



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 946**

51 Int. Cl.:
A61K 35/34 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01924998 .6**
86 Fecha de presentación : **12.04.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1272204**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.01.2003**

54 Título: **Aumento y abultamiento de tejido blando y hueso utilizando células progenitoras derivadas de músculo, sus composiciones y tratamientos.**

30 Prioridad: **14.04.2000 US 549937**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2008

73 Titular/es: **University of Pittsburgh
200 Gardner Steel Conference Center
Pittsburgh, Pennsylvania 15260, US**

72 Inventor/es: **Chancellor, Michael B.;
Huard, Johnny;
Capelli, Christopher C. y
Qu, Zhuqing**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 288 946 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Aumento y abultamiento de tejido blando y hueso utilizando células progenitoras derivadas de músculo, sus composiciones y tratamientos.

La presente invención se refiere a células progenitoras (o madre) derivadas de músculo (MDC o MDSC) y composiciones de MDC y a su uso en el aumento de tejidos corporales, particularmente tejido blando y hueso. En particular, la presente invención se refiere a células progenitoras derivadas de músculo, que muestran supervivencia a largo plazo después de su introducción en tejidos blandos y hueso, métodos de aislamiento de MDC, y métodos de uso de composiciones que contienen MDC para el aumento de tejidos blandos y hueso de animales y seres humanos, incluyendo tejido epitelial, adiposo, nervioso, orgánico, muscular, de ligamentos y cartilaginoso. La invención se refiere asimismo a nuevos usos de células progenitoras derivadas de músculo para el tratamiento de trastornos cosméticos o funcionales, como enfermedades dermatológicas, reflujo gastro-esofágico, reflujo vesico-ureteral, incontinencia urinaria, incontinencia fecal, debilidad músculo-esquelética, insuficiencia cardíaca y lesión o debilidad asociada con el infarto de miocardio.

El aumento de tejido blando usando materiales sintéticos, como silicona o politetrafluoroetileno (PTFE) se conoce bien en la técnica. La patente de EE.UU. N° 5.876.447 de Arnett, describe el uso de implantes de silicona para cirugía plástica facial. Sin embargo, tales materiales sintéticos son extraños para el tejido hospedador, y producen una respuesta inmunológica que origina la encapsulación del implante y la retracción cicatricial de los tejidos circundantes. Por tanto, el implante puede producir problemas funcionales o estéticos adicionales.

También se ha descrito el aumento de tejidos blandos usando biopolímeros, como colágeno o ácido hialurónico. Por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.424.208 de Wallace *et al.* describe métodos de aumento de tejido blando utilizando material de implante de colágeno. Además, la patente de EE.UU. N° 4.965.353 de della Valle *et al.*, describe ésteres de ácido hialurónico que se pueden usar en cirugía cosmética. Sin embargo, estos biopolímeros son también extraños para el tejido hospedador, y producen una respuesta inmunológica que origina la reabsorción del material inyectado. En general, el uso de biopolímeros o materiales sintéticos ha sido totalmente insatisfactorio para el propósito de aumentar el tejido blando.

También se ha desarrollado el aumento de tejido blando usando composiciones basadas en células. La patente de EE.UU. N° 5.858.390 de Boss, Jr. describe el uso de fibroblastos dérmicos autólogos para el tratamiento de defectos dermatológicos cosméticos y estéticos. Aunque este tratamiento evita los problemas inherentes al implante o inyección de materiales sintéticos o biopolímeros, produce otras complicaciones. Debido a que los fibroblastos producen colágeno, las células pueden causar la rigidización y distorsión de los tejidos que rodean al sitio del implante.

