arteria carótida externa para inducir una oclusión transitoria de la arteria cerebral media (Honma T. *et al.*, Exp. Neurol. 2006; 199: 56-66. Sasaki M. *et al.*, Methods Mol. Biol. 2009; 549: 187-195.).

25 (3) Protocolo experimental (figura 1)

Sesenta minutos después de establecer la oclusión transitoria de la arteria cerebral media, se obtuvieron DWI-IRM para evaluar el volumen sistólico inicial. Se excluyeron del experimento los animales con un volumen sistólico inicial menor de un patrón (de 220 a 370 mm³). Treinta minutos después de realizar DWI-IRM, se retiraron las suturas intraluminales insertadas y se aleatorizaron las ratas en cuatro grupos experimentales de la siguiente manera.

Grupo 1 (solución salina fisiológica + medio, n = 43)

35 Se les inyectó a las ratas por vía intravenosa solución salina normal (solución salina; 1 ml) inmediatamente después de la reperusión, luego se inyectó medio recién preparado (DMEM; 1 ml) después de treinta minutos.

Grupo 2 (rt-PA + medio, n = 48)

40 Se les inyectó a las ratas por vía intravenosa rt-PA (10 mg/kg; 1 ml) inmediatamente después de la reperusión, luego se inyectó medio recién preparado (DMEM; 1 ml) después de treinta minutos.

Grupo 3 (solución salina fisiológica + MSC, n = 42)

45 Se les inyectó a las ratas por vía intravenosa solución salina fisiológica normal (solución salina; 1 ml) inmediatamente después de la reperusión, luego se inyectaron las MSC ($1,0 \times 10^6$ células cada vez) en 1 ml de medio recién preparado (DMEM) después de treinta minutos.

Grupo 4 (rt-PA + MSC, n = 38)

50 Se les inyectó a las ratas por vía intravenosa rt-PA (10 mg/kg; 1 ml) inmediatamente después de la reperusión, luego se inyectaron las MSC ($1,0 \times 10^6$ células cada vez) en 1 ml de medio recién preparado (DMEM) después de treinta minutos.

55 Se les inyectó diariamente a todas las ratas ciclosporina A (10 mg/kg) por vía intraperitoneal. Se usó toda la infusión intravenosa a través de la vena femoral izquierda.

(4) IRM y medición del volumen de lesiones isquémicas

60 Se anestesió a las ratas con ketamina (75 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) y se realizaron mediciones de IRM. Las mediciones de IRM se realizaron usando un imán superconductor de 7 Tesla, diámetro de 18 cm (Oxford Magnet Technologies) conectado a una consola UNITYINOVA (Oxford Instruments) tal como se describió previamente (Honma T. *et al.*, Exp. Neurol. 2006, 199:56-66., Komatsu K. *et al.*, Brain Res. 2010, 1334:84-92.).

65 Se obtuvieron las DWI sesenta minutos después de la oclusión transitoria de la arteria cerebral media y 1, 4, 7, 14, 21 y 28 días después de la oclusión. Se calculó el área de la lesión isquémica a partir de la imagen de IRM usando Scion

Image, versión Beta 4.0.2 (Scion Corporation). Se determinó el volumen de la lesión (mm^3) mediante el análisis de áreas de alta intensidad en imágenes en serie recopiladas a través del cerebro. Para cada corte, las lesiones de mayor intensidad en DWI y T2WI, en las que la intensidad de la señal fue 1,25 veces mayor que el equivalente en la lesión cerebral contralateral, se marcaron como área de lesión isquémica, y se calculó el volumen del infarto teniendo en cuenta el grosor del corte (1 mm). Se contabilizó la presencia de hemorragia intracerebral cuando hay un área de baja intensidad en la sección de T2WI. Se usaron criterios para normalizar el volumen sistólico inicial y se excluyeron los animales desviados antes de la infusión de MSC o medio.

