

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 329**

21 Número de solicitud: 201331743

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 31/465 (2006.01)
A61K 31/203 (2006.01)
A61K 35/44 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

29.11.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

29.06.2015

Fecha de la concesión:

05.05.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

12.05.2016

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070879

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (100.0%)
IOBA. Paseo de Belén, 17
47011 Valladolid (Valladolid) ES

72 Inventor/es:

SINGH, Amar Kumar;
SRIVASTAVA, Girish Kumar;
FERNÁNDEZ BUENO, Iván;
GAYOSO RODRÍGUEZ, Manuel José y
PASTOR JIMENO, José Carlos

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES RETINIANAS DEGENERATIVAS**

57 Resumen:

Composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de enfermedades retinianas degenerativas.

La presente invención se refiere a una composición que comprende células madre mesenquimales (MSCs), preferiblemente procedentes de tejido adiposo (AD-MSCs), combinadas con péptido intestinal vasoactivo (VIP) y nicotinamida (NIC), y más preferiblemente combinadas además con ácido retinoico (ATRA) y con sobrenadante de un cultivo de células del epitelio pigmentario de la retina (EPR). También se refiere al uso de esta composición para el tratamiento y/o prevención de daños retinianos, preferiblemente de enfermedades degenerativas de la retina, por ejemplo, aunque sin limitarnos, enfermedades degenerativas del EPR, de los fotorreceptores y de la neurorretina.

ES 2 539 329 B1

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES RETINIANAS DEGENERATIVAS

DESCRIPCIÓN

5

La presente invención se encuadra en el campo de la terapia celular para la regeneración de tejidos oculares, concretamente dentro de las composiciones farmacéuticas que comprenden células madre mesenquimales útiles para la regeneración tisular de la retina dañada, preferiblemente del epitelio pigmentario de la retina (EPR), de los fotorreceptores o de la neuroretina afectados por una enfermedad retiniana degenerativa.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

15

La retina es un tejido con una gran complejidad, constituido por varias capas claramente diferenciadas: el epitelio pigmentario de la retina (EPR), los fotorreceptores (PRs), las membranas limitantes interna y externa (ILM y OLM), las capas nucleares interna y externa (INL y ONL), las capas plexiformes interna y externa (IPL y OPL), la capa de las células ganglionares (GCL) y la capa de fibras del nervio óptico (NFL). La integridad de estas capas es fundamental para el funcionamiento normal de la retina. Así, cualquier alteración estructural o funcional en las mismas origina una enfermedad retiniana. Las degeneraciones de la retina son responsables de alteraciones en la estructura y función retiniana. Dichas degeneraciones finalmente inducen enfermedades retinianas que resultan en una disfunción visual y/o en la pérdida de visión. Existen un gran número de enfermedades oculares relacionadas con la degeneración retiniana que no poseen actualmente un tratamiento adecuado, como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), la retinitis pigmentosa (RP), la enfermedad de Stargardt y la neuropatía óptica isquémica anterior aguda no arterítica (NOIANA).

20

25

30

La DMAE es la principal causa de ceguera en los países industrializados (Europa y Norteamérica) entre las personas mayores de 65 años. Esta patología tiene dos formas, la seca y la húmeda. La forma seca de la DMAE constituye entre el 60 y el 90% de los casos, mientras que la forma húmeda (también denominada CNV, del inglés *choroidal neovascularization*) representa entre el 10 y el 40% de los casos totales de DMAE. La DMAE seca engloba un mercado de 25-30 mil millones de

35

dólares entre los Estados Unidos y Europa y tiene un impacto anual negativo de alrededor de 30 mil millones de dólares en el producto interior bruto de los Estados Unidos. La población denominada "tercera edad" va a aumentar considerablemente en las próximas décadas en los países industrializados, lo que debería alertar a los sistemas sanitarios ya que aumentará la carga económica y social del sistema. Por ello, la DMAE se considera un importante problema de salud pública, que puede originar un efecto devastador respecto a la calidad de vida de los pacientes y que además conllevará importantes consecuencias financieras para la economía del mundo industrializado. Las actuales terapias de la DMAE solo han mostrado pequeños avances, especialmente en la CNV, pero en muchos casos únicamente han conseguido ralentizar el curso de la enfermedad. En el caso de la forma seca de la DMAE no existe ningún tratamiento clínicamente aceptable y/o eficaz a día de hoy.

La RP se origina por una disfunción progresiva de los fotorreceptores, que posteriormente se extiende a otras capas retinianas. La RP tiene una prevalencia de 1 caso por cada 4000 individuos, siendo la población afectada en el mundo de 1,5 millones. Esta patología afecta a pacientes en edad escolar y también laboral. En la actualidad, no existe ningún tratamiento, a pesar de que tiene un gran impacto socio-sanitario en la población afectada.

Además de las dos patologías mencionadas, hay un gran número de enfermedades retinianas provocadas por la degeneración de las diferentes células retinianas, y para la mayoría de ellas no existe un tratamiento adecuado.

El EPR juega un papel extremadamente importante en el desarrollo de una función visual normal, así como en el mantenimiento de la estructura e integridad de la retina. Se considera al EPR como uno de los principales responsables de la patogénesis de variadas patologías retinianas, debido a los cambios estructurales y bioquímicos que suceden a lo largo de la vida en estas células. Todos estos cambios perjudiciales afectan progresivamente a la salud retiniana. Así, la retina neural, principalmente los fotorreceptores, comienzan a degenerar gradualmente y de forma sincronizada con el deterioro funcional del EPR. En este caso, parece lógico que si el EPR dañado pudiera ser reemplazado por EPR sano y nuevo, especialmente en el estado inicial de la patología cuando los fotorreceptores aún funcionan adecuadamente, se podría prevenir o ralentizar su degeneración. Existen algunos ejemplos donde los investigadores han intentado trasplantar EPR y epitelio pigmentario del iris de fuentes

autólogas, homólogas y heterólogas. Sin embargo, en el caso de las células homólogas y heterólogas se produjeron importantes rechazos inmunológicos. Por el contrario, las fuentes autólogas mostraron una adecuada tolerancia inmune, pero no consiguieron una mejora en la función visual, debido a que las células tienen las mismas huellas genéticas y ambientales.

Las tres estructuras que principalmente se ven afectadas en las patologías retinianas son la membrana de Bruch (BM), el EPR y los fotorreceptores. El objetivo de las terapias avanzadas pretende su reconstrucción conjuntamente, mediante ingeniería tisular con componentes tisulares/celulares y no tisulares/celulares, como por ejemplo un substrato que actúe como la membrana basal sobre la que se puedan crecer células de EPR. Se conoce claramente que las células madre tienen la capacidad de regenerarse a sí mismas y de diferenciarse hacia cualquier célula adulta utilizando las condiciones adecuadas. Por ello, las células madre pueden ser una terapia potencial en el reemplazamiento celular, como podrían ser el EPR, los fotorreceptores o incluso la retina al completo. Así, las células madre han originado una enorme esperanza en la regeneración de células retinianas. Existen importantes avances para la obtención de células de EPR frescas y funcionales, incluso de fotorreceptores, a partir de células madre endoteliales (ESCs) y de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs). Se están desarrollando diversos ensayos clínicos para el trasplante de células de EPR derivadas de ESCs en pacientes con enfermedades retinianas degenerativas. En Japón, el Riken Centre for Development Biology ha lanzado un estudio piloto para evaluar la seguridad y factibilidad del trasplante autólogo de capas de células del EPR derivadas de iPSCs en pacientes con DMAE húmeda (Sipp, Douglas and Takahashi, Masayo. *Pilot Clinical Study into iPS Cell Therapy for Eye Disease Starts in Japan*, 30th July, 2013, http://www.riken.jp/en/pr/press/2013/20130730_1/). No obstante, la utilización tanto de las ESCs como de las iPSCs tiene algunas dificultades, debido a problemas de tipo ético y al riesgo de desarrollo de tumores.

Por otro lado, existen diversos factores de crecimiento que juegan un papel importante en el mantenimiento de la salud neuroretiniana, y también del EPR, como PEDF, BDNF, VEGF, CNTF, HGF, NGF, LIF, etc. El EPR suministra los nutrientes, procedentes de la circulación coroidea, a las capas más externas de la retina neural, recicla los segmentos externos de los fotorreceptores y secreta diferentes factores de crecimiento y neurotróficos, como el PEDF (del inglés, *pigment epithelium-derived factor*), el BDNF (del inglés, *brain-derived neurotrophic factor*) y el VEGF (del inglés,

vascular endothelial growth factor). Estos factores son imprescindibles para el mantenimiento de la homeostasis neuroretiniana. Algunos ensayos clínicos recientes (Kauper K, *et al. Two-year intraocular delivery of ciliary neurotrophic factor by encapsulated cell technology implants in patients with chronic retinal degenerative diseases*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 Nov 1; 53(12):7484-91; Zhang K, *et al. Ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for treatment of geographic atrophy in age-related macular degeneration*. Proc Natl Acad Sci. USA. 2011 Apr 12; 108(15):6241-5; Sieving PA, *et al. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants*. Proc Natl Acad Sci. USA. 2006 Mar 7; 103(10):3896-901; Thanos CG, *et al. Sustained secretion of ciliary neurotrophic factor to the vitreous, using the encapsulated cell therapy-based NT-501 intraocular device*. Tissue Eng. 2004 Nov-Dec; 10(11-12):1617-22) han estudiado las propiedades paracrinas de células de EPR modificadas genéticamente (NTC-201 humanas derivadas de la línea celular ARPE19) encapsuladas en un implante intraocular, en enfermedades retinianas degenerativas (como la RP y la atrofia geográfica o AG).