También se ha descrito el uso de células grasas autólogas como sustancia de abultamiento inyectable (para revisión, véase K. Mak *et al.*, 1994, *Otolaryngol. Clin. North. Am.* **27**:211-22; American Society of Plastic and Reconstructive Surgery: Report on autologous fat transplantation by the ad hoc committee on new procedures, 1987, *Chicago: American Society of Plastic and Reconstructive Surgery*; A. Chaichir *et al.*, 1989, *Plast. Reconstr. Surg.* **84**:921-935; R.A. Ersek, 1991, *Plast. Reconstr. Surg.* **87**:219-228; H.W. Hori *et al.*, 1991, *Ann. Plast. Surg.* **26**:248-258; A. Nguyen *et al.*, 1990, *Plast. Reconstr. Surg.* **85**:378-389; J. Srtynski *et al.*, 1990, *Otolaryng. Head Neck Surg.* **102**:314-321. Sin embargo, el procedimiento de injerto de grasa proporciona sólo un aumento temporal, ya que la grasa inyectada se reabsorbe por el hospedador. Además, el injerto de grasa puede producir formación de nódulos y asimetría de tejidos.

Los mioblastos, precursores de fibras musculares, son células musculares mononucleares que se fusionan para formar miotubos multinucleares posmitóticos, que pueden proporcionar expresión y suministro a largo plazo de proteínas bioactivas (T.A. Partridge y K.E. Davies, 1995, *Brit. Med. Bulletin* **51**:123-137; J. Dhawan *et al.*, 1992, *Science* **254**:1509-12; A.D. Grinnell, 1994, *Myology* Ed 2, A.G. Engel y C.F. Armstrong, McGraw-Hill, Inc., 303-304; S. Jiao y J.A. Wolff, 1992, *Brain Research* **575**:143-7; H. Vandenburgh, 1996, *Human Gene Therapy* **7**:2195-2200).

Los mioblastos cultivados contienen una subpoblación de células que muestran algunas de las propiedades de autorrenovación de las células madre (A. Baroffio *et al.*, 1996, *Differentiation* **60**:47-57). Tales células empiezan a fusionarse para formar miotubos y no se dividen a menos que se cultiven separadamente (A. Baroffio *et al.*, *supra*). Los estudios de trasplante de mioblastos (véase más adelante), han demostrado que la mayoría de células transplantadas mueren rápidamente, mientras que una minoría sobrevive e interviene en la formación de músculo nuevo (J.R. Beuchamp *et al.*, 1999, *J. Cell Biol.* **144**:1113-1122). Esta minoría de células muestra un comportamiento distintivo, incluyendo el crecimiento lento en cultivo de tejido y el crecimiento rápido después del trasplante, sugiriendo que estas células pueden representar células madre de mioblastos (J.R. Beuchamp *et al.*, *supra*).

Los mioblastos se han usado como vehículos para terapia génica en el tratamiento de diversos trastornos relacionados o no con los músculos. Por ejemplo, el trasplante de mioblastos modificados genéticamente o sin modificar, se ha usado para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne (E. Gussoni *et al.*, 1992, *Nature*, **356**:435-8; J. Huard *et al.*, 1992, *Muscle & Nerve*, **15**:550-60; G. Karpati *et al.*, 1993, *Ann. Neurol.*, **34**:8-17; J:p. Tremblay *et al.*, 1993, *Cell Transplantation*, **2**:99-112; P.A. Moisset *et al.*, 1998, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**:94-9; P.A. Moisset *et al.*, 1998, *Gene Ther.* **5**:1340-46). Además, los mioblastos se han modificado mediante ingeniería genética para producir insulina para el tratamiento de la diabetes de tipo 1 (L. Gros *et al.*, 1999, *Hum. Gen. Ther.* **10**:1207-17); factor IX para el tratamiento de la hemofilia B (M. Roman *et al.*, 1992, *Somat. Cell Mol. Genet.* **18**:247-58; S.N. Yao

et al., 1994, *Gen. Ther.* **1**:99-107; J.M. Wang *et al.*, 1997, *Blood* **90**:1075-82; G. Hortelano *et al.*, 1999, *Hum. Gene Ther.* **10**:1281-8); adenosina-desaminasa para el tratamiento del síndrome de la deficiencia de adenosina-desaminasa (C.M. Lynch *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**:1138-42); eritropoyetina para el tratamiento de la anemia crónica (E. Regulier *et al.*, 1998, *Gene Ther.* **5**:1014-22; B. Dalle *et al.*, 1999, *Gene Ther.* **6**:157-61), y hormona de crecimiento humana para el tratamiento del retraso del crecimiento (K. Anwer *et al.*, 1998, *Hum. Gene Ther.* **9**:659-70).