Se adquirieron imágenes ponderadas por perfusión (PWI) usando una secuencia de ecogradiante ponderada en T_2 (TR=13ms, TE=6,0ms). Se obtuvieron mediciones de PWI dos horas después de la reperusión de la oclusión de la arteria cerebral media. Para el mapeo del flujo sanguíneo cerebral (CBF) por PWI, se eligió un corte frontal en el bregma -0,4 mm para la cuantificación del flujo sanguíneo cerebral. Las regiones de interés (ROI; 60 x 60 píxeles) se ubicaron en una lesión periinfartada en el hemisferio isquémico. La coordenada en relación al bregma para el centro de ROI estaba en DWI: 0,3 mm caudal, 1,25 mm lateral, 0,1 mm de profundidad. Se cuantificó un flujo sanguíneo cerebral regional (rCBF) en cada ROI usando el software Perfusion Solver. Se calculó una razón de rCBF con el rCBF en el hemisferio infartado dividido entre el del hemisferio no infartado.

(5) Cimografía en gelatina

Se realizó cimografía en gelatina usando tejido cerebral extraído de ratas el día 1 después de la oclusión transitoria de la arteria cerebral media. Se homogeneizaron las muestras de cerebro inmediatamente después de la perfusión en 10 veces el volumen de tampón de lisis (NaCl 150 mM, dodecilsulfato de sodio [SDS] al 1%, ácido desoxicólico al 0,1% y Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) que contenía inhibidores de proteasa sobre hielo y se centrifugaron durante 15 minutos con fuerza centrífuga: 9000 g, a 4°C, y luego se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Se determinó la concentración de proteína total de cada sobrenadante mediante el ensayo de proteínas Thermo BCA (Pierce) y se midió la actividad de metaloproteínasa de la matriz (MMP)-9 usando un kit de cimografía en gelatina (Primary Cell).

(6) Prueba de esfuerzo en cinta sin fin

Se entrenó a las ratas 20 min/día durante dos días a la semana para correr sobre una cinta sin fin motorizada (Muromachi Inc.) a una velocidad de 20 m/min con una pendiente de 20 antes de la oclusión transitoria de la arteria cerebral media. Se registró la velocidad máxima a la que las ratas podían correr sobre una cinta sin fin motorizada los días 1, 4, 7, 14, 21 y 28 después de la oclusión transitoria de la arteria cerebral media.

(7) Análisis estadístico

Todos los datos presentados son el promedio $\pm$ EEM, a menos que se especifique lo contrario, y se realizó el análisis estadístico usando el software JMP Statistical Discovery (JMP10, SAS Institute Inc). Se evaluaron las diferencias entre los grupos mediante ANOVA con una prueba de Tukey a posteriori.

2. Resultados

(1) Hemorragia después de la administración intravenosa de rt-PA

Los acontecimientos hemorrágicos agudos en el grupo 2 (rt-PA + medio) son mayores que los otros tres grupos experimentales en cuanto a tasa de incidencia (grupo 1 = 9,5%, grupo 2 = 50%, grupo 3 = 3,6%, grupo 4 = 10%, $p < 0,01$, ANOVA: figura 2B) y volumen hemorrágico (grupo 1 = $0,14 \pm 0,01 \text{ mm}^3$; grupo 2 = $3,20 \pm 1,54 \text{ mm}^3$; grupo 3 = $0,01 \pm 0,01 \text{ mm}^3$; grupo 4 = $0,48 \pm 0,39 \text{ mm}^3$, $p < 0,01$, ANOVA: figura 2C). Cabe señalar que los acontecimientos hemorrágicos después de la terapia con rt-PA en el grupo 2 se redujeron mediante la infusión de MSC en el grupo 4 (disminución de la tasa de incidencia en un 40% de, $p < 0,01$, prueba de Tukey a posteriori: disminución de volumen en $2,72 \text{ mm}^3$, $p < 0,05$, prueba de Tukey a posteriori). Esto sugiere que la infusión intravenosa de MSC tiene potencial para reducir la incidencia y el volumen de la hemorragia intracerebral.