No obstante, continua siendo una necesidad el desarrollo de terapias seguras y eficaces para el tratamiento y/o prevención de enfermedades degenerativas retinianas que permitan mejorar la calidad de vida de los pacientes afectados.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una composición que comprende células madre mesenquimales (MSCs), preferiblemente procedentes de tejido adiposo (AD-MSCs), combinadas con péptido intestinal vasoactivo (VIP) y nicotinamida (NIC), y más preferiblemente combinadas además con ácido retinoico (ATRA) y con el sobrenadante de un cultivo de células del EPR. Esta composición es de utilidad para el tratamiento y/o prevención del daño tisular provocado en la retina, preferiblemente como consecuencia de una enfermedad degenerativa retiniana, incluyendo degeneración del EPR, de los fotorreceptores y de la neuroretina.

Así, la composición descrita en la presente invención puede ser utilizada para el mantenimiento de la retina si se decide trasplantarla al tejido dañado; o puede ser empleada en la elaboración de medicamentos, preferiblemente de terapia celular,

destinados al tratamiento y/o prevención de enfermedades degenerativas retinianas, incluyendo aunque sin limitarnos a enfermedades inflamatorias o genéticas.

5 Las células madre mesenquimales, preferiblemente derivadas de tejido adiposo, en combinación con las biomoléculas VIP y NIC, y preferiblemente además con ATRA y con factores secretados por el EPR, protegen frente a la degeneración del EPR, de los fotorreceptores y de la neurorretina, lo que puede ser utilizado en el tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina en, por ejemplo, aunque sin limitarnos, humanos. Como muestran los ejemplos de la presente invención, las AD-MSCs, los
10 factores secretados por el EPR o las biomoléculas VIP, NIC y ATRA empleadas individualmente muestran una efectividad inferior a la observada cuando se utilizan en las combinaciones aquí propuestas.

15 Por todo ello, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, de ahora en adelante “composición de la invención”, que comprende células madre mesenquimales, péptido intestinal vasoactivo y nicotinamida.

20 Las “células madre mesenquimales”, “células madre estromales” o “MSC”, son células multipotentes, con morfología fibroblastoide, originadas a partir de la capa germinal mesodermal, con la capacidad de diferenciarse en diversos tipos de células. Preferiblemente, las MSCs expresan al menos uno de los antígenos específicos de superficie CD105, CD73 y CD90, y no expresan los antígenos CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA de clase II. Estas MSCs son capaces de diferenciarse, por ejemplo, aunque sin limitarnos, a osteoblastos, adipocitos y condroblastos bajo
25 condiciones estándares de diferenciación *in vitro*. Las MSCs pueden ser aisladas de diversos tejidos, incluyendo, aunque sin limitarnos, la médula ósea (BM), tejido adiposo (lipoaspirados) (AD), hígado, bazo, testículos, sangre menstrual, fluido amniótico, páncreas, periostio, membrana sinovial, músculo esquelético, dermis, pericitos, hueso trabecular, cordón umbilical, pulmón, pulpa dental o sangre periférica.
30 Concretamente el tejido adiposo presenta diferentes ventajas respecto a otras fuentes, como por ejemplo la médula ósea, debido a la facilidad de obtención de las células madre y a la disponibilidad de un gran número de células, sin que existan grandes diferencias en cuanto a las propiedades de las BM-MSCs y las AD-MSCs. Por ello, en una realización preferida de la composición de la invención, las MSCs proceden de
35 tejido adiposo.

La utilización tanto de las células madre endoteliales (ESCs) como de las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) en terapia celular presenta algunas dificultades, debido a problemas de tipo ético y al riesgo de desarrollo de tumores. Sin embargo, en el caso de utilizar una fuente de células madre adultas, como las células madre mesenquimales, estos problemas se minimizan significativamente. Además, la utilidad de las MSCs en el tratamiento/prevenición de enfermedades degenerativas retinianas no se debe únicamente a su capacidad de diferenciación hacia células del EPR o fotorreceptores, sino además al efecto neurotrófico, inmunomodulador o antiinflamatorio de los factores secretados por estas células.

Además, la utilización de MSCs podría suponer una ventaja en comparación con las células de EPR genéticamente modificadas que también han sido empleadas anteriormente en terapia celular para la regeneración tisular de la retina en degeneración.

Por otro lado, el "péptido intestinal vasoactivo" o "VIP" (del inglés, *vasoactive intestinal peptide*) es un neuropéptido que pertenece a la hormona de crecimiento glucagón-VIP, de 28 aminoácidos (His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn, SEQ ID NO: 1) y con la fórmula empírica $C_{147}H_{238}N_{44}O_{42}S$ (peso molecular 3325,9). Pertenece a la superfamilia de las secretinas, que se encuentran en la retina (células amacrinas) y coroides en el globo ocular, así como en la corteza cerebral, la pituitaria, las glándulas adrenales, las terminaciones nerviosas del sistema respiratorio, el tracto gastrointestinal y el sistema reproductor. Este péptido promueve el crecimiento y la diferenciación de múltiples tipos celulares en cultivos tisulares. El efecto del VIP sobre la proliferación, la diferenciación y la neuroprotección es dosis dependiente. Su efecto neuroprotector *in vivo* está mediado por el BDNF. VIP es un fuerte secretagogo que promueve la liberación de factores derivados de la astrogía (quemoquinas), como IL-1 (del inglés, *interleukin 1*), IL-6, NT-3 (del inglés, *neurotrophin-3*), PN-1 (del inglés, *protease nexin-1*), RANTES (del inglés, *regulated upon activation normal T cell expressed and presumably secreted*), MIP-1 (del inglés, *macrophage inflammatory protein-1*), ADNF (del inglés, *activity dependent neuroprotective factor*) y ADNP (del inglés, *activity dependent neuroprotective protein*). Los receptores del VIP (VPAC-1, VPAC-2 y PAC-1) se presentan en las células del EPR, las neuronas y las células gliales. La expresión del receptor VPAC-1 aumenta en los estados patológicos, como en los daños isquémicos.

La “nicotinamida” o “NIC” (del inglés, *nicotinamide*) o “vitamina B”, también denominado niacinamida o amida del ácido nicotínico, es una amida soluble en agua originada a partir del ácido nicotínico (vitamina B3/niacina). El nombre químico es pirido-3-carboxamida y su fórmula empírica es $C_6H_6N_2O$. El NIC es el primer precursor de la nicotinamida adenina dinucleótico (NAD⁺) y de su derivado fosforilado (NADP⁺), una coenzima esencial para la producción mitocondrial del ATP y el único sustrato de la enzima nuclear PARP-1 (del inglés, *poly-ADP-ribose polymerase-1*). El NIC actúa como inhibidor de la enzima PARP, que juega un papel importante en la reparación del ADN celular, también en las células retinianas, en caso de degeneración celular. El NIC también inhibe el NAD deacetilasa dependiente de histona, que juega un papel importante en la silenciación y diferenciación de la expresión génica, en la estabilidad genómica, en la señal de transducción y en el crecimiento y muerte celular. El NIC tiene diversos efectos en cultivos celulares, incluyendo la inhibición de la PARP, que protege a las células del estrés oxidativo. Existen además trabajos científicos que apoyan el papel neuroprotectivo del NIC. Los daños retinianos *in vivo* e *in vitro* se extienden más allá de la propia zona lesionada, abarcando las diferentes capas de la retina. La activación del PARP influye sobre algunas de las rutas apoptóticas y se ha sugerido que su sobreexpresión está implicada en algunos tipos de muerte celular retiniana. La activación del PARP es dependiente del NAD⁺ y durante el proceso de ribosilación del poly-ADP el mecanismo dependiente de PARP es activado y conduce a la apoptosis. Estos múltiples efectos del NIC pueden deberse a que es un sustrato esencial para el NADH y el NADPH.

En una realización más preferida de la composición de la invención, ésta además comprende ácido retinoico (ATRA).

