

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 674**

21 Número de solicitud: 201031016

51 Int. Cl.:

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

A61L 27/56 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

30.06.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.05.2012

Fecha de la concesión:

29.04.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

13.05.2013

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE MALAGA (40.0%)

AVDA. CERVANTES 2

29071 MALAGA (Málaga) ES;

CIBER-BBN (40.0%) y

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (20.0%)

72 Inventor/es:

ANDRADES GOMEZ, Jose Antonio;

LOPEZ-PUERTA GONZALEZ, Jose Maria;

CUENCA LOPEZ, Maria Dolores;

JIMENEZ PALOMO, Pedro y

BECERRA RATIA, José

54 Título: **CELULAS MESENQUIMALES Y MEMBRANA COMPUESTA PARA EL TRATAMIENTO DE LESIONES OSTEOCONDRALES**

57 Resumen:

Células mesenquimales y membrana compuesta para el tratamiento de lesiones osteocondrales.

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimales alojadas en una membrana compuesta que presenta al menos dos capas con distinta estructura, siendo la capa inferior porosa y la capa superior compacta, preferiblemente de colágeno. Además, la presente invención se refiere al uso de dicha composición farmacéutica para el tratamiento de lesiones osteocondrales y al método para la obtención de dicha composición farmacéutica.

ES 2 380 674 B1

DESCRIPCIÓN

Células mesenquimales y membrana compuesta para el tratamiento de lesiones osteocondrales.

5 La presente invención pertenece al campo de la Biomedicina, de la Biotecnología, de la Biología Celular y de la Medicina Regenerativa. La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimales alojadas en una membrana compuesta y a su uso para el tratamiento de lesiones osteocondrales.

10 Estado de la técnica anterior

El cartílago es un tejido conectivo altamente especializado, formado por células, principalmente condroblastos o condrocitos, y fibras, mayoritariamente de colágeno; todo ello embebido en una matriz extracelular (MEC) amorfa, viscosa, de aspecto gel y con una alta complejidad bioquímica, estructural y biomecánica (Buckwalter JA y col. *Arthr Rheumatol*, 1998, 41: 1331-1342; Johnson, LL. *Clin Orthop Rel Res*, 2001391: 306-317).

El cartílago articular (CA) proporciona a los huesos sobre los que se dispone una superficie elástica y resistente, a la vez que protege a la articulación repartiendo la presión (compresión) de carga a la que es sometida. Al mismo tiempo, junto con el líquido sinovial, proporciona un coeficiente de baja fricción que permite el movimiento libre de la propia articulación (Aigner, T. *Arthritis Rheum*, 2003, 48: 1166-1177). Las fibras colagénicas que constituyen la MEC de este cartílago son predominantemente de tipo II, acompañadas por proteoglicanos, responsables, específicamente el agregano, del alto grado de hidratación de su matriz gracias a su capacidad para retener agua, en torno a un 75%, debido a su naturaleza electrostática negativa. En relación al componente celular, los condrocitos son células predominantemente redondeadas, originadas a partir de células madre mesenquimales (MSCs, del inglés "*Mesenchymal Stem Cells*"), procedentes de la médula ósea (MO) localizada en cavidades de la matriz (Lin y col., *Tissue Eng*. 2006, 12(7): 1971-84.), y representan un 5-10% del volumen de la fase sólida del cartílago. Los condrocitos son esenciales en el mantenimiento de la MEC, regulando tanto la secreción de sus componentes como la degradación o la remodelación de la misma (Hunziker, EB. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002, 16: 564-572). Estructuralmente, el CA se divide en tres zonas diferentes: la superficial (ZS), la media (ZM), y la profunda (ZP). Estas regiones, con funciones específicas diferentes, se identifican por la composición de la MEC, su biosíntesis, la expresión génica y morfología de sus células, así como por las distintas propiedades biomecánicas de las mismas (Schinagl, RM y col. *J Orthop Res* 1997, 15: 499-506; Darling, EM y col. *J Orthop Res*. 2004, 22: 1182-1187; Shieh, AC y col. *J Biomech*. 2006, 39: 1595-02).

La gran mayoría de las lesiones condrales descritas ocurren en la ZS del cartílago. Desde el punto de vista clínico, el CA presenta una limitada capacidad de regeneración, debido a: 1) su naturaleza avascular, por lo que está desprovisto de una fuente disponible de células madre circulantes (células condroprogenitoras; Martin JM y col., *Biotechnol Prog*, 2005, 21: 168-177) y de los factores humorales correspondientes; 2) su naturaleza aneural, con la consiguiente carencia de inervación; y 3) la alta complejidad de su MEC que, en un eventual proceso de reparación, no recapitula su propio desarrollo y morfogénesis.

Dependiendo de la profundidad del daño, existen 3 tipos de lesiones que afectan al CA: microtrauma, fractura condral y fractura osteocondral. En cualquiera de dichas situaciones puede encuadrarse la osteoartritis (OA), la forma más común de artritis, una enfermedad muy dolorosa, de una altísima prevalencia en la sociedad (24 millones de adultos en EEUU), que no necesariamente es una consecuencia de la edad, y que afecta directamente al CA por alteración de su integridad, limitando la movilidad de la articulación (Nakamura, N y col. *J Arthr Rel Surg*, 2009, 25: 531-55). La etiología de la OA es desconocida y se manifiesta en cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares de las células y de la MEC del cartílago hialino (Christensen, R y col. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005, 13: 20-27).

Actualmente, la solución clínica de las lesiones condrales supone un reto para los clínicos y científicos. La reparación es el proceso rápido para resolver una lesión, pero el tejido reparativo no es idéntico al tejido original, pudiendo existir incluso una falta de integración con el mismo. La regeneración, en cambio, es un proceso relativamente lento que recapitula el desarrollo y la morfogénesis del tejido a tratar, restaurando completamente la estructura y función del mismo, incluyendo una adecuada integración con el tejido original. A pesar de que los tratamientos de los últimos años son prometedores, todavía no se ha encontrado ningún procedimiento que pueda producir una reparación ni regeneración satisfactoria del cartílago hialino y el hueso subcondral.

Teniendo en cuenta la capacidad de la célula cartilaginosa para nutrirse por difusión de la MEC y por imbibición sinovial, recientemente, desde los trabajos pioneros de Heatley, FW y col. (*J Bone Joint Surg Br*. 1980, 62: 397-402) se han desarrollado procedimientos quirúrgicos para tratar de reparar los defectos osteocondrales, o para al menos proporcionar un alivio sintomático. El objetivo es prevenir la extensión de las lesiones e inducir la regeneración del cartílago, o al menos retrasar la progresión a OA o la necesidad de reemplazamiento articular.

Estas técnicas se dividen en 4 categorías:

- 65 a) tratamiento sintomático,
- b) estimulación de células derivadas de la MO,

- c) condrogénesis con células o tejidos trasplantados, y
- d) trasplantes de cilindros osteocondrales.