Los mioblastos se han usado también para tratar lesiones o enfermedades del tejido muscular, según se describe en la patente de EE.UU. N° 5.130.141, de Law *et al.*, patente de EE.UU. N° 5.538.722 de Blau *et al.*, y solicitud de EE.UU. de N° de serie 09/302.896 presentada el 30 de abril de 1999, por Chancellor *et al.* Además, se ha empleado el trasplante de mioblastos para la reparación de la disfunción de miocardio (C.E. Murry *et al.*, 1996, *J. Clin. Invest.* **98**:2512-23; B.Z. Atkins *et al.*, 1999, *Ann. Thorac. Surg.* **67**:124-129; B.X. Atkins *et al.*, 1999, *J. Heart Lung Transplant*, **18**:1173-80).

A pesar de lo anterior, en la mayoría de los casos, los tratamientos derivados de mioblastos primarios se han asociado con tasas de supervivencia bajas de las células después del trasplante, debido a la migración y/o fagocitosis. Para evitar este problema, la patente de EE.UU. 5.667.778 de Atala, describe el uso de mioblastos en suspensión en un polímero líquido, como alginato. La solución polímera actúa como matriz para evitar que los mioblastos migren y/o sufran fagocitosis después de la inyección. Sin embargo, la solución polímera presenta los mismos problemas que los biopolímeros analizados anteriormente. Además, la patente de Atala está limitada a los usos de mioblastos sólo en tejido muscular, pero no en otros tejidos.

Por tanto, existe la necesidad de otros materiales de aumento de tejido blando diferentes, que sean de larga duración, compatibles con un amplio espectro de tejidos hospedadores, y que causen una inflamación, retracción cicatricial y/o rigidez mínimas de los tejidos que rodean el sitio del implante. Consecuentemente, se proporcionan composiciones que contienen células progenitoras derivadas de músculo de la presente invención, como materiales nuevos y mejorados para aumentar tejidos blandos. Además, se proporcionan métodos de producción de composiciones de células progenitoras derivadas de músculo que muestran una supervivencia a largo plazo después del trasplante, y métodos de utilización de MDC y composiciones que contienen MDC, para tratar diversos defectos estéticos y/o funcionales, incluyendo, por ejemplo, trastornos o lesiones dermatológicas y debilidad, lesión, enfermedad o disfunción muscular.

Es destacable que los intentos previos de usar mioblastos para el aumento de tejido blando no muscular fueron infructuosos (patente de EE.UU. N° 5.667.778 de Atala). Por tanto, los hallazgos aquí descritos son inesperados, ya que muestran que las células progenitoras derivadas del músculo según la presente invención, se pueden transplantar a tejidos blandos musculares y no musculares, incluyendo tejido epitelial, y presentan supervivencia a largo plazo. Como resultado, se pueden usar MDC y composiciones que comprenden MDC como un material de aumento general para el aumento de tejido blando muscular o no muscular, así como para producción de hueso. Además, debido a que las células progenitoras derivadas de músculo y las composiciones de la presente invención se pueden derivar de fuentes autólogas, conllevan un riesgo reducido de complicaciones inmunológicas en el hospedador, incluyendo la reabsorción de los materiales de aumento, y la inflamación y/o retracción cicatricial de los tejidos que rodean al sitio del implante.

Aunque las células madre mesenquimatosas se pueden encontrar en diversos tejidos conectivos del cuerpo, incluyendo músculo, hueso, cartílago, etc. (H.E. Young *et al.*, 1993, *In Vitro Cell Dev. Biol.* **29A**:723-736; H.E. Young *et al.*, 1995, *Dev. Dynam.* **202**:137-144), el término mesenquimatoso se ha usado históricamente para designar una clase de células madre purificadas de médula ósea, y no de músculo. Por tanto, las células madre mesenquimatosas se distinguen de las células progenitoras derivadas del músculo de la presente invención. Además, las células mesenquimatosas no expresan el marcador celular CD34 (M.F. Pittenger *et al.*, 1999, *Science* **284**:143-147), que se expresa por las células progenitoras derivadas del músculo descritas aquí.