(2) Cimografía en gelatina

La cimografía en gelatina indicó que el lado ipsilateral del cerebro mostró una actividad de MMP-9 en el grupo 4 (rt-PA + MSC) menor que la del grupo 2 (rt-PA + medio) ($p < 0,01$, prueba de Tukey a posteriori) y una activación de MMP-9 en el grupo 3 (solución salina fisiológica + MSC) menor que la del grupo 1 (solución salina fisiológica + medio) ($p < 0,01$, prueba de Tukey a posteriori: figura 3). Aunque la regulación por incremento de MMP-9 contribuye a la transformación hemorrágica después de la reperusión, estos resultados sugieren que la infusión de MSC puede disminuir la actividad de MMP-9 y suprimir los acontecimientos hemorrágicos.

(3) Volumen de lesiones isquémicas mediante análisis por IRM

Se evaluó el volumen de lesiones isquémicas en cuatro grupos de prueba usando DWI-IRM. Se obtuvieron DWI-IRM

a los sesenta minutos (columna 1) y no confirmaron diferencias en el volumen sistólico inicial entre los grupos (grupo 1 = 274 +/- 33 mm³; n = 9, grupo 2 = 279 +/- 27 mm³; n = 12, grupo 3 = 267 +/- 38 mm³; n = 11, grupo 4 = 276 +/- 38 mm³; n = 9, ANOVA, p = 0,75). Se obtuvieron T2WI-IRM de los cuatro grupos el día 1 (columna 2), el día 4 (columna 3), el día 14 (columna 4), el día 28 (columna 5) después de la oclusión transitoria de la arteria cerebral media (figura 4A).

En todos los grupos, el volumen de lesiones estimado disminuyó gradualmente a lo largo del tiempo entre la oclusión transitoria de la arteria cerebral media y el día 28 (figura 4B). Los grupos tratados con MSC mostraron una mayor reducción de volumen en comparación con los grupos infundidos con medio los días 14, 21 y 28 (p < 0,01, prueba de Tukey a posteriori: figura 4B). El volumen de lesiones en el grupo rt-PA + MSC (grupo 4) es un 22% el día 14, un 21% el día 21 y un 25% el día 28 más pequeño que el grupo rt-PA + medio (grupo 2), respectivamente.

Aunque no hubo significación estadística, hubo tendencias de que la reducción en el volumen de lesiones fue mayor para el grupo rt-PA + MSC (grupo 4) en los días 4, 7, 14, 21 y 28 y el volumen de lesiones isquémicas es mayor para el grupo rt-PA + medio (grupo 2) a lo largo del tiempo hasta el día 28 (figura 4B). Estos resultados indican que la infusión intravenosa de MSC mejora la reducción del volumen de lesiones isquémicas incluso si se realiza la terapia con rt-PA.

(4) Análisis del flujo sanguíneo cerebral

Para evaluar el rCBF, los mapas de CBF derivados de PWI permitieron un análisis cuantitativo adicional de los cambios hemodinámicos de la lesión definida en el cerebro isquémico. Una hora después de la reperusión de la oclusión transitoria de la arteria cerebral media, las razones de rCBF son similares entre los grupos de terapia con rt-PA (grupos 2 y 4) y entre los grupos de terapia sin rt-PA (grupos 1 y 3), pero las razones de rCBF de los grupos de terapia con rt-PA son aproximadamente un 23% más altas que las de los grupos de terapia sin rt-PA (figura 4C). Estos resultados sugieren que la razón de rCBF puede aumentarse un 23% con la terapia con rt-PA recibiendo y sin recibir una infusión intravenosa de MSC después de la terapia con rt-PA (p<0,01, ANOVA).