5

La microfractura (b), que provoca la afloración de MO por perforación del hueso subcondral (Buckwalter JA y col. Arthr Rheumatol, 1998. 41: 1331-1342); o la mosaicoplastia (d), ya sea heteróloga o autóloga, que transfiere cilindros de cartílago hialino procedente de tejido sano, bien de zonas de menos carga próximas a la lesión, o de otra articulación (Hunziker y col. Tiss Eng. 2006, 12: 3341-3364), acaban provocando la formación de fibrocartílago como tejido cicatricial, el cual se muestra inviable para devolver las características propias del CA a largo plazo, representando además, con el paso de los años del paciente, lugares de fácil fractura y nuevas lesiones (Buckwalter y col. Clin Orthop Rel Res, 2004. 423: 7-16), al margen de problemas para obtener suficiente superficie de cartílago a trasplantar y de dañar un área para reparar otra. En el caso de c), técnica muy extendida en la clínica, se está trabajando con el trasplante de condrocitos autólogos, ya sea en ausencia de transportador (ACI, del inglés “Autologous Chondrocytes Implantation”), o vehiculizados en una membrana (MACI, del inglés “Matrix Autologous Chondrocytes Implantation”), casi siempre de colágeno. En este sentido, algunos trabajos se están centrando en la obtención de cultivos celulares de condrocitos y su implantación *in situ*, aunque este procedimiento está planteando problemas de falta de prendimiento del implante a la lesión a medio plazo. En ningún caso, y hasta el momento, se indica que el ACI/MACI sean superiores a otras alternativas terapéuticas en el tratamiento de las lesiones condrales de rodilla; más bien al contrario, por tratarse de un procedimiento altamente invasivo y relativamente costoso, ya que necesita de dos intervenciones quirúrgicas.

Por tanto, en la actualidad no existen criterios claros acerca de cuál de estas alternativas es la más adecuada para el tratamiento de las lesiones del CA. Con todo ello, y en consecuencia, la ingeniería tisular tiene actualmente el reto de resolver el problema clínico de la regeneración del CA, estimulando el crecimiento de suficiente cartílago nuevo en el lugar de la lesión e impidiendo la pérdida posterior del mismo (Hollander AP y col. Tiss Eng. 2006, 12: 1787-1798).

Las células son los efectores únicos e insustituibles de la esqueletogénesis. Su número y biología sufren cambios significativos con la edad y la enfermedad, que pueden ser corregidos mediante acción directa, induciendo su proliferación, migración y diferenciación *in situ*, o indirectamente, realizando esos procesos *ex vivo*, aprovechando los conocimientos que nos proporcionan las células troncales y la terapia celular. Las especiales características de los tejidos esqueléticos, donde la MEC, como hemos dicho, alcanza especial relevancia, hace que la vehiculización de células y moléculas a su través permita la condroosteoconducción y condroosteoinducción de la forma deseada. El desarrollo de los materiales condroosteoconductores, realizado por los avances que permiten la conquista de magnitudes nanométricas, presenta un panorama de cambios significativos en la clínica ortopédica. En estos momentos, se está extendiendo la estrategia experimental que trata de buscar MSCs susceptibles de diferenciarse hacia condroblastos, las cuales pueden aislarse a partir de tejidos adultos, tales como MO, músculo esquelético, grasa y sinovia. Las MSCs representan un atractivo para la medicina regenerativa del cartílago, porque se pueden obtener con una mínima morbilidad, aislar y expandir fácilmente en cultivo y son multipotentes, incluyendo la vía condrogénica (Yoshimura y col. Cell Tiss Res. 2007, 327: 449-462).

A pesar de estos datos, actualmente no existe todavía un criterio único a la hora de proponer la terapia celular más adecuada, con una clarificación de los procedimientos, parámetros y condiciones a fin de seleccionar la fuente celular ideal.

45

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un producto eficaz para la terapia celular de las lesiones del cartílago articular (CA) que se prepara *in vitro* y se basa en células madre mesenquimales (MSCs) adultas autólogas y un biomaterial con una organización fibrilar novedosa en forma de membrana compuesta.

Gracias a este producto, en la lesión condroosteoarticular se forma un tejido de regeneración igual al cartílago adyacente en los tres estratos cartilaginosos e igual al hueso subcondral, tanto en la organización y la disposición de las células como en la cantidad y la calidad de la matriz cartilaginosa u ósea circundante. El tejido regenerado se integra de manera permanente en el tejido receptor y, además, es funcional desde el punto de vista de su respuesta a las fuerzas de carga.

Los autores de la presente invención han demostrado que este producto permite la formación de cartílago de manera natural y, por tanto, que el nuevo tejido se forma *de novo* y queda integrado en el tejido a tratar, permitiendo una regeneración estable, duradera y funcional. Es decir, este producto permite una regeneración intratisular más que una reparación de la lesión.

Los autores de la presente invención presentan evidencia experimental que demuestra la eficacia de una terapia regenerativa que se basa en el implante de MSCs capaces de diferenciarse a condrocitos, vehiculizadas en una matriz compuesta. Los resultados positivos obtenidos avanzan en la aplicación clínica de una terapia celular basada en MSCs para el tratamiento de las lesiones del CA.

En el ámbito de la Cirugía Ortopédica y la Traumatología, la presente invención proporciona un producto y una metodología para la regeneración del cartílago hialino articular por medio de la condrogénesis y la osteogénesis terapéutica, destinada, entre otros, a pacientes afectados de lesiones osteocondrales que, en mayor o menor superficie, pueden desencadenar osteoartritis localizadas y áreas de osteocondritis.

La solución que ofrece la presente invención supone una mejora sobre los productos y métodos que se conocen hasta la fecha.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una composición (en adelante llamada composición de la invención) que comprende células madre mesenquimales y una membrana compuesta. Preferiblemente, el origen de las células madre mesenquimales es la médula ósea.

Las células madre mesenquimales (MSCs) son células multipotentes, es decir, capaces de dar lugar a distintos tipos celulares y que tienen capacidad de autorrenovación, de origen mesodérmico. Las MSCs pueden dar lugar, tanto *in vitro* como *in vivo*, a adipocitos, condrocitos, osteoblastos, miocitos, e incluso a neuronas, hepatocitos y células pancreáticas. La médula ósea es un tejido flexible que se encuentra en el interior de algunos huesos, entre los que se incluyen los huesos largos, la cintura escapular y la pelvis. Su función principal es la hematopoyesis, por lo que contiene células madre hematopoyéticas, aunque también contiene células estromales, cuya función no es directamente la hematopoyesis, entre las que se encuentran las MSCs.

El término “compuesta”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a que la membrana presenta al menos dos capas con distinta estructura. Preferiblemente dicha membrana presenta dos capas y es por tanto una membrana bifásica.

En una realización más preferida del primer aspecto de la invención, las células madre mesenquimales son positivas para CD13, CD29, CD44, CD71, CD90, CD105, CD271 y Stro1; y negativas para CD34 y CD45.

Los marcadores CD hacen referencia a moléculas que se encuentran en la superficie celular, y que pueden detectarse con anticuerpos específicos. Su nombre viene del inglés “*cluster of differentiation*” y se usan comúnmente para la identificación del tipo celular, el estadio de diferenciación o la actividad celular. Stro1 se refiere a un anticuerpo que se ha descrito como capaz de reconocer MSCs de la médula ósea.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, por cada mm² de membrana hay entre 250.000 y 2.000.000 MSCs. Preferiblemente, por cada mm² de membrana hay entre 400.000 y 1.000.000 MSCs. Más preferiblemente, por mm² de membrana hay entre 450.000 y 600.000 MSCs.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la membrana compuesta comprende al menos una capa compacta con poros cuyo diámetro es menor de 35 μ m y al menos una capa porosa que comprende poros cuyo diámetro es de entre 35 y 300 μ m. Preferiblemente, la membrana compuesta comprende colágeno. Más preferiblemente, el colágeno es de tipo I y III.

En la capa compacta, la densidad de fibras de colágeno es tan alta que apenas quedan huecos entre ellas que puedan albergar MSCs. Se trata de una capa con una resistencia mecánicamente similar a la del cartílago. En la capa porosa de la membrana hay menos fibras de colágeno y éstas se disponen de forma que dejan entre ellas grandes espacios capaces de albergar las MSCs.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, los poros de la capa porosa tienen entre 4 y 14 millones de μ m³ de volumen medio.