El “ácido retinoico” o “ATRA” (del inglés, *all-trans-retinoic acid*) también es conocido como ácido de la vitamina A. Su fórmula empírica es $C_{20}H_{28}O_2$ (peso molecular 300,4). Es una molécula lipofílica que puede atravesar fácilmente la membrana celular. Se sintetiza *in vivo* en el tejido neural a partir del retinol. El ATRA está implicado en la diferenciación de la vesícula óptica en EPR. El ATRA es el metabolito natural del ácido retinoico y juega un papel importante en el crecimiento y la diferenciación. Es utilizado en la diferenciación de células madre embrionarias hacia diferentes tipos celulares, como neuronas, células cardíacas, de músculo liso o germinales. El ATRA también está asociado con la neuroprotección, tanto *in vivo* como *in vitro*. Se ha

demostrado que reduce el estrés oxidativo en neuronas embrionarias mediante el incremento de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutathion reductasa. Se ha descrito además que modula la proliferación, la diferenciación y la apoptosis, tanto en células normales como alteradas, *in vitro*. Potencia el efecto neuroprotectivo del NGF. Influencia los estadios del desarrollo temprano, como la neurogénesis o el crecimiento axonal, mediante la unión a los receptores RARs (del inglés, *nuclear retinoic acid receptors*) y RXRs (del inglés, *retinoid X receptors*), que regulan la transcripción génica. Se ha descrito que tiene un potente efecto antiapoptótico en la muerte espontánea de los eosinófilos. Juega un papel importante en la diferenciación de las células madre mediante la alteración de cambios epigenéticos en el ADN, así como en las proteínas histonas. Se ha descrito que tiene un efecto neuroprotectivo en diferentes experimentos *in vivo* e *in vitro* y que induce la pigmentación en líneas celulares de melanoma.

En una realización más preferida, la composición de la invención además comprende el sobrenadante de un cultivo de células de epitelio pigmentario de la retina.

El “epitelio pigmentario de la retina” o “EPR” es la capa de células pigmentadas ubicada en la parte exterior de la retina que interactúa estrechamente con las células fotorreceptoras (conos y bastones) en el mantenimiento de la función visual. Está firmemente anclado a la coroides subyacente por la membrana de Bruch. El epitelio pigmentario retiniano está compuesto por una capa de células hexagonales que están densamente empaquetadas con gránulos de pigmentos. Vistas en sección, cada célula consta de una parte externa no pigmentada en la que se sitúa un núcleo de forma grande y oval y una porción interior pigmentada que extiende una serie de procesos filiformes rectos entre los bastones. Sirve como factor limitante del transporte que mantiene el ambiente de la retina, suministrando pequeñas moléculas como aminoácidos, ácido ascórbico y D-glucosa, al tiempo que representa una barrera estrecha para las sustancias transportadas por la sangre de la coroides. El epitelio pigmentario de la retina también tiene como función la fagocitosis de los segmentos externos de las células fotorreceptoras y regeneración del fotorpigmento.

Se entiende por “células de EPR” cualquier tipo celular presente en dicho epitelio, preferiblemente células epiteliales. Las células de EPR se pueden cultivar en presencia de los medios y condiciones de cultivo conocidas en el campo técnico para el cultivo de células epiteliales. Así, el medio de cultivo puede comprender, por

ejemplo, aunque sin limitarnos, suero fetal bovino (FBS) o humano, antibióticos, antimicóticos, factores de crecimiento, etc. El medio base que puede ser utilizado en el medio de cultivo podría ser cualquiera de los conocidos en el estado de la técnica para el cultivo celular *in vitro*, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, medio basal

5 "Eagle", CRCM-30, CMRL-1066, "Dulbecco's Modified Eagle's Medium" (DMEM), "Fischer's Medium", "Glasgow Minimum Essential Medium", Ham's F-10, Ham's F-12 (F12), "High Cell Density Medium", "Iscoe's Modified Dulbecco's Medium", Leibovitz's L-15, McCoy's 5A, medio 199, "Minimum Essential Medium Eagle", "Alpha Minimum Essential Medium", CnT20, NCTC 109, NCTC 135, RPMI-1640, "William's Medium E",

10 Waymouth's MB 75211, Waymouth's MB 70511, "Keratinocyte serum-free medium" (KSFM), o cualquiera de sus combinaciones. Preferiblemente, el medio de cultivo comprende un medio base DMEM/F12. Además, las condiciones de cultivo pueden ser, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en presencia de entre el 5 y el 10% de CO₂, entre 36 y 38°C y durante 24 a 48h. Preferiblemente, dicho cultivo se lleva a cabo

15 como se describe a continuación en los ejemplos de la presente invención.

Como muestran los ejemplos de la presente invención, explantes neuroretinianos que habían sufrido una degeneración progresiva durante el cultivo estaban significativamente mejor conservados cuando se cocultivaron con AD-MSCs en

20 presencia del sobrenadante de un cultivo de células de EPR y VIP+NIC ó VIP+NIC+ATRA. Por ello, en una realización aun más preferida, la composición de la invención comprende AD-MSCs, VIP, NIC, ATRA y el sobrenadante de un cultivo de células de EPR.

25 Las MSCs y las células de EPR a las que se refiere la presente invención pueden proceder de cualquier animal, preferiblemente mamífero, más preferiblemente humano. En otra realización preferida, las MSCs y las células de EPR proceden de un humano.

30 Además, tanto las MSCs como las células de EPR pueden ser de origen autólogo o heterólogo. La posibilidad de que dichas células sean de origen autólogo permite que el posterior trasplante o la administración de la composición de la invención para la regeneración tisular de la retina dañada pueda realizarse sin que sea necesaria la inmunosupresión del sujeto tratado. Por ello, en una realización más preferida, las

35 MSCs son de origen autólogo. Se entiende por "origen autólogo" cualquier procedencia de la muestra, tomada de los tejidos o células de un individuo o paciente,

que es la misma en el donante y en el receptor de los mismos cuando le son administrados tras su tratamiento o trasplantados tras su modificación. En una realización aun más preferida, las MSCs son de origen autólogo y las células de EPR son de origen heterólogo.

5

En otra realización preferida, la composición de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, dicha composición puede comprender uno o más excipientes.

10

El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición de la invención, estabiliza dichos elementos, activa o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de darle consistencia. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos, como por ejemplo es el caso de almidones, azúcares o celulosas, la función de colorante, la función de protección de la composición, como por ejemplo, para aislarla del aire y/o la humedad, la función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación, la función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo. Así, el término excipiente incluye, por ejemplo aunque sin limitarnos, aglutinantes, agentes dispersantes, lubricantes, deslizantes, etc.

20

El "vehículo farmacéuticamente aceptable", al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en la composición para diluir cualquiera de los componentes comprendidos en ella hasta un volumen o peso determinado. El vehículo farmacéuticamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los elementos comprendidos en la composición de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición.

25

30

Preferiblemente, la composición de la invención comprende MSCs, VIP y NIC, y más preferiblemente además ATRA y el sobrenadante de un cultivo de células de EPR, en una cantidad terapéuticamente efectiva, entendiéndose por "cantidad terapéuticamente efectiva" el nivel, cantidad o concentración de dichos elementos que produzca el efecto deseado tratando y/o previniendo el daño o degeneración de la retina sin causar efectos adversos. La dosificación para obtener una cantidad

35

terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, enfermedad o tolerancia del individuo al que le va a ser administrada la composición de la invención.

5 La composición de la presente invención puede formularse para su administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Como ejemplos de preparaciones se incluye cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, tabletas, perlas, gránulos, pastas, pellets, etc.), semisólida (geles, cremas, ungüentos, etc.) o líquida (soluciones, suspensiones, dispositivo osmótico o
10 emulsiones) para administración oral, tópica o parenteral. La composición de la presente invención también puede estar en forma de formulaciones de liberación sostenida de drogas o de cualquier otro sistema convencional de liberación, así puede estar contenida, aunque sin limitarnos, en nanopartículas, liposomas o nanosferas, en un material polimérico, en un implante biodegradable o no biodegradable o en
15 micropartículas biodegradables, como por ejemplo, microesferas biodegradables.

Tal composición y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, intraespinal, intraestromal,
20 intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intravítrea, intracamerular, intraretiniana, subretiniana, intracapsular, tópica, mediante parches transdérmicos, percutánea, espray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna o bomba de infusión.

25 En una realización aun más preferida, la composición de la invención se encuentra formulada para su administración oftálmica. La expresión “formulada para su administración oftálmica” se refiere a una formulación que permita que la composición de la invención pueda ser administrada ocularmente, por ejemplo aunque sin
30 limitarnos, de manera tópica o de manera intraocular (incluyendo intravítrea, intracamerular, intraretiniana, subretiniana y otras) sin que dicha administración afecte negativamente a las propiedades, por ejemplo estructurales y/o fisiológicas, del ojo. Ejemplos de la composición de la invención formulada para su administración oftálmica son, aunque sin limitarnos, dicha composición asociada a agua, a sales, a
35 un vehículo líquido polimérico o semi-sólido, a un tampón fosfato o a cualquier otro vehículo líquido oftálmicamente aceptable de los conocidos en el estado de la técnica.

En otra realización preferida, la composición de la invención comprende además otro principio activo. Como se emplea aquí, el término “principio activo”, “sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” ó “ingrediente farmacéuticamente activo” se refiere a cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en la cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

En otra realización preferida, la composición de la invención es una “preparación combinada” o también denominada “yuxtaposición”, lo que significa que los componentes de la preparación combinada no necesitan encontrarse presentes como unión, por ejemplo en una composición, para poder encontrarse disponibles para su aplicación separada o secuencial. De esta manera, la expresión “yuxtapuesta” implica que no resulta necesariamente una combinación verdadera, a la vista de la separación física de los componentes. Así, los componentes comprendidos en la composición de la invención pueden ser administrados de manera simultánea o secuencial.