(5) Función conductual

Se registró la velocidad máxima a la que las ratas podían correr sobre una cinta sin fin motorizada. Antes de la oclusión transitoria de la arteria cerebral media, todas las ratas alcanzaron 70 m/min, pero veinticuatro horas después de la oclusión transitoria de la arteria cerebral media, la velocidad máxima en la prueba de cinta sin fin estaba en su máximo déficit. Ambos grupos infundidos con MSC (grupo 3: n = 11, grupo 4: n = 9) tuvieron una mayor velocidad máxima desde el día 4 hasta el 28 que el control no tratado con MSC (grupo 1: n = 9, grupo 2: n = 12), además, el grupo 4 alcanzó una mayor velocidad que el grupo 3 desde el día 7 hasta el día 28. Estos resultados indican que la combinación de administración intravenosa de MSC con terapia con rt-PA fomenta la recuperación posterior a un infarto en comparación con una administración única de MSC (figura 5).

3. Análisis

La evaluación de la tasa de incidencia de hemorragia cerebral y el volumen de hemorragia después de la terapia con rt-PA usada en combinación con la administración intravenosa de MSC en una fase aguda de oclusión transitoria de la arteria cerebral media indicó que la administración de MSC puede suprimir la disfunción endotelial vascular. Aunque el grupo de terapia con rt-PA sin MSC mostró una mayor tasa de incidencia de hemorragia intracerebral y un mayor volumen sistólico, la infusión intravenosa de MSC con terapia con rt-PA después de la oclusión transitoria de la arteria cerebral media da como resultado una mayor reducción tanto en la tasa de incidencia como en el volumen de lesiones isquémicas de hemorragia cerebral.

Los mecanismos moleculares que subyacen a los acontecimientos hemorrágicos después de la terapia con rt-PA siguen sin estar claros; sin embargo, estudios previos sugirieron que la MMP-9 está implicada en la interrupción de la vasculatura en la reperusión después de un accidente cerebrovascular agudo.

Las MSC protegen el cerebro. Además, la administración intravenosa de MSC puede proteger la interrupción de la vasculatura por la no degradación de la lámina basal y/o la matriz extracelular con la expresión reducida de MMP-9. Las MSC infundidas inhiben la disfunción endotelial para disminuir la tasa de incidencia tanto de hemorragia intracerebral como del volumen hemorrágico a pesar de que el rt-PA se infundió en la fase aguda de la isquemia cerebral. Aunque la eficacia terapéutica de las MSC es consistente con estudios previos, los efectos sinérgicos de la terapia con rt-PA y la administración de MSC en el infarto isquémico, es decir, la mejora destacada de la función y la disminución del volumen de lesiones isquémicas, son resultados notables.

Los grupos infundidos con rt-PA (grupos 2 y 4) mostraron un aumento de rCBF en la lesión 2 horas después de la reperusión. El grupo 2 presentó un aumento de rCBF, pero ningún efecto terapéutico por la administración de rt-PA. Por tanto, incluso si se mejora el flujo sanguíneo cerebral, simplemente mejorado, no hay efecto terapéutico. Sin embargo, se hallaron efectos sinérgicos en el efecto terapéutico cuando se combinó con las MSC (grupo 4). Este efecto terapéutico fue mayor en comparación con una administración única de MSC (grupo 3). Por consiguiente, se

considera que la terapia con rt-PA mejora sinérgicamente el efecto terapéutico de las MSC al mejorar la microcirculación y contribuye a la mejora de la función motora y la mejora de la lesión por accidente cerebrovascular mediante las MSC.

5 La aplicación de la terapia celular se considera para muchas enfermedades neurológicas, incluyendo el infarto cerebral. El uso de rt-PA es una terapia actualmente establecida en el plazo de varias horas después del infarto isquémico. En el futuro, a los pacientes que reciban terapia con rt-PA en una fase aguda se les administrarán clínicamente MSC. Los hallazgos de esta investigación respaldarán este protocolo. Por consiguiente, la administración de las MSC reduce el riesgo de hemorragia cerebral mediante el rt-PA. Además, la terapia con rt-PA mejora el efecto terapéutico de las MSC.