El colágeno es una proteína característica del tejido conectivo, donde es secretado a la matriz extracelular (MEC) por las células que lo forman. El colágeno se agrega y forma fibras de unos 300 nm de largo y 1,5 nm de diámetro. Hasta la fecha se han descrito 29 tipos de colágeno, aunque los tipos I, II, III y IV son los más abundantes. El tipo I es el más abundante y se encuentra en los huesos, la piel, los tendones y las paredes arteriales. Forma fibrillas que se agrupan en fibras y otorga resistencia al tejido. El tipo III es el componente principal de las fibras reticuladas y es más abundante en el tejido conjuntivo laxo, en las paredes de los vasos sanguíneos, en el intestino y el útero. Se asocia a las fibrillas de colágeno I y funciona como sostén en tejidos expandibles.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, entre el 70% y el 90% de las células se sitúan en la capa porosa de la membrana.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la membrana está recubierta con una composición que favorece la adhesión de las células. Esta composición puede incluir cualquier molécula que favorece la adhesión celular, como son algunas proteínas de la matriz extracelular o algunos polímeros como la poli-lisina o la poli-ornitina.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la membrana está recubierta con una molécula de la matriz extracelular. Preferiblemente, la molécula de la matriz extracelular es fibronectina, laminina o colágeno. Más preferiblemente, es fibronectina.

La fibronectina es una glicoproteína típica de la MEC implicada en procesos como la adhesión, la migración, el crecimiento y la diferenciación celular.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la membrana imita la forma de una lesión osteocondral y presenta unas dimensiones iguales o mayores a las de la lesión, de forma que la membrana, en posición superpuesta a la lesión, sobresale respecto de dicha lesión en una magnitud menor de 2 mm.

La composición farmacéutica de la invención puede diseñarse como un implante cuyas dimensiones se adaptan a medida de la lesión en cuestión. Generalmente, el cartílago articular es un tejido fino, con una profundidad de alrededor de 1,5 cm en humanos y de menos 3 mm en conejos. Las dimensiones de la membrana se adaptan, por tanto, a la superficie de la lesión, y pueden ser tales que cada lado sea 1 mm más grande que la superficie de la lesión. Por ejemplo, para una lesión de 3 mm de largo, 4 mm de ancho y 3 mm de profundidad, se podría preparar una membrana de 4 mm de largo y 5 mm de ancho. Una vez lista la membrana, recubierta o no, se introducirían las MSCs en su interior.

Para la colocación de la membrana con las MSCs en la lesión, basta con introducir dicha membrana en el hueco que deja la lesión, comprimiendo ligeramente la membrana para que entre dentro de dicha lesión. El tamaño ligeramente mayor de la membrana permite que se mantenga en la posición deseada y no se mueva ni se salga cuando se utilice la articulación. De esta forma se evita la sutura de la membrana a la lesión, lo cual agiliza el proceso del implante y lo hace más sencillo, aunque en casos de lesiones de gran tamaño puede ser necesario utilizar sutura para la colocación de la membrana con las MSCs en la lesión.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la composición farmacéutica además comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un excipiente es un componente de una composición farmacéutica que no es un compuesto activo sino un diluyente, un vehículo o un relleno, entre otros, que se considera farmacéuticamente aceptable cuando es seguro, no es tóxico y no presenta efectos adversos.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la composición farmacéutica además comprende otro principio activo.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención para la preparación de un medicamento. Preferiblemente, el medicamento es para el tratamiento de una lesión de cartílago. Más preferiblemente, es para la regeneración del cartílago. Preferiblemente, el medicamento es para el tratamiento de una lesión de hueso. Más preferiblemente, es para la regeneración del hueso. Más preferiblemente, para el tratamiento de una lesión osteocondral. Aún más preferiblemente, el medicamento es para el tratamiento de la osteoartritis. Una lesión osteocondral es una lesión del cartílago y del hueso subcondral. La osteoartritis es una enfermedad en la que se produce el desgaste del cartílago, lo cual provoca el roce de los huesos y su consiguiente desgaste e inflamación.

La composición farmacéutica de la presente invención puede emplearse como un implante en la terapia regenerativa de lesiones de cartílago. Esta composición farmacéutica podría administrarse colocándose en la zona de lesión condral de manera que la capa compacta de la membrana compuesta quede orientada hacia el líquido sinovial, y la capa porosa, que contiene la mayor parte de las MSCs, quede orientada hacia el tejido lesionado.

Como se muestra en el ejemplo 3 y en la figura 9 de la presente descripción, los inventores demuestran que la composición farmacéutica de la presente invención implantada en una lesión osteocondral, es capaz de regenerar el tejido lesionado, tanto el cartílago como el hueso subcondral, quedando el nuevo tejido perfectamente integrado con el tejido sano y presentando una estructura histológica normal.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un método para la obtención de la composición farmacéutica de la invención que comprende:

- a.- obtener una muestra aislada de médula ósea de un sujeto,
- b.- cultivar las células madre mesenquimales de la médula ósea de (a),
- c.- introducir las células de cultivadas en (b) en una membrana compuesta mediante vacío.

Las muestras de médula ósea (MO) se aíslan mediante una punción y extracción de una pequeña cantidad de sangre del hueso, lo que recibe el nombre de aspirado de MO, o de un pequeño cilindro de hueso, lo que recibe el nombre de biopsia de MO. Las aspiraciones suelen realizarse en el esternón o en la cresta ilíaca posterior, mientras que las biopsias suelen realizarse en la cresta ilíaca anterior o posterior.

El cultivo de las MSCs puede realizarse como se describe en el ejemplo 1 de la presente descripción. La introducción de las MSCs en la membrana puede realizarse como describe Solchaga LA y col. Tissue Eng. 2006 12(7): 1851-1863.

En una lesión condral u osteocondral, la membrana compuesta puede ser colocada con la capa compacta hacia el líquido sinovial y la capa porosa hacia el tejido lesionado. De esta forma, la capa más compacta y tupida, que apenas alberga MSCs, impide que éstas salgan de la membrana pero permite que estén comunicadas con dicho líquido sinovial, ya que la capa compacta no bloquea el intercambio de sustancias. Las MSCs situadas en la capa porosa quedan orientadas hacia la lesión y, al regenerar nuevo tejido de cartílago y/o hueso, pueden incorporarse al tejido no lesionado para que el nuevo tejido quede perfectamente integrado.

En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, la membrana compuesta del paso (c) está recubierta con una composición que favorece la adhesión celular.

En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, la membrana compuesta del paso (c) está recubierta con una molécula de la matriz extracelular (MEC). Preferiblemente, la molécula de la MEC es fibronectina o laminina. Más preferiblemente, la molécula de la MEC es la fibronectina.

La MEC es el medio extracelular o intersticial de un tejido. Su naturaleza es compleja y su composición es distinta en cada tipo de tejido, aunque en animales está compuesta mayoritariamente por glicoproteínas y glicosaminoglicanos. Sus funciones principales son la resistencia mecánica y el soporte nutritivo.

Una realización del segundo aspecto de la invención es el uso de una membrana compuesta con una capa compacta y otra capa porosa, de colágeno I de 3 mm de ancho por 3 mm de largo donde los poros de la capa porosa tienen un volumen de 6 millones de μm^3 y donde se introducen 5,4 millones de MSCs obtenidas a partir de un cultivo de MO de un aspirado de cresta ilíaca de un individuo, para el tratamiento de una lesión osteocondral en dicho individuo.