Como muestran los ejemplos de la presente invención la composición de la invención es capaz de mejorar el estado de conservación tanto de explantes neurorretinianos como de células del EPR cultivados *ex vivo* que han sufrido un proceso degenerativo. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento, o alternativamente, a la composición de la invención para su uso como medicamento.

Los “medicamentos” a los que se refiere la presente invención pueden ser de uso humano o veterinario. El “medicamento de uso humano” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica. El “medicamento de uso veterinario” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el

fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica.

5 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades retinianas degenerativas, o alternativamente a la composición de la invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades retinianas degenerativas.

10 El término “tratamiento”, tal como se entiende en la presente invención, se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de la enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- 15 (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
- (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

20 El término “prevención”, tal como se entiende en la presente invención, consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica, pero aún no se ha diagnosticado que la tenga.

25 Se entiende por “enfermedad retiniana degenerativa” cualquier enfermedad o patología que desencadene o curse con una degeneración tisular de la retina o degeneración retiniana, entendiéndose por “retina” cualquiera de sus capas: epitelio pigmentario de la retina, fotorreceptores, membranas limitantes interna y externa, capas nucleares interna y externa, capas plexiformes interna y externa, capa de
30 células ganglionares y capa de fibras del nervio óptico. En una realización más preferida, la enfermedad retiniana degenerativa es una enfermedad degenerativa del EPR, de los fotorreceptores o de cualquiera de las otras neuronas o células retinianas, es decir, de cualquier otra capa neuroretiniana.

35 Una “enfermedad degenerativa del EPR” es cualquier enfermedad o patología que desencadene o curse con una degeneración del epitelio pigmentario de la retina.

Ejemplos de este tipo de enfermedades son, aunque sin limitarnos, la DMAE, la miopía patológica y la retinosis pigmentaria, entre otras.

Los “fotorreceptores” son neuronas especializadas sensibles a la luz, localizadas en la retina externa de los vertebrados. Los conos y los bastones son unas de las células más especializadas y complejas del cuerpo. Realizan la conversión de la luz en impulsos nerviosos que el cerebro transforma en imágenes. Los fotorreceptores contienen varias zonas donde se realizan funciones específicas: un segmento externo, un segmento interno, un cuerpo celular y un terminal sináptico. Los segmentos externos de los bastones están formados por una acumulación de discos membranosos en forma de pilas de monedas rodeados por la membrana celular, donde se realiza el fenómeno de la fototransducción y se encuentra el pigmento fotosensible, rodopsina. En los conos, los discos están formados por repliegues de la propia membrana plasmática y las moléculas fotosensibles son las opsinas. Separando el segmento externo del segmento interno se localiza un cilio conector interno que presenta una estructura similar a los cilios o flagelos de otras células. La región del cilio conector sirve de paso de vesículas entre el segmento externo e interno. En el segmento interno se diferencian dos partes: el elipsoide y el mioide; en el primero se localizan una gran acumulación de mitocondrias y en el segundo es donde reside la maquinaria de síntesis proteica de la célula.

Una “enfermedad degenerativa de los fotorreceptores” es cualquier enfermedad o patología que desencadene o curse con una degeneración de los fotorreceptores de la retina. Ejemplos de este tipo de enfermedades son, aunque sin limitarnos, la distrofia de conos y bastones, la enfermedad de Stargardt, el fundus flavimaculatus o las distrofias en patrón, entre otras.

En una realización aun más preferida, la enfermedad es DMAE, RP, enfermedad de Stargardt o algunas de las enfermedades del nervio óptico como la neuropatía óptica isquémica, preferiblemente la NOIANA.

La “degeneración macular” o “degeneración macular asociada a la edad” o “DMAE”, es una enfermedad ocasionada por degeneración, daño o deterioro de la mácula. La mácula es una capa amarillenta de tejido sensible a la luz que se encuentra en la parte posterior del ojo, en el centro de la retina. Esta área proporciona la agudeza visual, permitiendo al ojo percibir detalles finos y pequeños. Cuando la mácula no

funciona correctamente, las áreas del centro del campo visual empiezan a perder nitidez, volviéndose turbias, borrosas. La degeneración macular a la que se refiere la presente invención incluye tanto la DMAE seca como la húmeda.

- 5 La "retinitis pigmentosa", "retinosis pigmentaria" o "RP" no es una enfermedad única, sino un conjunto de enfermedades oculares crónicas de origen genético y carácter degenerativo que se agrupan bajo este nombre. Se caracteriza por una degeneración progresiva de la retina, que poco a poco va perdiendo los conos y los bastones. Produce como síntomas principales una disminución lenta pero progresiva de la
- 10 agudeza visual que en las primeras etapas afecta predominantemente a la visión nocturna y al campo periférico, manteniéndose sin embargo la visión central.

- La "enfermedad de Stargardt", también conocida como "distrofia macular de Stargardt", es una enfermedad ocular hereditaria que se caracteriza por una
- 15 degeneración macular. El inicio de los síntomas tiene lugar en la infancia o adolescencia, y se manifiesta por pérdida de agudeza visual progresiva. Los síntomas más comunes de esta enfermedad son visión borrosa, zonas ciegas en el campo visual o escotomas, dificultad para adaptarse a la penumbra y sensibilidad a la luz.

- 20 La "neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica" o "NOIANA, se define como un infarto en la cabeza del nervio óptico, es decir una interrupción del aporte sanguíneo, tras el cual se produce un determinado grado de isquemia con su consecuente pérdida visual asociada. Se caracteriza por un episodio unilateral, súbito e indoloro de pérdida de visión, aunque se considera generalmente que la etiología es sistémica por
- 25 lo que la afección puede ser bilateral. Representa un grupo de desórdenes del nervio óptico caracterizados por una falta del flujo vascular adecuado y que determina la muerte y posterior desaparición de las células ganglionares de la retina. Esta entidad constituye un infarto de la papila.

- 30 En una realización aun más preferida, la enfermedad retiniana afecta a un humano.

- 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
- 35 invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la

invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

Fig. 1. Proliferación celular de las células de EPR (ARPE19) tratadas con mitomicina C (MMC), cultivadas con VIP, NIC o ATRA y sus combinaciones (VIP+NIC=VN, VIP+ATRA=VA, NIC+ATRA=NA y VIP+NIC+ATRA=VNA) evaluada mediante el ensayo alamarBlue®. T indica el tratamiento con MMC (50 µg/ml) de las células de EPR. La significancia estadística se establece en $p \leq 0,01$ (**)/(+) y $P \leq 0,001$ (+++). Signos “+” han sido empleados para indicar la diferencia significativa entre 3 y 5 días. La barra de error es indicada como $\pm SD$ (n=3).

10

Fig. 2. Proliferación celular de las células de EPR (ARPE19) tratadas con mitomicina C (MMC) en cultivo indirecto con AD-MSCs, evaluada mediante el ensayo alamarBlue®, en presencia de factores (VIP, NIC o ATRA) y sus combinaciones (VIP+NIC=VN, VIP+ATRA=VA, NIC+ATRA=NA y VIP+NIC+ATRA=VNA). T indica el tratamiento con MMC (50 µg/ml) de las células de EPR. La significancia estadística se establece en $p \leq 0,5$ (*), $p \leq 0,01$ (**) y $p \leq 0,001$ (***)/(+). La barra de error es indicada como $\pm SD$ (n=3).

15

Fig. 3. Evaluación de los explantes neuroretinianos cocultivados con AD-MSCs, medio condicionado EPR (RCM) y factores (VIP, NIC o ATRA) o sus combinaciones a los 7 días de cultivo, mediante azul de toluidina (primera columna) y marcadores inmunohistoquímicos (segunda y tercera columna). Calbindina, CRALBP, GFAP y sinaptofisina representan conos, células de Müller, gliosis reactiva y sinapsis, mientras que los núcleos se marcan con DAPI. Barra de escala: 50µm.

25

Fig. 4. Evaluación de los explantes neuroretinianos cocultivados con AD-MSCs, medio condicionado EPR y factores (VIP, NIC o ATRA) o sus combinaciones a los 7 días de cultivo, mediante inmunohistoquímica. La rodopsina se presenta en bastones y los núcleos aparecen identificados con DAPI. Control I (A), Control II (B), Control III (C), VIP (D), NIC (E), ATRA (F), VIP+NIC (G), VIP+ATRA (H), NIC+ATRA (I) and VIP+NIC+ATRA (J). Barra de escala: 50µm.

30

35

Fig. 5. Evaluación de la degeneración de los explantes neurorretinianos basado en el estudio histológico e inmunohistoquímico.