10 El modelo de isquemia cerebral transitoria usado en este ejemplo es un modelo en el que se induce un infarto cerebral mediante la inserción de una sutura intraluminal en un vaso sanguíneo cerebral y, después de la hemostasia durante un determinado tiempo o más, se recanalizó físicamente el flujo sanguíneo retirando el hilo (eliminación física). En el grupo 3 (solución salina fisiológica + MSC, n = 42) de entre los 4 grupos, se ha hallado el efecto supresor de hemorragia cerebral de la administración de las MSC, lo que indica que las MSC tienen el efecto supresor de hemorragia cerebral también en una terapia de reperfusión para la oclusión de vasos mediante la eliminación física de un coágulo sanguíneo. El método según la presente invención también es aplicable a otros métodos de eliminación física que incluyen, por ejemplo, eliminación de coágulos mediante terapia intravascular, terapia mecánica de eliminación de coágulos, endarterectomía carotídea y revascularización quirúrgica.

15 Además, dado que el t-PA (incluido el rt-PA) tiene efectos tanto como inhibidor de la agregación plaquetaria como agente anticoagulante, este ejemplo sugiere que las MSC tienen el efecto supresor de hemorragia cerebral incluso en la reperfusión de vasos sanguíneos ocluidos por inhibidores de la agregación plaquetaria y agentes anticoagulantes.

25 **Disponibilidad industrial**

Según la presente invención, puede reducirse el riesgo de hemorragia cerebral asociada con una terapia de reperfusión para la oclusión de vasos que comprende la administración de un activador tisular del plasminógeno y puede mejorarse el efecto terapéutico sobre los trastornos vasculares isquémicos. La presente invención es útil en terapia para trastornos vasculares isquémicos incluyendo infarto cerebral e infarto de miocardio.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Medicamento que comprende células madre mesenquimatosas para su uso en el tratamiento de un trastorno vascular isquémico, en el que el medicamento se usa en combinación con una terapia de reperfusión para la oclusión de vasos, en el que la terapia de reperfusión para la oclusión de vasos comprende la administración de un activador tisular del plasminógeno.
- 10 2. Medicamento para su uso según la reivindicación 1, en el que el medicamento reduce el riesgo de hemorragia cerebral asociada con la terapia de reperfusión para la oclusión de vasos.
- 15 3. Medicamento para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que el trastorno vascular isquémico es un trastorno cerebrovascular isquémico o infarto de miocardio, preferiblemente, en el que el trastorno vascular isquémico es una fase superaguda o fase aguda de un trastorno cerebrovascular isquémico o infarto agudo de miocardio.
- 20 4. Medicamento para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células madre mesenquimatosas son células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea.
- 25 5. Medicamento que comprende células madre mesenquimatosas para su uso en la prevención de hemorragia cerebral asociada con una terapia de reperfusión para la oclusión de vasos, en el que la terapia de reperfusión para la oclusión de vasos comprende la administración de un activador tisular del plasminógeno.
- 30 6. Medicamento para su uso según la reivindicación 5, en el que el medicamento se usa para un paciente con un trastorno vascular isquémico.
7. Medicamento para su uso según la reivindicación 6, en el que el trastorno vascular isquémico es un trastorno cerebrovascular isquémico o infarto de miocardio, preferiblemente, en el que el trastorno vascular isquémico es una fase superaguda o fase aguda de un trastorno cerebrovascular isquémico o infarto agudo de miocardio.
8. Medicamento para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que las células madre mesenquimatosas son células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea.