Una realización del segundo aspecto de la invención es el uso de una membrana compuesta con una capa compacta y otra porosa, de colágeno II de 4 mm de ancho por 6 mm de largo, recubierta con laminina, donde se introducen por vacío 4,8 millones de MSCs de MO, para la elaboración de un medicamento.

Una realización del segundo aspecto de la invención es el uso de una membrana bifásica con una capa compacta y otra porosa, que comprende colágeno I y II de 5 mm de ancho por 10 mm de largo, recubierta con un material fibroso biocompatible, por ejemplo, pero sin limitarse a, fibronectina, donde los poros de la capa porosa donde se introducen por vacío 30 millones de MSCs

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra un cultivo *in vitro* de células madre mesenquimales (MSCs) adultas en pase de cultivo 0 (p0) mostrando su aspecto fibroblástico característico, tras 7 días de su aislamiento a partir de un aspirado de médula ósea procedente de la cresta ilíaca del conejo. Imagen obtenida por microscopía óptica de inversión.

Figura 2. Muestra un cultivo *in vitro* confluyente de células madre mesenquimales (MSCs) adultas en pase de cultivo 1 (p1), tras 12 días de su aislamiento a partir de un aspirado de médula ósea procedente de la cresta ilíaca del conejo. Imagen obtenida por microscopía óptica de inversión.

Figura 3. Muestra un cultivo *in vitro* de células madre mesenquimales (MSCs) adultas en pase de cultivo 1 (p1), prediferenciadas hacia el linaje cartilaginoso en presencia de un medio de cultivo condroinductor durante 12 días. Imagen obtenida por microscopía óptica de inversión.

Figura 4. Muestra la membrana compuesta y las células madre mesenquimales (MSCs) en ella. (a) Cara donde las fibras colagénicas se distribuyen de forma más laxa, que se coloca hacia la lesión. (b) Cara más compacta que se coloca hacia el espacio sinovial. (c) Muestra el número y la distribución de las MSCs sobre la cara laxa. (d) Muestra el número y la distribución de las MSCs sobre la cara compacta. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

Figura 5. Muestra el cóndilo femoral de la rodilla del conejo donde se ha practicado un defecto osteocondral completo (3x3 mm) en la zona de máxima carga.

Figura 6. Representa el defecto osteocondral en el cóndilo femoral de la rodilla del conejo en el momento de la colocación del implante, tiempo 0 (t0). Las flechas indican la membrana con las células. (a) Muestra el tamaño del implante. (b) Muestra la introducción del implante en el interior de la lesión.

Figura 7. Muestra el resultado de la lesión osteocondral sin tratar tras 1 y 6 meses, donde puede observarse que el defecto permanece sin regenerar, al tratarse de una herida que no regenera por sí misma. (a) Muestra una lesión en el cóndilo femoral de la rodilla de conejo 1 mes después de la cirugía. (b) Muestra una lesión en el cóndilo femoral de la rodilla de conejo 6 meses después de la cirugía. (c) Muestra el resultado histológico de la zona de la lesión 1 mes después de la cirugía. (d) Muestra el resultado histológico de la zona de la lesión 6 meses después de la cirugía. En (c) y (d) se observa únicamente formación de tejido fibroso y la completa ausencia de cualquier vestigio de matriz cartilaginosa.

Figura 8. Muestra el resultado de la lesión osteocondral tratada con MSCs autólogas prediferenciadas *in vitro* hacia el linaje condrogénico tras 6 meses, donde puede observarse que el defecto está recubierto por un tejido de color blanquecino y que los bordes del tejido formado no están soldados con el cartílago sano circundante. (a) Muestra una lesión osteocondral en el cóndilo femoral de la rodilla del conejo 6 meses después de la cirugía. (b) Muestra el resultado histológico donde se observa la formación de un fibrocartílago con una pobre formación de matriz cartilaginosa, a la vez que se confirma que los bordes de la lesión no están soldados con el cartílago sano lateral (más oscuro, en el lateral izquierdo).

Figura 9. Muestra el resultado de una lesión osteocondral en el cóndilo femoral de la rodilla del conejo, tratada con MSCs autólogas sin prediferenciar *in vitro* (pase de cultivo p1), 6 meses después de la cirugía. (a) Se observa que la lesión presenta un aspecto brillante, aparece completamente cubierta de tejido integrado en los bordes del cartílago sano circundante. (b) Detalle de la zona de la lesión. (c) Muestra los resultados histológicos donde se observa la completa regeneración del tejido osteocondral, con una matriz cartilaginosa hialina típica, de grosor normal, así como una total remodelación del hueso subcondral subyacente, que alcanza la altura natural hasta el contacto con el frente cartilaginoso inferior.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del implante que comprende MSCs en una membrana compuesta para la regeneración de las lesiones osteocondrales.

Ejemplo 1

Procesamiento in vitro: obtención y preparación de las células

Los experimentos se realizaron utilizando 40 conejos de la variedad New Zealand, de unos 3 kg de peso, de acuerdo a los procedimientos del Comité Ético de la Universidad de Málaga sobre el trato de animales de experimentación.

La obtención de los tejidos, así como las operaciones de trasplante, se llevaron a cabo bajo analgesia o anestesia con buprenorfina 0,05 mg/kg, ketamina 25-35 mg/kg y xilacina 5-10 mg/kg, administrada intramuscularmente.

Se lesionaron las dos rodillas, por lo que, en el caso de los implantes una rodilla sirvió como control de la otra.

La médula ósea (MO) se obtuvo por punción y aspirado en la cresta ilíaca utilizando un catéter flexible y aguja de 18G. Se obtuvo en torno a 4 ml de MO en presencia de 1 ml de heparina. Las células obtenidas se lavaron 2 veces en medio de cultivo no suplementado, se centrifugaron y se resuspendieron con medio de cultivo completo (DMEM, de "Dulbecco's Modified Eagle Medium", 10% FCS, de "Fetal Calf Serum", 1,5% L-glutamina, 1% Penicilina/Estreptomicina y 0,5% anfotericina B) y se cultivaron en frascos de 75 cm² (Nunc Int., EEUU) a 37°C y 5% CO₂.

A los 4 días se realizó el primer cambio de medio para eliminar las células no adheridas y, a partir de aquí, los cambios de medio se realizaron cada 3 días hasta un total de 14 días a pase de cultivo 0 (p0). A continuación, las células se tripsinizaron, contaron y sembraron a pase 1 (p1) de cultivo en placas de cultivo de 60 cm², a una densidad de 10, 50 y 100 células/cm². En este momento, se guardaron varios viales congelados para posterior estudio, utilizando DMSO al 5% en medio completo y una densidad de 1x10⁶ células/ml.

Tras otros 7 y 14 días de cultivo, se recogieron las células pocillos de cada densidad celular y se contaron en un hemocitómetro, a fin de calcular la tasa de crecimiento. Se realizó una citometría de flujo rutinaria para certificar el perfil fenotípico de las células obtenidas, constatando que las MSCs de MO aisladas son positivas para CD13, CD29, CD44, CD71, CD90, CD105, CD271 y Stro1; y negativas para CD34 y CD45.

Ejemplo 2

Comprobación del potencial condrogénico de las MSCs de MO

5 Para inducir la diferenciación condrogénica se llevaron 250.000 células en pase 1 (p1) de cultivo a un tubo de propileno de 15 ml (Becton Dickinson) y se centrifugaron a 450 g durante 10 minutos. Los precipitados celulares se cultivaron durante 12 días en medio condroinductor, compuesto de DMEM con 10 ng/ml TGF-beta1 (R&D Systems), 100 nM dexametasona, 50 microgramos/ml ácido ascórbico, 100 microgramos/ml piruvato sódico, 40 microgramos/ml prolina (Sigma), e ITS-plus (6,25 microgramos/ml insulina bovina, 6,25 microgramos/ml transferrina, 10 6,25 microgramos/ml ácido selénico, 5,35 microgramos/ml ácido linoleico, 1,25 microgramos/ml albúmina de suero bovino; Collaborative Biomedical Products).