Un problema importante para terapia celular es la escasa supervivencia y extensión limitada de las células inyectadas, así como el rechazo inmunológico de los receptores frente a las células donadoras (Y. Fan *et al.*, 1996, *Muscle & Nerve*, **19**:853-860). Las células madre derivadas del músculo (MDSC o MDC), según se describen en la presente invención, muestran la capacidad de autorrenovación elevada y proliferación a largo plazo, cuando se usan en terapias de trasplante celular para aumentar o abultar el tejido blando y el hueso. Tanto las células autólogas como alogénicas de esta invención pueden proporcionar terapias celulares efectivas para las alteraciones y enfermedades descritas. Además, tales células pueden mejorar la eficiencia de la terapia celular en músculos gravemente enfermos.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona el uso de una composición que comprende (i) células progenitoras derivadas de músculo, aisladas, que expresan desmina (MDC) con supervivencia a largo plazo *in situ*, o una de sus poblaciones clonales, y (ii) un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para uso en el aumento o abultamiento del tejido muscular esofágico o gastroesofágico en un mamífero, en el que la composición está presente en una cantidad suficiente para aumentar o abultar el tejido muscular esofágico o gastroesofágico.

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona el uso de una composición que comprende (i) células progenitoras derivadas del músculo (MDC) aisladas, que expresan desmina con supervivencia a largo plazo *in situ*, o

una de sus poblaciones clonales, y (ii) un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para uso en el aumento o abultamiento del tejido muscular del esfínter en un mamífero, en el que la composición está presente en una cantidad suficiente para aumentar o abultar el tejido muscular del esfínter.

5 En un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de una composición que comprende (i) células progenitoras derivadas del músculo (MDC) aisladas, que expresan desmina, con supervivencia a largo plazo *in situ*, o una de sus poblaciones clonales, y (ii) un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para uso en el aumento o abultamiento de tejido seleccionado de tejido muscular de vejiga, ureteral, o uretral en un mamífero, en el que la composición está presente en una cantidad suficiente para aumentar o
10 abultar el tejido de la vejiga, ureteral o uretral.

Según un cuarto aspecto de la invención, se proporciona el uso de una composición que comprende (i) células progenitoras derivadas del músculo (MDC) aisladas, que expresan desmina, con supervivencia a largo plazo *in situ*, o una de sus poblaciones clonales, y (ii) un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable, para la fabricación
15 de un medicamento para uso en el aumento o abultamiento de un defecto cosmético o estético de un tejido blando en un mamífero, en el que la composición está presente en una cantidad suficiente para aumentar o abultar el defecto cosmético o estético.

Según un quinto aspecto de la invención, se proporciona el uso de una composición que comprende (i) células progenitoras derivadas del músculo (MDC) aisladas, que expresan desmina, con supervivencia a largo plazo *in situ*, o una de sus poblaciones clonales, y (ii) un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable, para la fabricación
20 de un medicamento para uso en el aumento o abultamiento de tejido que comprende uno o más de: una depresión cutánea, herida, fisura u orificio en un mamífero, en el que la composición está presente en una cantidad suficiente para abultar o hinchar la depresión cutánea, herida, fisura o apertura.

Según un sexto aspecto de la invención, se proporciona el uso de una composición que comprende (i) células progenitoras derivadas del músculo (MDC) aisladas, que expresan desmina, con supervivencia a largo plazo *in situ*, o una de sus poblaciones clonales, y (ii) un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable, para la fabricación
25 de un medicamento para uso en el aumento o abultamiento de tejido seleccionado de tejido muscular en un mamífero, en el que la composición está presente en una cantidad suficiente para aumentar o abultar el tejido muscular; seleccionándose dicho tejido muscular de (a) tejido digestivo seleccionado del grupo formado por tejido estomacal, intestinal, lingual, esofágico, pilórico y anal; (b) tejido reproductivo seleccionado del grupo formado por tejido uterino, vaginal, clitorídeo, de la trompa de Falopio, cervical, penil y tejido del conducto deferente; (c) tejido urológico seleccionado del grupo formado por tejido renal, vesical, uretral, ureteral y tejido del esfínter; o (d) tejido respiratorio seleccionado
30 del grupo formado por tejido traqueal y pulmonar.