La evaluación del estado neurorretiniano de las muestras cultivadas en todos los experimentos fue llevado a cabo por tres expertos en la materia de manera individualizada, de modo que se valoró numéricamente de 0 a 10 el estado de conservación neurorretiniana. Así, una valoración de 0 representa la total desorganización y degeneración retiniana, mientras que el 10 corresponde a una retina bien preservada. La significancia estadística se establece en $p \leq 0,05$ (*)/(+). Donde el signo “+” indica diferencia significativa entre el Control II y los experimentos, y el “*” indica diferencia significativa entre el Control III y los experimentos. La barra de errores se indica como $\pm SD$ ($n=3$ a 6).

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que ponen de manifiesto la efectividad de la composición de la invención. Así, los siguientes ejemplos ilustran la utilización de células AD-MSCs junto con factores secretados por el EPR y diferentes biomoléculas (VIP, NIC y ATRA) para crear un ambiente que permita la diferenciación de las AD-MSCs hacia células del EPR, que simultáneamente puedan proteger al EPR y a la neurorretina en degeneración. Para este objetivo, se desarrollaron varios métodos en condiciones de cultivo estándar de 5% de CO_2 a $37^\circ C$ en atmósfera humidificada, con recambios del medio de cultivo cada 2-3 días, los cuales se describen a continuación.

EJEMPLO 1. Cocultivo de células del EPR que han sufrido un proceso de degeneración celular y células AD-MSCs en presencia de VIP, NIC, ATRA y sus combinaciones.

Células AD-MSCs y EPR fueron cocultivadas en una proporción 2:1, en placas de 6 pocillos (BD Falcon), con medio DMEM/F12 suplementado con 10% FBS, 1% antibióticos (penicilina/estreptomicina) y 1% antimicóticos (anfotericina). Ambos tipos celulares se mantuvieron separados físicamente por una membrana porosa (BD Falcon). Previamente, las células del EPR (60.000 células/ cm^2) fueron cultivadas en el fondo de placas de 24 pocillos durante 24 horas, y tratadas durante 2 horas con una concentración óptima de mitomicina C (50 $\mu g/ml$ disueltos en el medio de cultivo) para inducir un proceso de degeneración celular (células de EPR bajo condiciones de estrés).

Las AD-MSCs fueron cultivadas (30.000 células/cm²) durante 24 horas en la parte superior de las membranas de pocillos tipo Transwell (*tissue culture treated track-etched polyethylene terephthalate (PET)*); membrana con tamaño de poro de 0,4µm y densidad de poro de 2,0±0,2x10⁶/cm²) para su adhesión y crecimiento.

5

Para el cocultivo se suplementó el medio de crecimiento con VIP (5 µM), NIC (10 mM), ATRA (5 µM) o sus 4 combinaciones VIP+NIC, VIP+ATRA, NIC+ATRA y VIP+NIC+ATRA, para evaluar la efecto de estas biomoléculas y sus combinaciones en presencia de las AD-MSCs sobre las células del EPR sometidas a estrés. La capacidad protectora de las AD-MSCs por sí solas, así como en las diferentes combinaciones con las biomoléculas fue evaluada a los 3 y 5 días mediante el método del alamarBlue®.

10

1.1. Resultados

15

En cuanto a la evaluación de la capacidad de protección, VIP, NIC y ATRA individualmente y sus combinaciones mostraron un efecto supresivo sobre la proliferación de las células de EPR sometidas a estrés (Fig. 1). Sin embargo, en presencia de las AD-MSCs algunas de las combinaciones con estos factores (VIP, ATRA, VIP+NIC, NIC+ATRA o VIP+NIC+ATRA) estimularon la proliferación de las células del EPR. Esto no se observó en las combinaciones con NIC y VIP+ATRA (Fig. 2).

20

EJEMPLO 2. Co-cultivo de explantes neuroretinianos humanos que sufren una degeneración progresiva con células AD-MSCs, medio condicionado con EPR y VIP, NIC, ATRA y sus combinaciones.

25

Células AD-MSCs fueron cocultivadas con explantes neuroretinianos humanos que espontáneamente sufren una degeneración progresiva durante el cultivo. Para el cocultivo se emplearon placas tipo Transwell de 6 pocillos, de modo que el tejido retiniano y las AD-MSCs permanecieron separadas físicamente por la membrana de los pocillos Transwell. Se empleó medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con 10% FBS, 1% antibióticos, 1% antimicóticos y 50% de medio condicionado con EPR.

30

Previamente las AD-MSCs (30.000 células/cm²) fueron cultivadas durante 24 horas en el fondo de placas de 24 pocillos.

35

Los explantes neuroretinianos (7x7 mm) se obtuvieron del área retiniana central y se colocaron sobre la membrana de los pocillos Transwell (*tissue culture treated polycarbonate (PC)* diámetro de membrana 24 mm, grosor 10 µm, y tamaño del poro 0,4 µm con densidad de 1×10^8 poros/cm²) con los fotorreceptores en contacto con la membrana del pocillo.

El medio condicionado con EPR se preparó mediante el cultivo de células de EPR hasta el 90% de confluencia, momento en el que se recambió el medio y se continuó el cultivo durante 48 horas. Finalmente, se recogió el medio, se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos para desechar posibles restos celulares y el sobrenadante (medio condicionado EPR) se guardó a -80°C hasta su utilización.

Para el cocultivo de AD-MSCs con explantes de neuroretina el medio de cultivo se suplementó con VIP (5µM), NIC (10mM), ATRA (5µM) o sus 4 combinaciones VIP+NIC, VIP+ATRA, NIC+ATRA y VIP+NIC+ATRA, para evaluar el efecto de estas biomoléculas y sus combinaciones sobre las AD-MSCs y la neuroretina en degeneración.

La capacidad protectora de las AD-MSCs por sí solas, así como en las diferentes combinaciones con las biomoléculas, fue evaluada a los 7 días de cocultivo mediante el estudio de la morfología retiniana (tinción con azul de toluidina) y de la inmunexpresión celular de diferentes proteínas, calbindina (CB), sinaptofisina (SYP), rodopsina (RHO), proteína de unión al retinaldehído celular (CRALBP) y proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Los anticuerpos anti-CB y -RHO se emplearon para evaluar la integridad de los conos y bastones, respectivamente; el anti-SYP para evaluar las sinapsis entre las diferentes neuronas retinianas a nivel de la OPL e IPL; el anti-CRALBP para evaluar el estado funcional de las células de Müller y diferenciarlas de los astrocitos (GFAP+ y CRALP-); y el anti-GFAP para evaluar el proceso de gliosis reactiva del tejido retiniano. Se utilizó la tinción DAPI para identificar los núcleos celulares.

2.1. Resultados

Como controles se utilizaron explantes retinianos iniciales (sin cultivar) (Control I) (Figs. 3A, B, C y 4A), explantes cultivados durante 7 días con medio condicionado

EPR (Control II) (Figs. 3D, E, F y 4B) y con medio condicionado EPR + AD-MSCs (Control III) (Fig. 3G, H, I y 4C).

Control I (Explantos neurorretinianos de 0 días) (Fig. 3A, B, C y 4A)

5

Estos explantes neurorretinianos mostraron cambios degenerativos iniciales en las células retinianas, principalmente en los fotorreceptores (Fig. 3A), y ligera vacuolización celular, probablemente debidos a daños isquémicos post-mortem (carencia del aporte de nutrientes celulares) y a la manipulación de los explantes para el cultivo. Sin embargo, la estructura general de la retina se presentó adecuadamente conservada, donde se preservaron adecuadamente los segmentos externos e internos de los fotorreceptores (Fig. 3B, flechas blancas), que son las estructuras más sensibles al daño, los núcleos de estas células se presentaron ligeramente edematosos (INL); se identificó perfectamente la OLM así como las conexiones sinápticas entre los pedículos de los conos y las células horizontales y bipolares de cono a nivel de la OPL (Fig. 3B, banda de fluorescencia, debido a la combinación del marcaje con calbindina (CB) y sinaptofisina (SYP)); el citoplasma de las neuronas de integración apareció ligeramente edematoso (ONL); los procesos neurales de la IPL aparecieron ligeramente edematosos y se pudo diferenciar el denso citoplasma de las células de Müller; las células ganglionares aparecieron adecuadamente conservadas mientras que la NFL se presentó edematizada; la ILM se observó claramente definida.

10

15

20

Control II (Explantos neurorretinianos cultivados 7 días en presencia de medio condicionado EPR) (Fig. 3D, E, F y 4B)

25

La estructura retiniana apareció desorganizada y se mostraron procesos de degeneración celular. Los fotorreceptores aparecieron desestructurados y en un pequeño número; se observó edematización celular, picnosis, cariorrexis y cariólisis en las células retinianas; la OPL desapareció, lo que solapó la ONL y la INL; las células ganglionares estaban degeneradas; se observó una ILM aparentemente intacta. En muchas de las muestras estudiadas, la arquitectura retiniana estaba completamente desorganizada.