Con el fin de evaluar la diferenciación condrogénica, los precipitados celulares se procesaron para el análisis microscópico en parafina para histología convencional. Las secciones en parafina se procesaron para la tinción con azul alciano, que marca específicamente proteoglicanos de la matriz cartilaginosa, y para la inmunohistoquímica frente a los colágenos I, II y X. El tinte para colágeno I fue positivo en el hueso regenerado, mientras que en el cartílago nuevo se encontró tinte positivo de los colágenos II y X.

Además, se analizó la expresión génica de los colágenos I, II y X, de Sox9 y de agrecano mediante RT-PCR.

Ejemplo 3

Lesión osteocondral e implante

25 Tras la analgesia o anestesia de los animales, según se indicó anteriormente, realizamos el rasurado de las dos rodillas y la desinfección del campo quirúrgico.

Abordamos la articulación por incisión parapatelar medial y rechazo de la rótula hacia el exterior, para luego provocar una lesión osteocondral en el cóndilo femoral en la zona de carga, con un trocar de 3x3 mm. Las lesiones de este tamaño excluyen la reparación espontánea. Se lavó el defecto con suero fisiológico y en la rodilla derecha situación experimental se implantó la membrana colagénica, previamente recubierta con fibronectina, adsorbida por vacío con 2×10^6 MSCs de MO obtenidas anteriormente.

35 El transportador celular tiene unas dimensiones de 2 x 2 x 1 mm y está formado por fibras de colágeno I y III dispuestas de tal forma que, en la cara superior (cara que se coloca hacia el espacio sinovial), aparecen entrelazadas de forma más tupida y, en la inferior, que se coloca hacia las paredes y suelo de la lesión osteocondral, las fibras aparecen más laxas, dejando un espacio medio de 250 μ m, donde el 83% de las células adsorbidas anidan. Este biomaterial es comercial (Chondro-Gide®, Geistlich Pharma, Suiza) y está siendo utilizado ampliamente en cirugía clínica de rodilla. El implante se realiza sin ningún tipo de pegamento o sutura, eliminando así cualquier tipo de interferencia en el estudio, reduciendo la morbilidad y el tiempo de intervención.

La rodilla control se implanta con la membrana sin células y se interviene de la misma forma. Finalmente, se suturan ambas heridas y se suministra al animal analgésico y antibiótico por vía subcutánea durante 5 días en post-operatorio. Los conejos se sacrificaron por sobredosis de pentobarbital sódico a las 4, 12, y 24 semanas de la cirugía, a fin de evaluar los resultados de la regeneración, mediante un examen macroscópico e histológico de la lesión, siguiendo los parámetros habituales (evaluación de Wakitani).

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende células madre mesenquimales y una membrana compuesta que presenta al menos dos capas con distinta estructura, siendo la capa inferior porosa y la capa superior compacta.
2. Composición según la reivindicación anterior donde el origen de las células madre mesenquimales es la médula ósea.
3. Composición según la reivindicación anterior donde las células madre mesenquimales son positivas para CD13, CD29, CD44, CD71, CD90, CD105, CD271 y Stro1; y negativas para CD34 y CD45.
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde por cada mm² de membrana hay entre 250.000 y 2.000.000 células.
5. Composición según la reivindicación anterior donde por cada mm² de membrana hay entre 400.000 y 1.000.000 células.
6. Composición según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores donde por cada mm² de membrana hay entre 450.000 y 600.000 células.
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la membrana compuesta comprende al menos una capa compacta que comprende poros cuyo diámetro es menor de 35 μ m y una capa porosa que comprende poros cuyo diámetro es de entre 35 y 300 μ m.
8. Composición según la reivindicación anterior donde los poros de la capa porosa tienen entre 4 y 14 millones de μ m³ de volumen medio.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la membrana bifásica comprende colágeno.
10. Composición según la reivindicación anterior donde el colágeno es de tipo I y III.
11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde entre el 70% y el 90% de las células se sitúan en la capa porosa de la membrana.
12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la membrana está recubierta con una molécula de la matriz extracelular.
13. Composición según la reivindicación anterior donde la molécula de la matriz extracelular es fibronectina, laminina o colágeno.
14. Composición según la reivindicación anterior donde la molécula de la matriz extracelular es fibronectina.
15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la membrana imita la forma de una lesión osteocondral y presenta unas dimensiones iguales o mayores a las de la lesión, de forma que la membrana, en posición superpuesta a la lesión, sobresale respecto de dicha lesión en una magnitud menor de 2 mm.
16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde dicha composición es una composición farmacéutica.
17. Composición según la reivindicación anterior que además comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.
18. Composición según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores que además comprende otro principio activo.
19. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la preparación de un medicamento.
20. Uso según la reivindicación anterior para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una lesión de cartílago.
21. Uso de la composición según la reivindicación anterior para la preparación de un medicamento para la regeneración del cartílago.
22. Uso según la reivindicación 19 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una lesión de hueso.

23. Uso de la composición según la reivindicación anterior para la preparación de un medicamento para la regeneración del hueso.

24. Uso según la reivindicación 19 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una lesión osteocondral.

25. Uso según la reivindicación anterior para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la osteoartritis.

26. Método para la obtención de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 que comprende las siguientes etapas:

a) obtener una muestra aislada de médula ósea de un sujeto,

b) cultivar las células madre mesenquimales de la médula ósea obtenidas en la etapa (a),

c) introducir las células cultivadas en la etapa (b) en una membrana compuesta mediante vacío.

27. Método para la obtención de la composición según la reivindicación anterior donde la membrana compuesta de la etapa (c) está recubierta con una molécula de la matriz extracelular.

28. Método para la obtención de la composición según la reivindicación anterior donde la molécula de la matriz extracelular es fibronectina, laminina o colágeno.

29. Método para la obtención de la composición según la reivindicación anterior donde la molécula de la matriz extracelular es fibronectina.