En un séptimo aspecto de la invención, se proporciona el uso de una composición que comprende (i) células progenitoras derivadas de músculo, aisladas, que expresan desmina (MDC), que tienen supervivencia a largo plazo *in situ*, o una de sus poblaciones clonales, y (ii) un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable, para la
40 fabricación de un medicamento para uso en el aumento o abultamiento de (a) tejido blando no muscular, o (b) tejido blando no muscular ni óseo en un mamífero, en el que la composición está presente en una cantidad suficiente para aumentar o abultar (a) el tejido blando no muscular, o (b) el tejido blando no muscular ni óseo.

En un octavo aspecto de la invención, se proporciona el uso de una composición que comprende (i) células progenitoras derivadas de músculo, aisladas, que expresan desmina (MDC), que tienen supervivencia a largo plazo *in situ*, o una de sus poblaciones clonales, y (ii) un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable, para la fabricación
45 de un medicamento para uso en el restablecimiento o mejora de la contractilidad del músculo liso, en donde el músculo liso es músculo liso gastrointestinal, seleccionado del grupo formado por músculo liso esofágico, músculo liso estomacal, músculo liso pilórico y músculo liso intestinal, y, donde además la composición está presente en una cantidad suficiente para restablecer o mejorar la contractilidad del músculo liso.
50

Las realizaciones preferidas de la invención en cualquiera de sus aspectos diversos, son según se describen más adelante o según se definen en las reivindicaciones dependientes.

55 Las Figuras 1A-1F ilustran los resultados del aumento de tejido blando utilizando inyecciones de composiciones de MDC, comparados con la inyección de colágeno bovino convencional. Para las Figuras 1A-1F se inyectaron, bien MDC (Figuras 1D-1F) o colágeno (1A-1C) en la piel o la pared abdominal. El área de inyección era la superficie de contacto de la dermis y el tejido conectivo subcutáneo que es la piel. Las Figuras 1A-1F muestran la tinción con Tricromo con un aumento de 40x después de la inyección, bien de colágeno o MDC, en la piel. A los 5 días, 2 semanas,
60 o 4 semanas después de la inyección, se obtuvieron muestras de tejido y se prepararon para el análisis. Las Figuras 1A y 1D muestran los resultados de la inyección en la piel de MDC frente a colágeno, a los 5 días después de la inyección; las Figuras 1B y 1E muestran los resultados a las 2 semanas después de la inyección; y las Figuras 1C y 1F muestran los resultados a las 4 semanas después de la inyección. Las cabezas de flecha en las Figuras 1D-1F indican la presencia de MDC en las áreas inyectadas (color rosa intenso). Las Figuras 1A-1F demuestran que, después de la
65 inyección en el espacio subcutáneo, MDC persistía y mantenía/aumentaba el tejido subcutáneo de la pared abdominal durante como máximo al menos 4 semanas, mientras que el colágeno no se mantenía alrededor de 2 semanas después de la inyección en la piel (Ejemplo 3).

Las Figuras 2A y 2B ilustran los resultados del aumento de tejido blando esofágico inferior (Figura 2A) y de esfínter anal (2B), utilizando inyecciones de composiciones de MDC. Las inyecciones se realizaron en la unión gastroesofágica o en el esfínter anal. El día 3 después de la inyección, se obtuvieron muestras de tejido y se prepararon para el análisis. Las MDC se indican mediante tinción con β -galactosidasa. La Figura 2A muestra los tejidos inyectados a un aumento de 100 X; la Figura 2B muestra los tejidos inyectados a un aumento de 40 X. Las Figuras 2A y 2B demuestran que las inyecciones de MDC mantenían el aumento de tejido blando del esfínter esofágico inferior y del esfínter anal durante, como máximo, 3 días después de la inyección.

Las Figuras 3A y 3B ilustran los resultados del aumento de tejido blando de la unión vesico-ureteral, utilizando inyecciones de MDC. Las inyecciones se realizaron en la unión vesico-ureteral. El día 3 después de la inyección, se obtuvieron muestras de tejido y se prepararon para el análisis. Las MDC se indican por tinción de β -galactosidasa, según se observaba cerca de la flecha. La Figura 3A muestra los tejidos inyectados con un aumento pequeño (40 X); La Figura 3B muestra los tejidos inyectados con un aumento elevado (100 X). Las Figuras 3A y 3B demuestran que las inyecciones de MDC mantenían el aumento de tejido blando de la unión vesico-ureteral durante, como máximo, 3 días después de la inyección.