FIG. 1

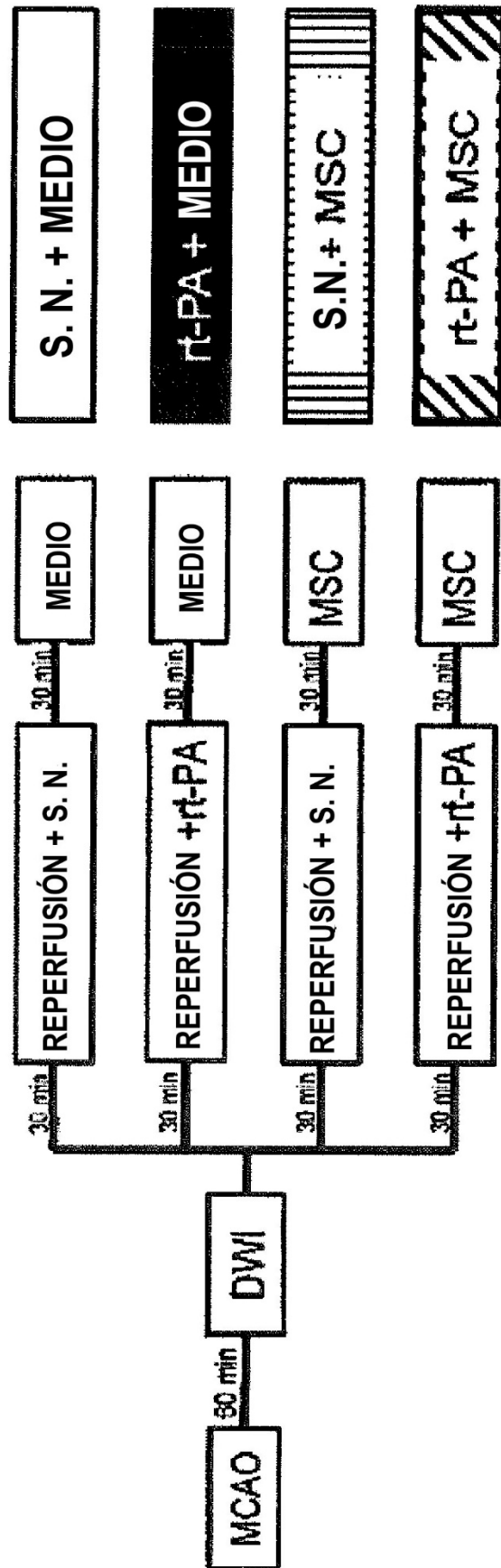


FIG. 2