Fig. 1

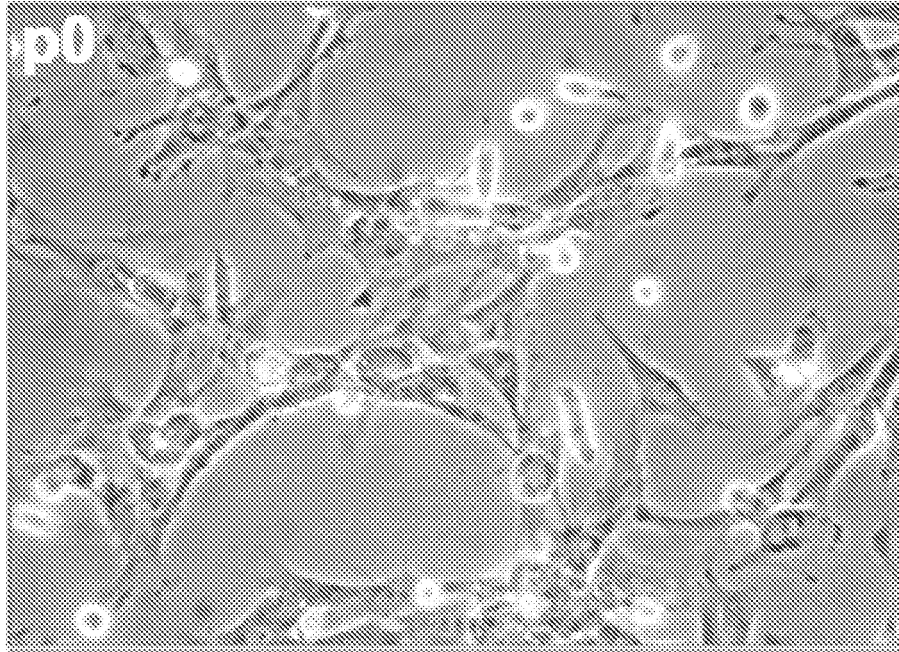


Fig. 2

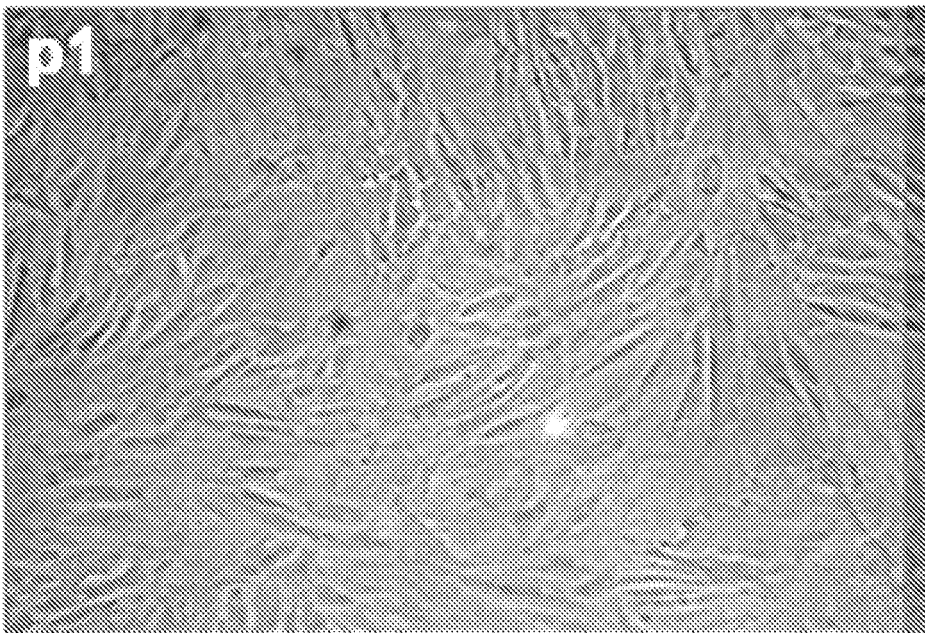


Fig. 3

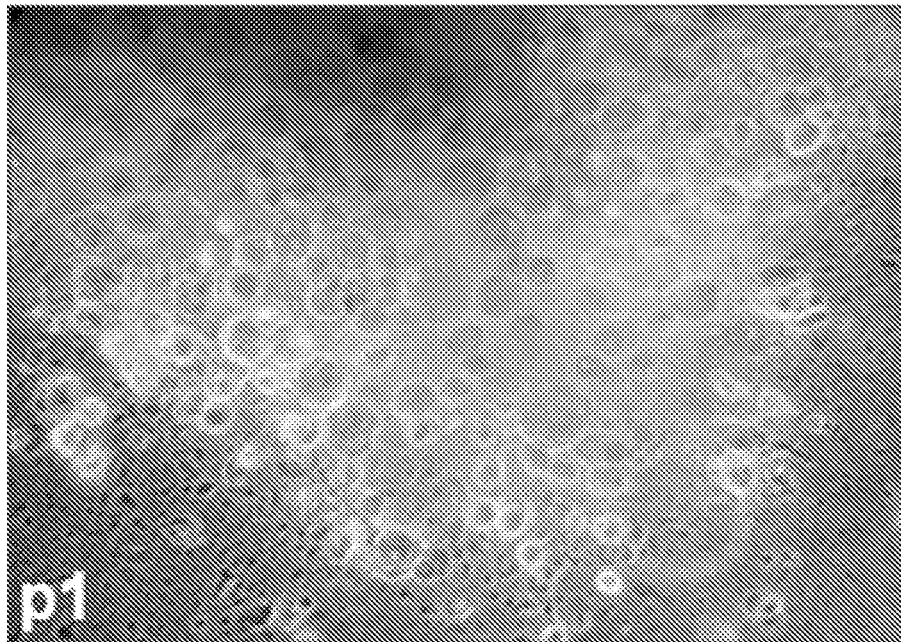


Fig. 4