30

Control III (Explantos neurorretinianos cultivados 7 días en presencia de medio condicionado EPR + AD-MSCs) (Fig. 3G, H, I y 4C)

35

La estructura retiniana general se mostró mejor preservada en comparación con el Control II. En las capas retinianas externas se pudieron apreciar algunas áreas donde los fotorreceptores formaban rosetas, pero mantenían sus segmentos externos e internos, con algunos núcleos picnóticos, en cariorrexis y cariólisis, su citoplasma aparecía edematoso y contenía restos nucleares; la OPL había desaparecido y la INL mostraba picnosis, cariorrexis y cariólisis; la IPL se diferenciaba claramente pero los procesos neuronales aparecían prácticamente degenerados; la NFL mostró un alto grado de degeneración y se apreciaron engrosadas prolongaciones de las células de Müller; la ILM estaba claramente definida.

Experimentos (Explantos neurorretinianos cultivados 7 días en presencia de medio condicionado EPR + AD-MSCs con los diferentes factores o sus combinaciones) (Figs. 3J-AD, 4D-J)

En estas muestras se pudieron apreciar diferentes grados de degeneración en comparación con el Control III, aparecieron diversas variaciones en el estado de los explantes retinianos dependiendo del estado inicial del Control I.

El cultivo con VIP mostró una marcada gliosis reactiva, determinada por el intenso marcaje GFAP (Fig. 3L), donde las células de Müller aparecieron hipertróficas extendiéndose para rellenar el espacio dejado por las neuronas en degeneración. El VIP no parecía mejorar el estado retiniano en comparación con el Control III, e incluso en algunos casos el estado de degeneración neurorretiniana era mayor. Sin embargo, NIC y ATRA mostraron una mejor conservación neurorretiniana, lo que puede considerarse como un efecto protector sobre la conservación general de los explantes de neurorretina humana. Las muestras con VIP+NIC mostraron algunos segmentos externos de los conos aparentemente intactos (Fig. 3T, flechas). En estas muestras y en las VIP+NIC+ATRA se observó una buena conservación de la estructura retiniana en comparación con el resto de grupos del experimento.

En el análisis inmunohistoquímico los explantes neurorretinianos en presencia de las AD-MSCs aparecían mejor preservados que en ausencia de estas células. NIC y ATRA parecen tener un efecto positivo para conservación de la estructura retiniana, pero que no es significativamente mejor que las AD-MSCs individualmente, al contrario de lo observado en el caso de VIP+NIC y VIP+NIC+ATRA en comparación con el resto de grupos experimentales.

La evaluación del estado neuroretiniano de las muestras cultivadas en todos los experimentos fue llevado a cabo por tres expertos en la materia de manera individualizada, de modo que se valoró numéricamente de 0 a 10 el estado de conservación neuroretiniana. Así, una valoración de 0 representa la total desorganización y degeneración retiniana, mientras que 10 corresponde a una retina bien preservada, como sería el caso de los Controles I.

Se resume y representa la evaluación de los efectos de cada factor en la Figura 5. Los explantes neuroretinianos con AD-MSCs (Control III) claramente estaban mejor conservados ($p < 0,05$) que con medio condicionado EPR (Control II). Los explantes cultivados con AD-MSCs y biomoléculas (NIC y ATRA) no mostraban un grado de conservación significativamente mejor que con AD-MSCs (Control III). Los explantes cultivados solo con VIP y AD-MSCs no conservaron la neuroretina, desarrollando una gliosis reactiva (inmunoexpresión GFAP). Los explantes neuroretinianos con medio condicionado EPR, AD-MSCs y combinaciones de biomoléculas (VIP+NIC y VIP+NIC+ATRA) estaban significativamente mejor conservados ($p < 0,05$) que en cualquier otro tratamiento.

Así, teniendo en cuenta los resultados obtenidos se puede concluir que:

- VIP, NIC y ATRA individualmente y sus combinaciones no muestran una conservación significativamente efectiva sobre las células del EPR en degeneración. Sin embargo, algunas combinaciones de estas biomoléculas muestran un efecto positivo en presencia de AD-MSCs.

- VIP, NIC y ATRA y sus combinaciones, junto con AD-MSCs y los factores secretados por el EPR, muestran una capacidad potencial para conservación de la estructura neuroretiniana.

- En todos los casos las combinaciones de estas biomoléculas siempre han mostrado mejores efectos para conservar el EPR en degeneración y la estructura neuroretiniana que VIP, NIC y ATRA individualmente.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimales, péptido intestinal vasoactivo (VIP) y nicotinamida (NIC).
5
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, que además comprende ácido retinoico (ATRA).
3. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que además comprende el sobrenadante de un cultivo de células de epitelio pigmentario de la retina.
10
4. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde las células madre mesenquimales proceden de tejido adiposo.
15
5. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo, VIP, NIC, ATRA y el sobrenadante de un cultivo de células de epitelio pigmentario de la retina.
20
6. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde las células madre mesenquimales y las células de epitelio pigmentario de la retina proceden de un humano.
7. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde las células madre mesenquimales son de origen autólogo o heterólogo.
25
8. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
30
9. Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la elaboración de un medicamento.
10. Uso según la reivindicación 9, donde el medicamento es para el tratamiento
35 y/o prevención de enfermedades retinianas degenerativas.

11. Uso según la reivindicación 10, donde la enfermedad retiniana degenerativa es una enfermedad degenerativa del epitelio pigmentario de la retina o de cualquier otra capa neuroretiniana.
- 5 12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, donde la enfermedad es degeneración macular, retinitis pigmentosa (RP), enfermedad de Stargardt o neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica (NOIANA).
- 10 13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde la enfermedad retiniana degenerativa afecta a un humano.