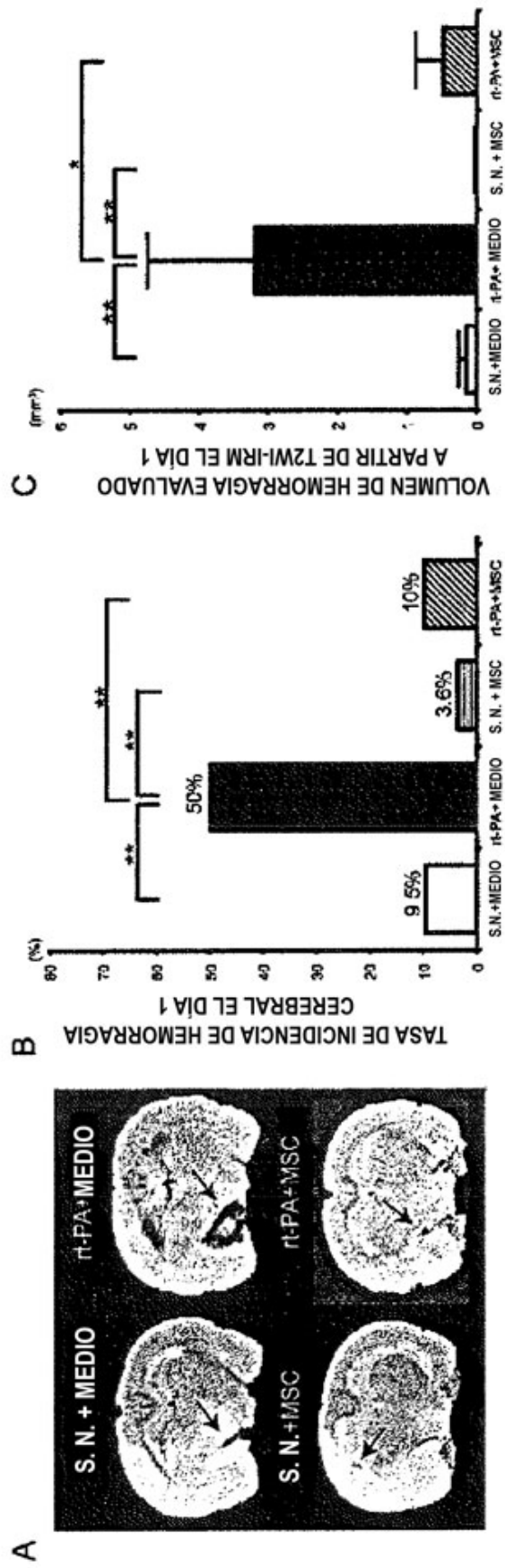


FIG. 3

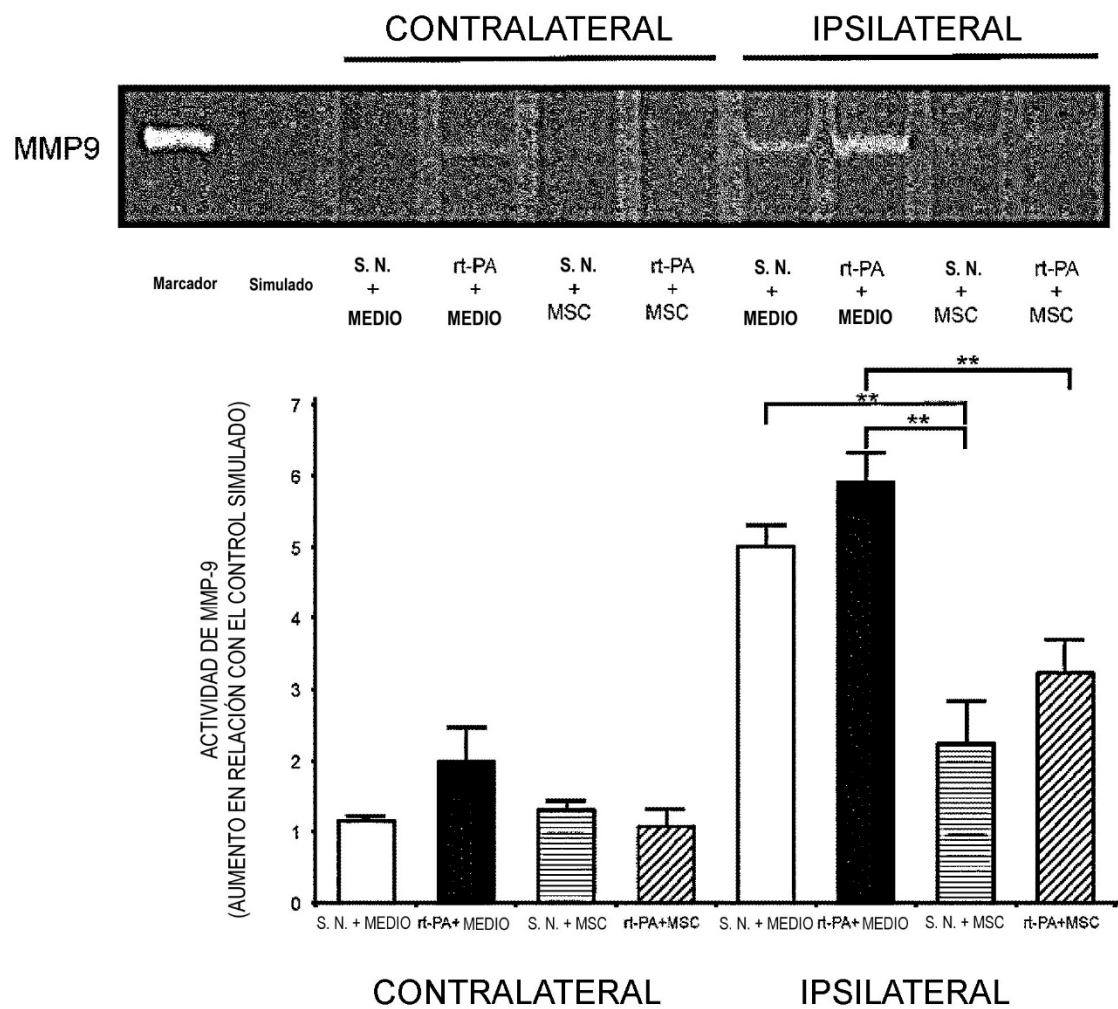