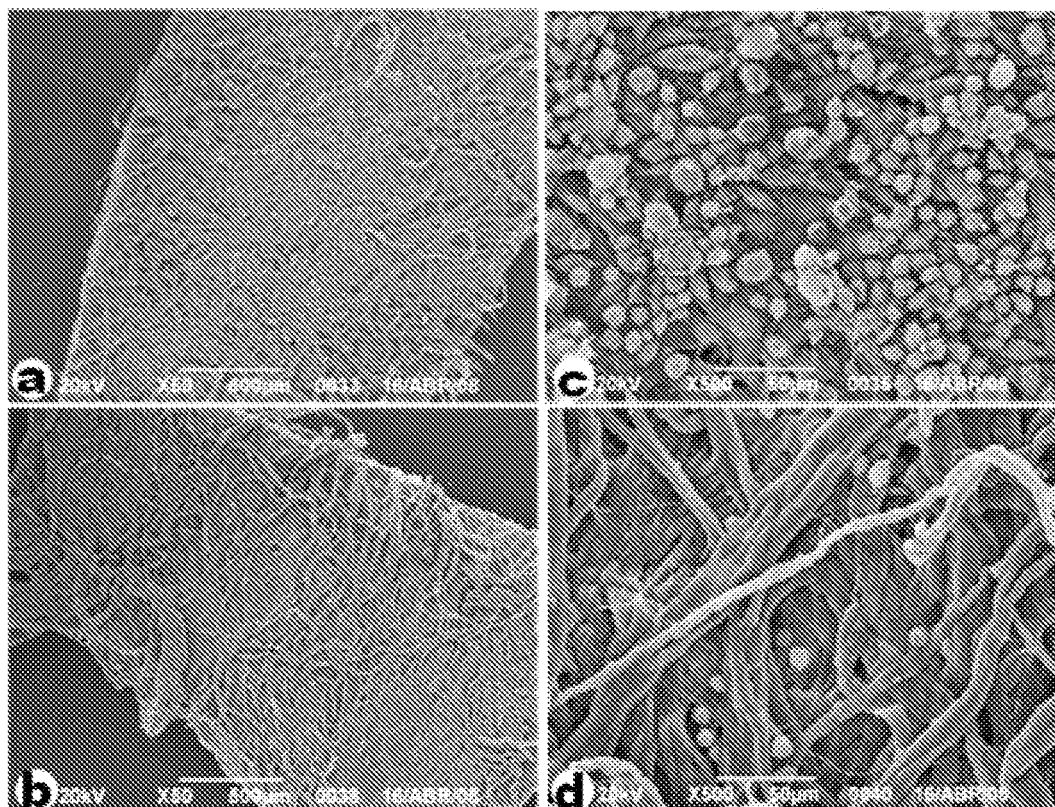


Fig. 5



Fig. 6

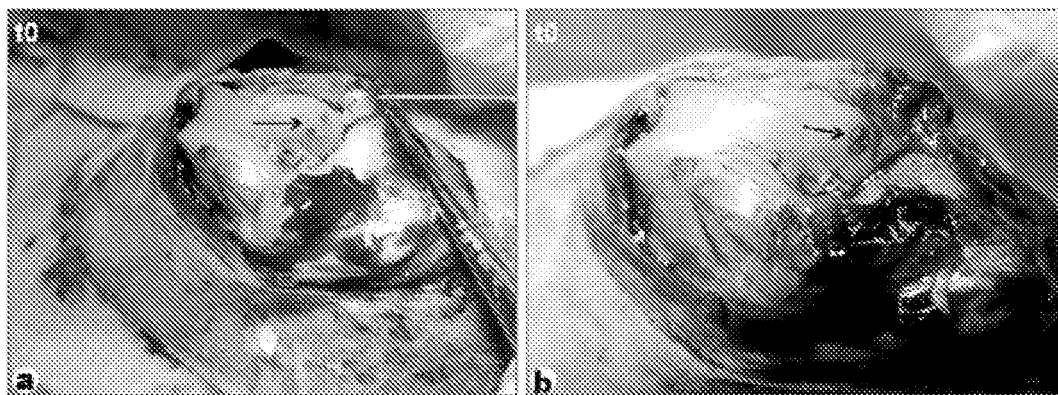


Fig. 7

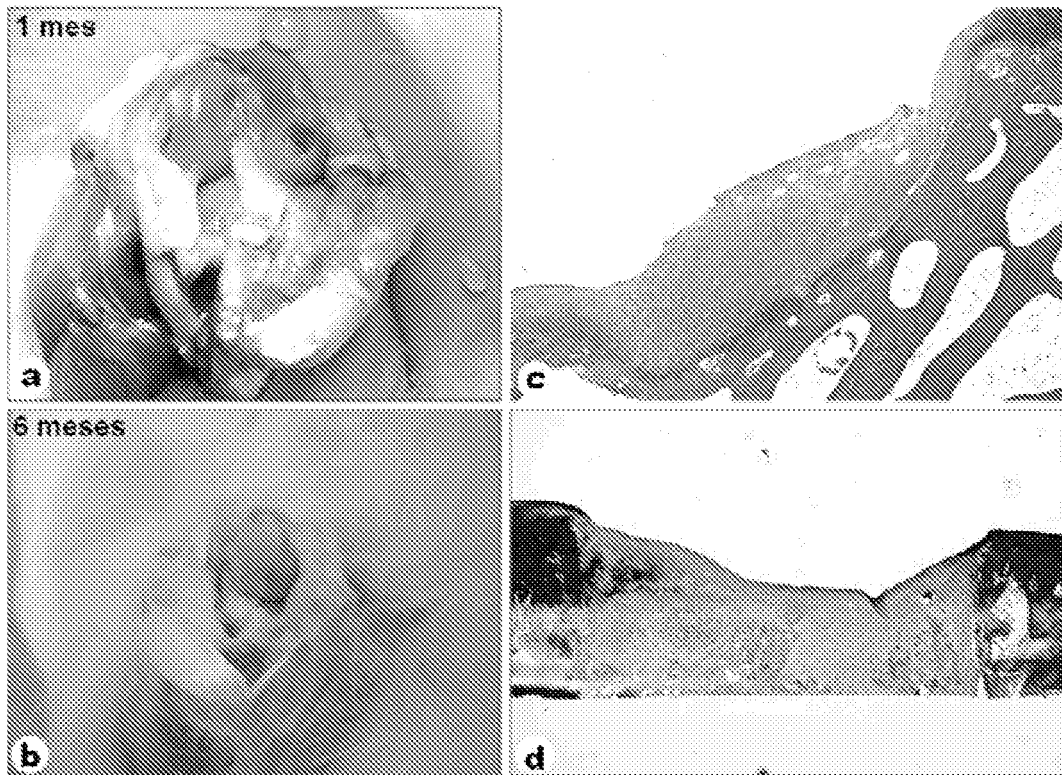
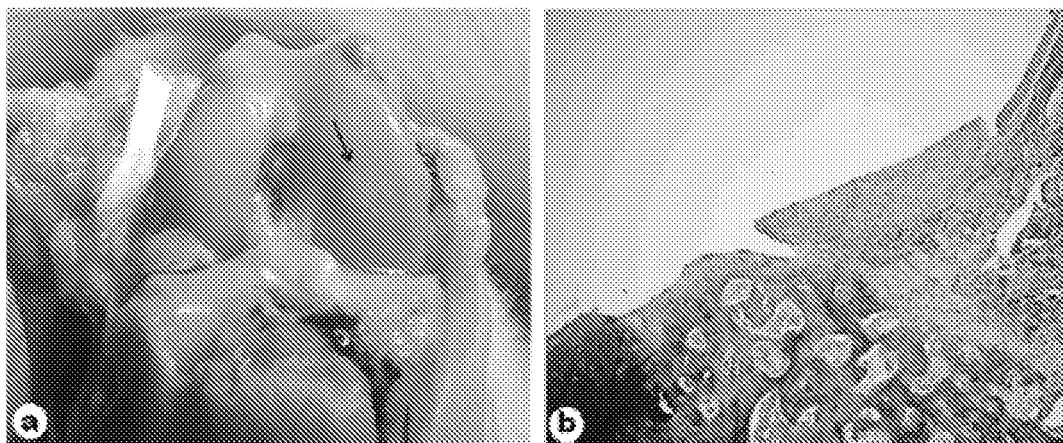