Fig. 1

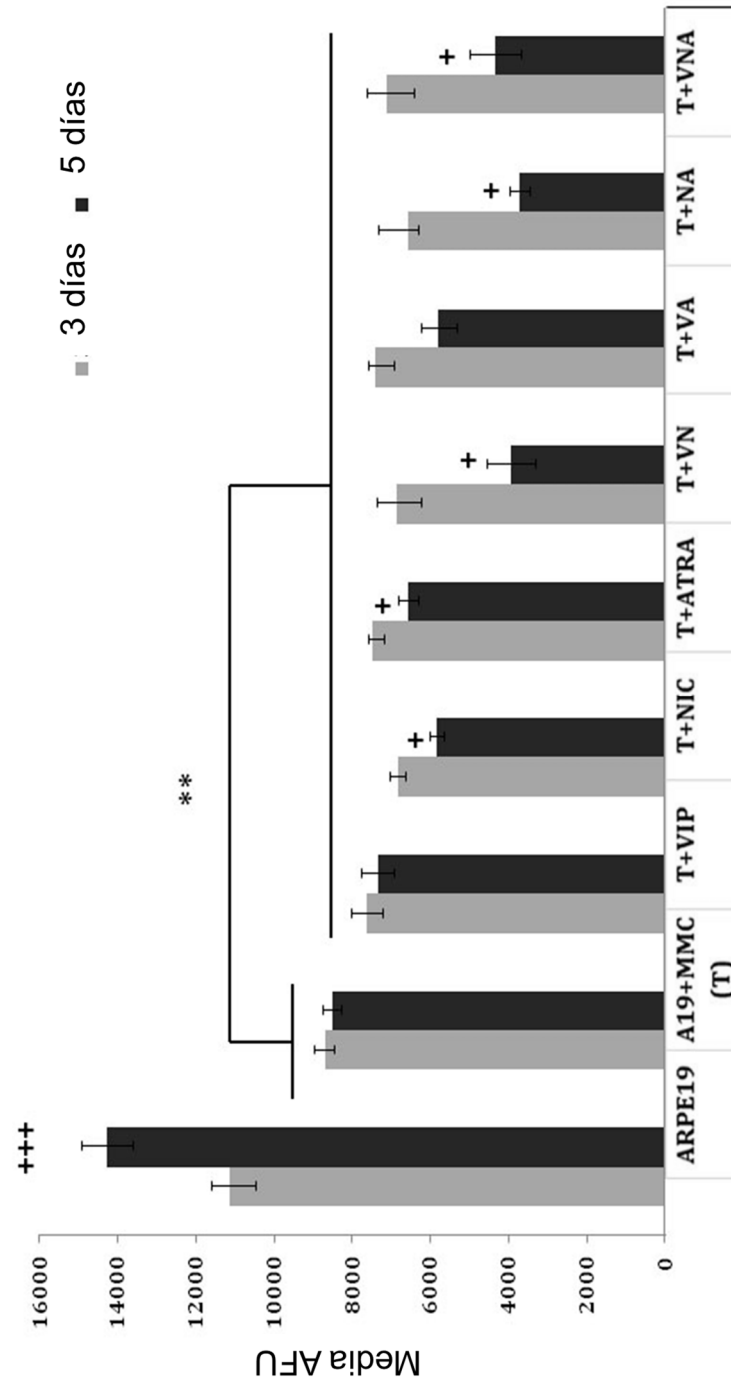


Fig. 2

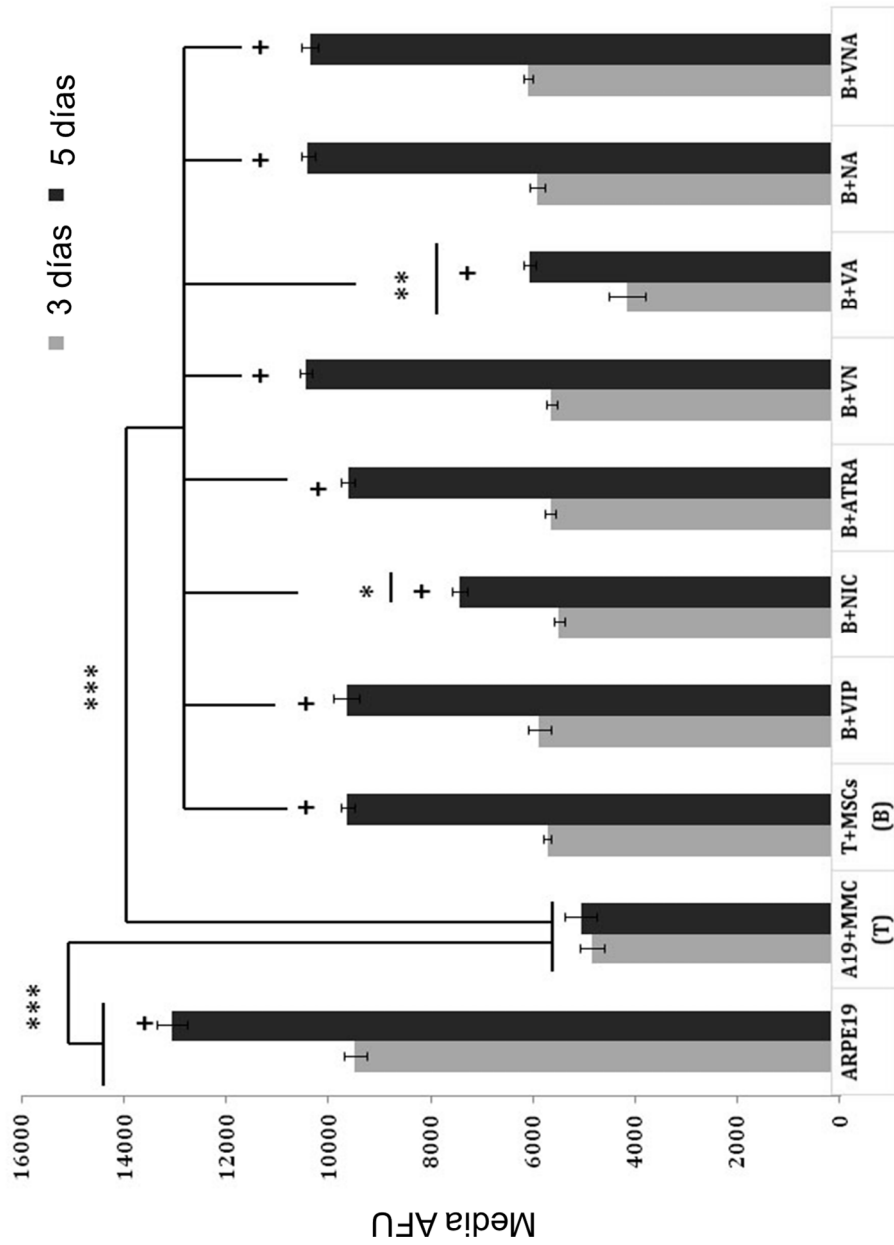


Fig. 3

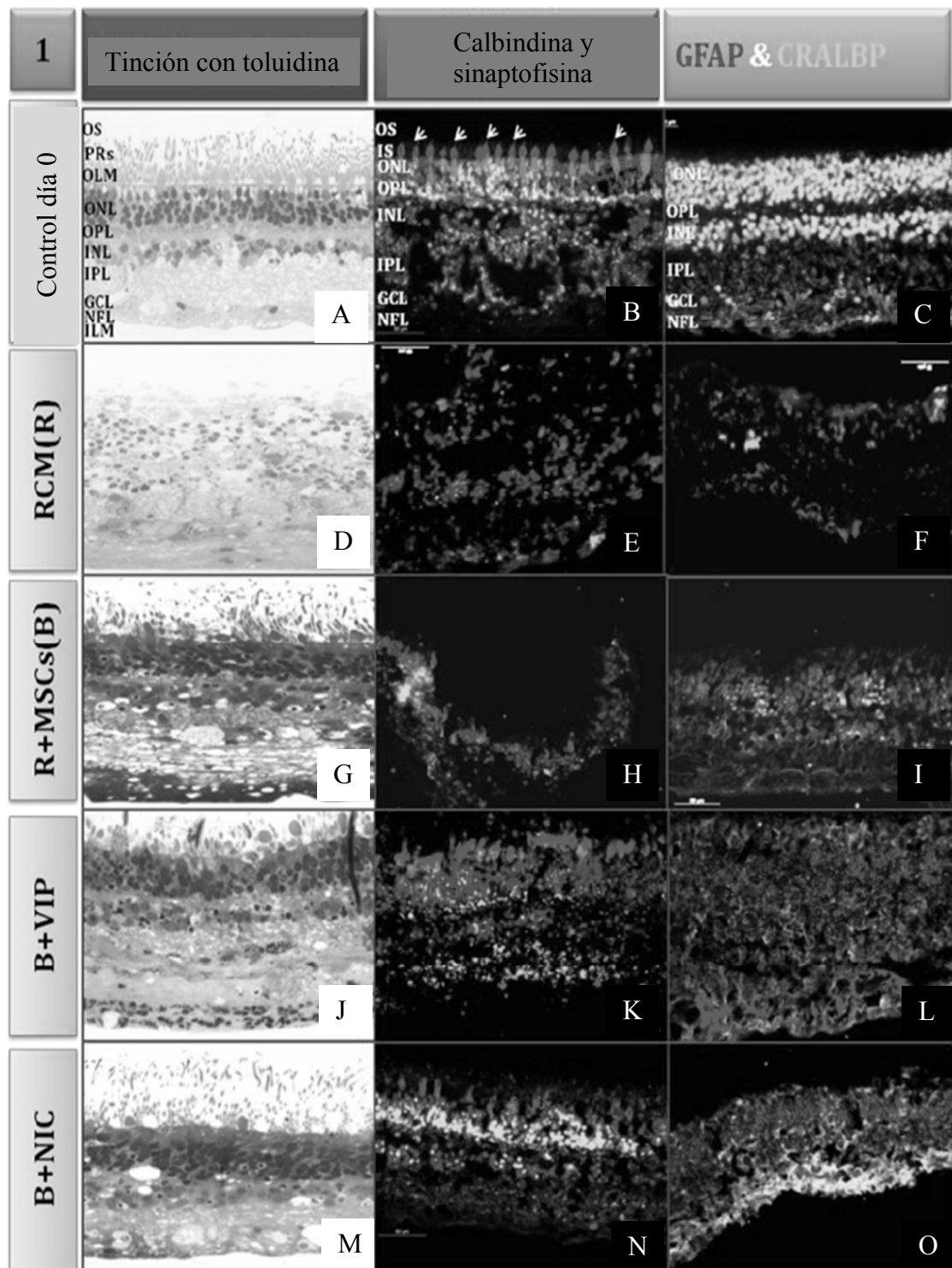


Fig. 3 (cont.)