FIG. 4

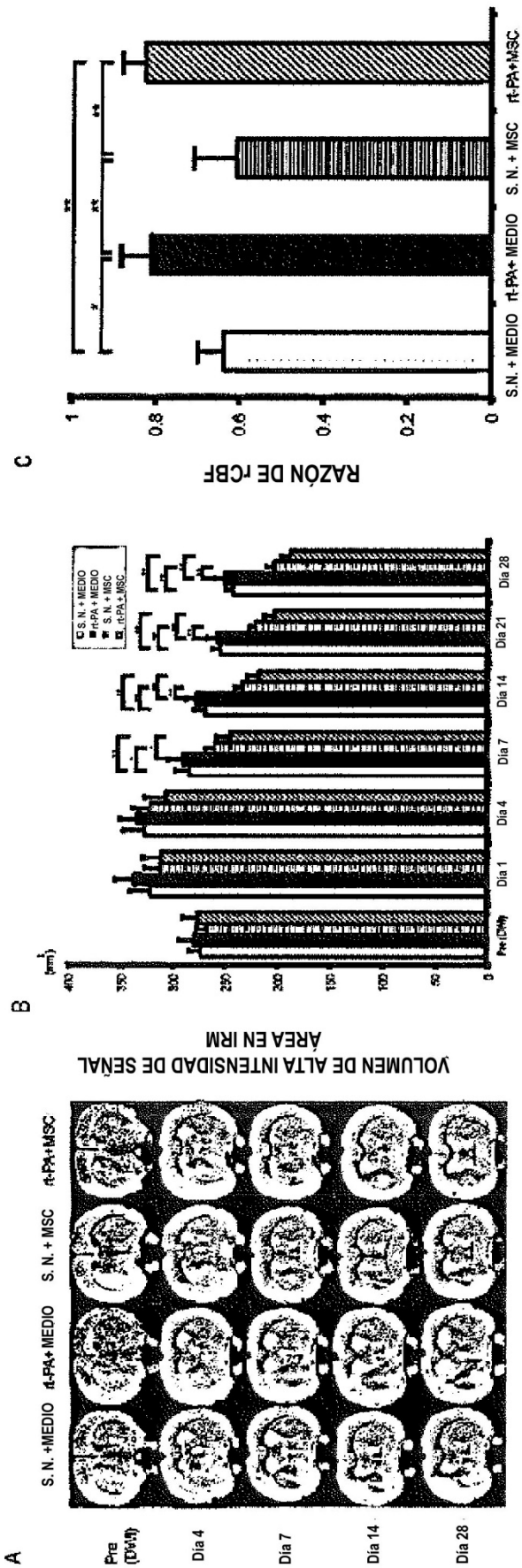


FIG. 5