Fig. 8



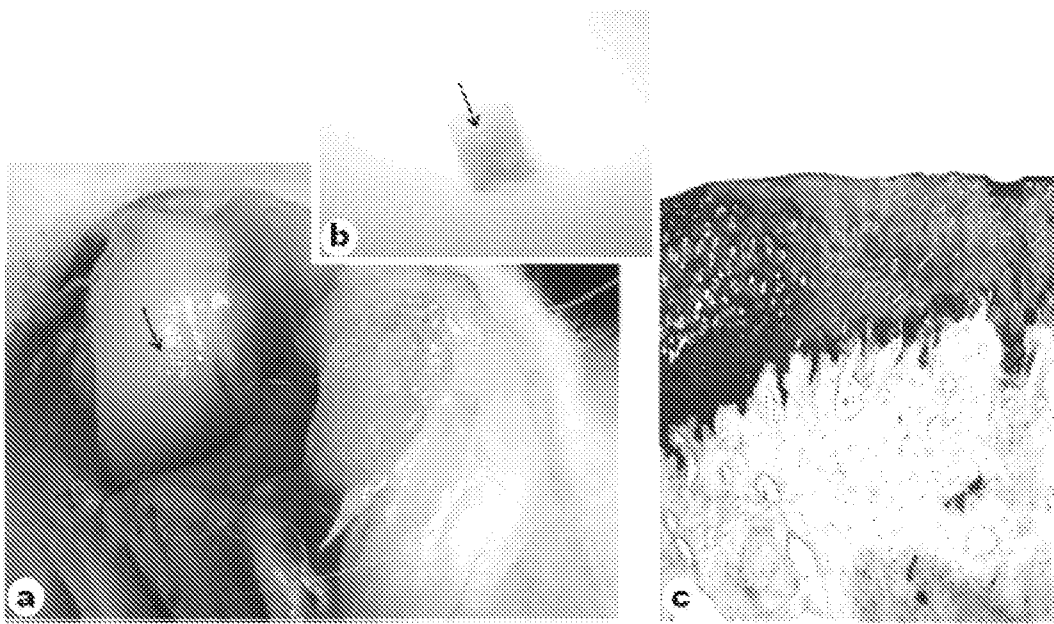


Fig. 9



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031016

②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.06.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2007031388 A1 (GEISTLICH, P.) 08/02/2007, resumen; párrafos [0004]; [0013]; [0015]; [0019]; [0021]; [0034]; [0051]; [0052]; reivindicaciones 1-3.	1-11, 16-25
Y		12-15, 26-29
Y	US 2009130754 A1 (CHUNG H-M, ET AL.) 21/05/2009, resumen; párrafos [0019]; [0025]; [0029]; ejemplo 2; reivindicación 5.	12-15
Y	US 6080194 A (PACHENCE J M. ET AL) 27/06/2000, ejemplo 1, reivindicación 5.	26-29
X	US 2008260801 A1 (AHLERS M, ET AL.) 23/10/2008, resumen; párrafos [0010]; [0016]; [0019]; [0020]; [0029]; [0059]; [0064]; [0084]; [0085]; [0119]; [0121]; [0158]; ejemplo 1, reivindicaciones 1-2.	1-9, 11, 16-25
Y		12-15
Y	WO 2006104901 A2 (UNIV FLORIDA ET AL.) 05/10/2006, resumen; página 1, líneas 21 - 27; página 5, líneas 24 - 31; página 8, líneas 1 - 18; página 9, líneas 14 - 18; reivindicaciones 1, 4, 7, 20, 25.	12-15
X	US 2008107710 A1 (GEISTLICH P, ET AL) 08-05-2008, resumen; párrafos [0029]; [0030]; [0033]; [0044]; [0047]; reivindicaciones 1, 3.	1-6, 9-11, 16-21

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.04.2012

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61L27/24 (2006.01)

A61L27/38 (2006.01)

C12N5/0775 (2010.01)

A61L27/56 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61L, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, XPESP2.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.04.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 3-8, 11-18, 24, 25, 27-29	SI
	Reivindicaciones 1, 2, 9, 10, 19-23, 26	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-29	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2007031388 A1 (GEISTLICH, P.)	08.02.2007
D02	US 2009130754 A1 (CHUNG H-M, et al.)	21.05.2009
D03	US 6080194 A (PACHENCE J M. et al)	27.06.2000
D04	US 2008260801 A1 (AHLERS M, et al.)	23.10.2008
D05	WO 2006104901 A2 (UNIV FLORIDA et al.)	05.10.2006
D06	US 2008107710 A1 (GEISTLICH P, et al)	08.05.2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente describe y reivindica una composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimales de médula ósea en una membrana compuesta, formada por colágeno tipo I y III, y que presenta al menos una capa inferior porosa que contiene la mayoría de las células, y una capa superior compacta. Reivindica también el uso de la composición para preparar medicamentos para el tratamiento de lesiones óseas y cartilaginosas, y el método de preparación de la composición, basado en introducir las células en la membrana mediante vacío.

Se han encontrado varios documentos en el estado de la técnica que describen membranas compuestas tal y como aparecen en las reivindicaciones 1, 2, 9 y 10 de la solicitud, usos como los reivindicados en las reivindicaciones 19 a 23, y el método de obtención de la membrana según la reivindicación 26. Por tanto, las reivindicaciones 1, 2, 9, 10, 19-23 y 26 de la solicitud no son nuevas según el artículo 6 de la Ley 11/1986 de Patentes.

Además, hay otros documentos del estado de la técnica que, solos o en combinación con otros, hacen evidentes todas las demás características de la composición reivindicada en la solicitud, sus usos, y el método de obtención de la membrana. Por tanto, estos documentos afectan la actividad inventiva de las reivindicaciones 1-29 de la solicitud, según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

El documento D01 se considera el más cercano del estado de la técnica. En él se describe una membrana formada por una capa lisa y otra fibrosa que contienen una matriz de colágeno y células madre de médula ósea. El colágeno puede ser colágeno I, III, o mezcla de ambos. Se describe también el uso del producto de la invención para regeneración de hueso y cartílago. Este mismo tipo de membranas de D01 es el empleado en la composición de las reivindicaciones 1, 2, 9 y 10, y los usos médicos son los mismos que los de las reivindicaciones 19 a 23, por lo que estas reivindicaciones no son nuevas a la luz de lo divulgado en el documento D01.

Además, se considera que los marcadores de membrana de las células madre mesenquimales de la reivindicación 3 son sobradamente conocidos en el campo técnico de la solicitud, por lo que resultarían evidentes para el experto en la materia. No se considera una característica técnica esencial el empleo del número de células por mm² de membrana de las reivindicaciones 4 a 6, ni el tamaño exacto de los poros en las capas de la membrana (reivindicaciones 7 y 8) o el porcentaje de células que se sitúan en la capa porosa (reivindicación 11). También resulta obvio extender el uso del medicamento de la invención a lesiones osteocondrales, concretamente osteoartritis (reivindicaciones 16-18, 24 y 25). Todas estas reivindicaciones, por tanto, no cumplen el requisito de actividad inventiva.

En resumen, el documento D01 por sí solo, afecta la novedad de las reivindicaciones 1, 2, 9, 10 y 19-23, y la actividad inventiva de las reivindicaciones 3-8, 11, 16-18, 24 y 25 de la presente solicitud.

Aunque en D01 se menciona que la membrana puede contener otras moléculas de matriz extracelular, como fibronectina o laminina, no describe que se utilicen para recubrir la membrana. Esta información se encuentra divulgada en el documento D02. En este documento se describe un método para cultivar células madre en una membrana porosa, que se recubre de diferentes materiales (fibronectina, colágeno, laminina y Matrigel) para favorecer el crecimiento celular (ver párrafo [0029], ejemplo 2 y reivindicación 5 de D02). Se considera que el experto en la materia no tendría que realizar un esfuerzo inventivo para utilizar los materiales descritos en D02 en el recubrimiento de la membrana de la presente solicitud, por lo que la combinación de los documentos D01 y D02 afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 12 a 15 de la misma.

El método de preparación de la membrana mediante inclusión de las células con vacío aparece descrito en el ejemplo 1 y la reivindicación 5 del documento D03. Este documento divulga una membrana porosa de colágeno y su uso para reparar defectos de tejido cartilaginoso, y la evidente combinación de los documentos D01 y D03 afecta la actividad inventiva de la reivindicaciones 26 a 29 de la presente solicitud.

El documento D04 describe una membrana porosa formada por dos capas de colágeno tipo I, en la que se siembran células mesenquimales para utilizarla en tratamientos de regeneración de hueso y cartílago. Por tanto, el documento D03 afecta la novedad de las reivindicaciones 1, 9 y 19-23 de la solicitud. Aunque el hecho concreto de obtener las células mesenquimales de médula ósea no se menciona en el documento D04, resulta evidente para el experto en la materia, así como conocer los marcadores celulares de estas células, o emplear la composición para el tratamiento de lesiones osteocondrales (osteoartritis). Por tanto, D03 afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 2 y 3, y, según el mismo argumento detallado anteriormente para D01, también la de las reivindicaciones 4-8, 11, 16-18, 24 y 25 de la presente solicitud.

El documento D05 describe las ventajas de recubrir con materiales de matriz extracelular las matrices utilizadas en ingeniería tisular (scaffolds), que contienen las células madre. Entre estos materiales se incluyen colágeno, fibronectina y laminina. Puesto que D05 pertenece al mismo campo técnico que D04, ambos documentos podrían combinarse de una forma obvia y, de este modo, afectarían la actividad inventiva de las reivindicaciones 12 a 15 de la solicitud.

El documento D06 divulga la utilización de una membrana bifásica de colágeno del tipo I y III, con células madre mesenquimales de médula ósea, en tratamiento de lesiones cartilaginosas. Este documento afecta la novedad de las reivindicaciones 1, 2, 9, 10 y 19-21, y la actividad inventiva de las reivindicaciones 3-6, 11 y 16-18 (ver más arriba los argumentos presentados para los documentos D01 y D04).