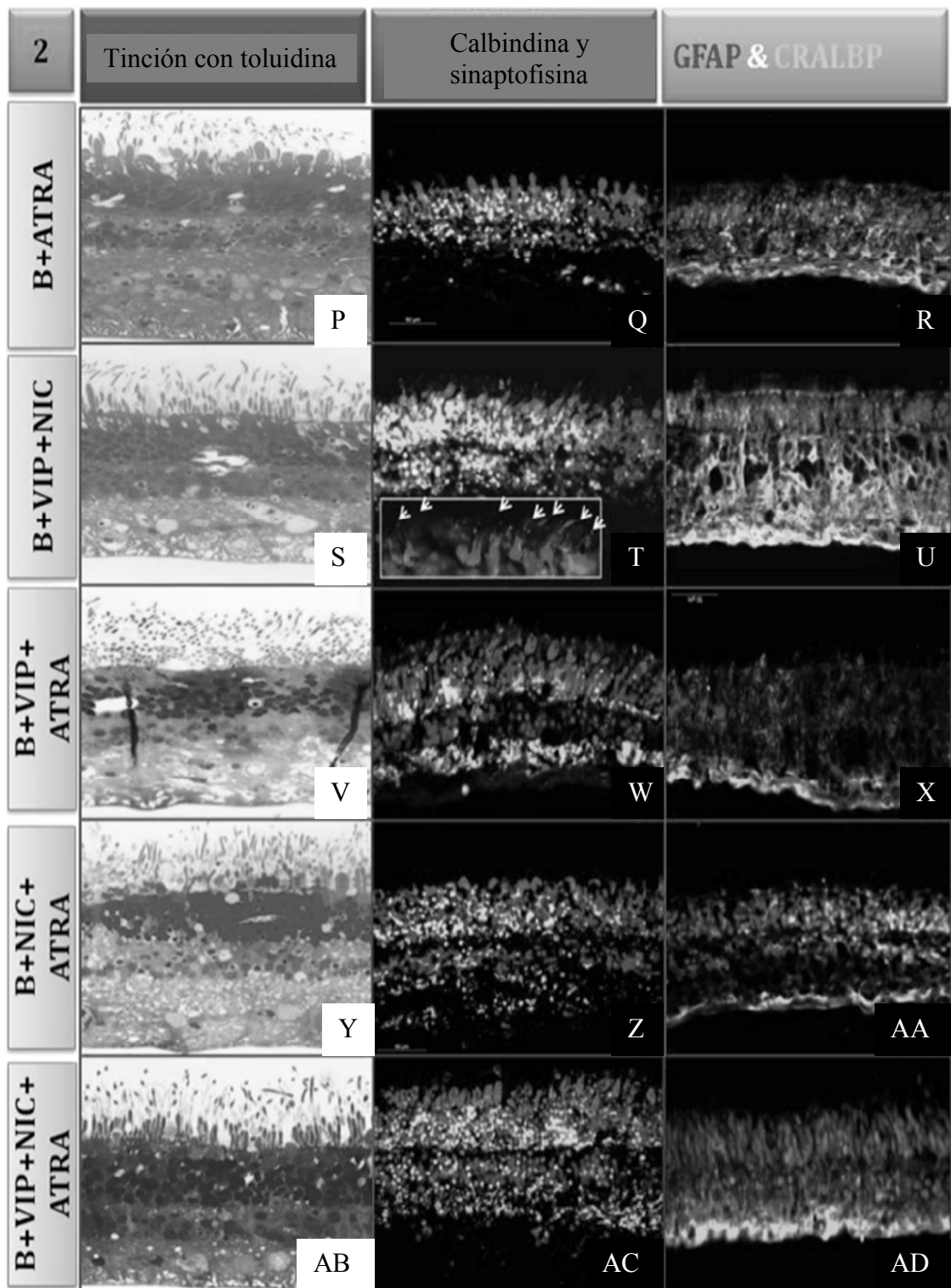


Fig. 4

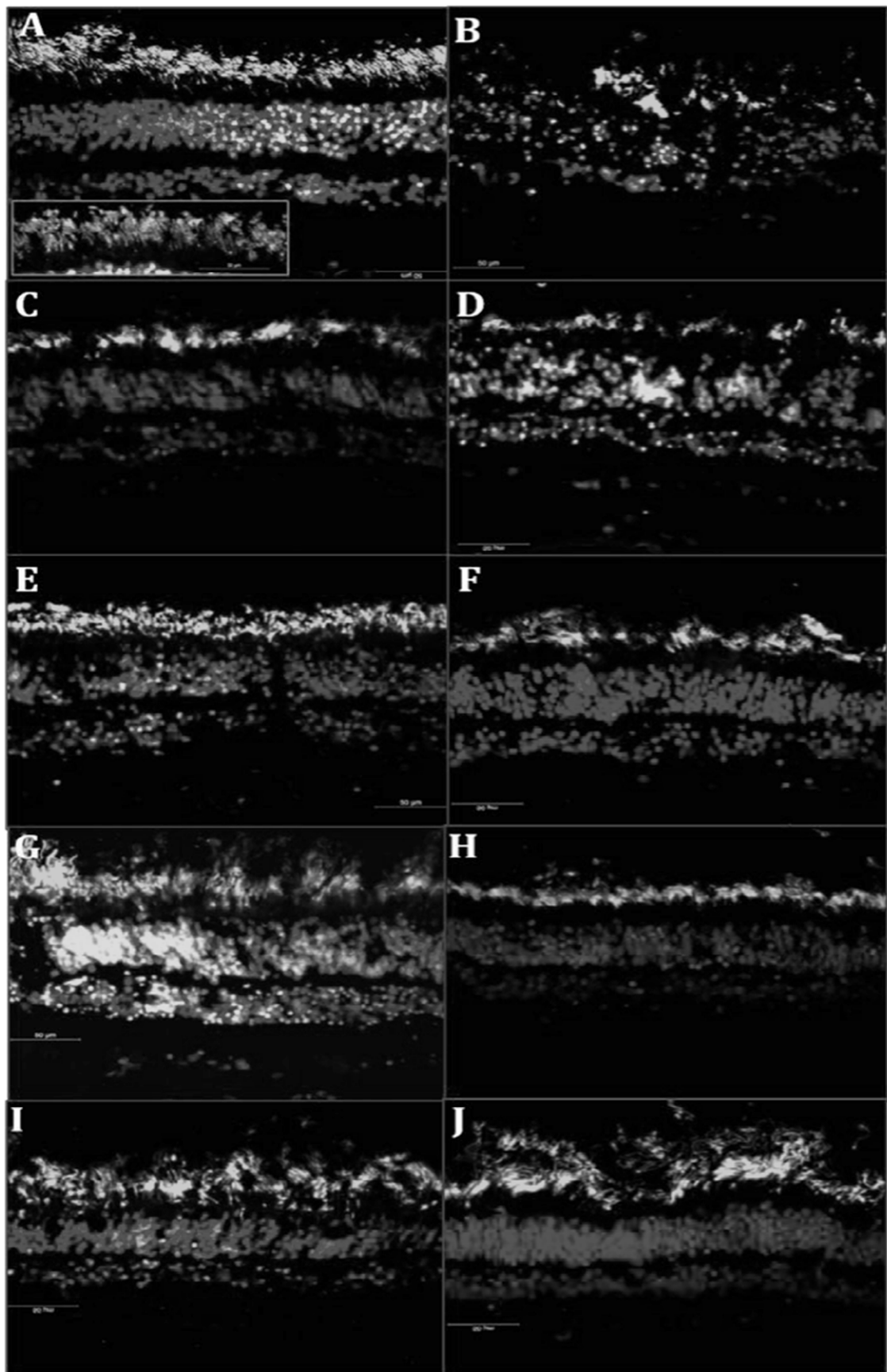
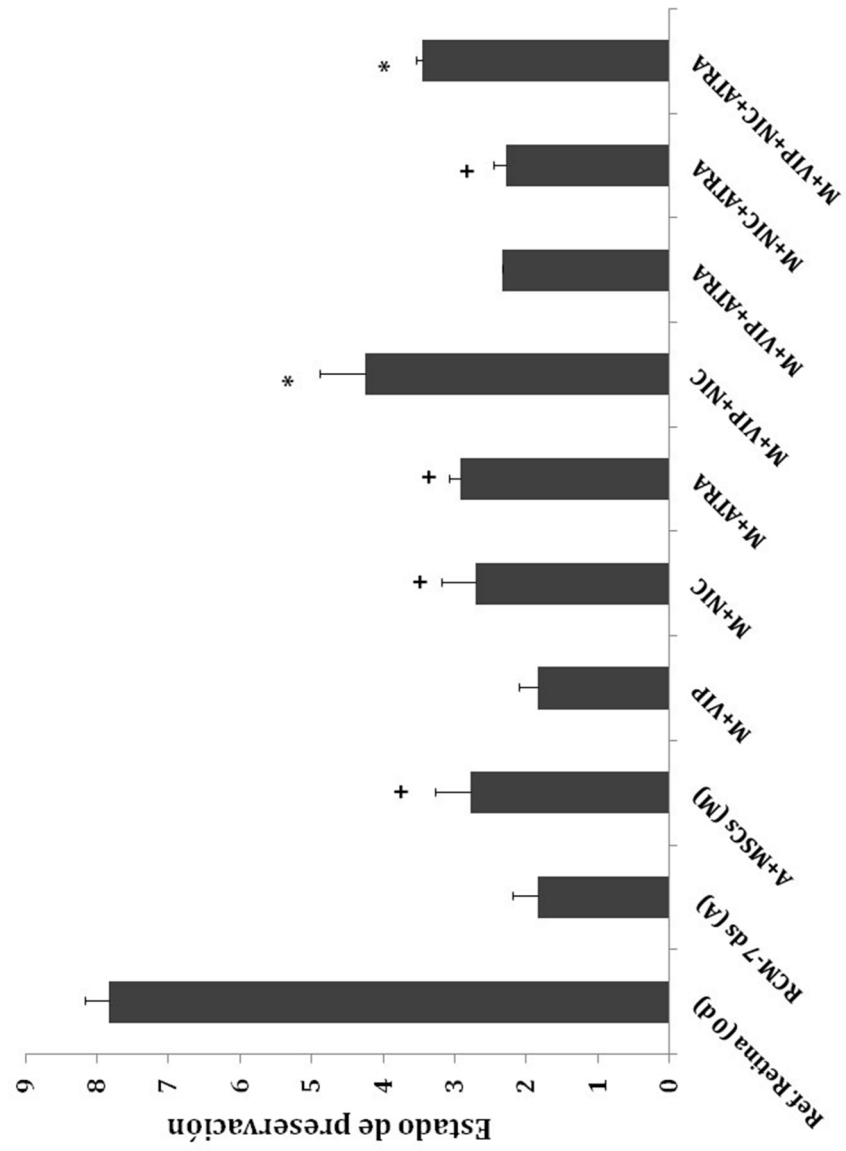


Fig. 5



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Valladolid
 <120> "COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES RETINIANAS DEGENERATIVAS"
 <130> ES2080.10
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn
 20 25