Las Figuras 4A y 4B ilustran el tratamiento de criolesión de la vesícula utilizando inyecciones de tejido blando de composiciones de MDC. En el día 30 después de la inyección, se obtuvieron muestras de tejido y se prepararon para la tinción. Las flechas indican el sitio de criolesión e inyección de MDC. El aumento es 100 X. La Figura 4A muestra el tejido de vejiga criolesionado sin tratar. La Figura 4B muestra el tejido vesical criolesionado tratado con inyecciones de MDC; las MDC se indican mediante tinción con β -galactosidasa. Las Figuras 4A y 4B demuestran que las inyecciones de MDC mantenían el aumento de tejido blando del tejido vesical criolesionado durante, como máximo, 30 días después de la inyección.

Las Figuras 5A-5I ilustran la diferenciación celular de MDC, después de la inyección en tejido vesical criolesionado. Las inyecciones se realizaron en la pared de la vejiga en el sitio de la criolesión, y las muestras de tejido se obtuvieron y prepararon para análisis a los 5, 35 o 70 días después de la inyección. Las MDC inyectadas se muestran mediante tinción con β -galactosidasa, y las MDC indiferenciadas se muestran mediante tinción con actina de músculo liso- α (actina SM α). Las MDC que se han diferenciado en miotubos o miofibras se muestran mediante tinción rápida de la cadena pesada de miosina (MyHC rápida). Las flechas muestran la MyHC rápida. El día 5 después de la inyección, se observan múltiples MDC en el área de inyección, y sólo algunas MDC se han diferenciado en miotubos, como se muestra por los niveles elevados de tinción con β -galactosidasa (Figura 5A) y actina α -SM (Figura 5D), y los niveles relativamente bajos de tinción rápida MyHC (Figura 5G). El día 35 después de la inyección, se observan múltiples MDC en el área de inyección, y muchas se han diferenciado en miotubos, como se muestra por los elevados niveles de tinción con β -galactosidasa (Figura 5B), la reducción de tinción con actina SM- α (Figura 5E) y el incremento de tinción rápida con MyHC (Figura 5H). El día 70 después de la inyección, se observan MDC en el área de inyección, y casi todas las MDC se han diferenciado en miofibras, como se muestra por los elevados niveles de β -galactosidasa (Figura 5C), la reducción de tinción con actina α -SM (Figura 5F), y los elevados niveles de tinción rápida con MyHC (Figura 5I). El aumento es 200 X. Las Figuras 5A-5I demuestran que las MDC permanecen viables y empiezan la diferenciación durante, como máximo, 70 días después de la inyección, en tejido blando vesical.

Las Figuras 6A-6D ilustran la reinervación de las MDC inyectadas en el tejido blando de la vejiga urinaria. La innervación se indica por la tinción con acetilcolina (Ach), que muestra la unión neuromuscular. El día 3 después de la inyección se observan pocas innervaciones, como se muestra por tinción con Ach (Figura 6A). El día 15 después de la inyección se observan varias innervaciones (Figura 6B). El día 30 después de la inyección se observan más innervaciones (Figura 6C). 6 meses después de la inyección, se observan numerosas innervaciones a bajo aumento (100 X) (Figura 6D). Las Figuras 6A-6C muestran el tejido inyectado a aumento elevado (200 X). Las Figuras 6A-6D demuestran que las MDC inducen la innervación durante, como máximo, 6 meses después de la inyección en tejidos de vejiga criodañados.

Las Figuras 7A y 7B ilustran los resultados del aumento de tejido blando de músculo liso miocárdico, utilizando inyecciones de composiciones de MDC. Las inyecciones se realizaron en la pared ventricular, y las muestras de tejido se prepararon 3 días después de la inyección. Las MDC se indican mediante tinción con β -galactosidasa. La Figura 7A muestra tejido inyectado a aumento bajo (100 X); La Figura 7B muestra tejido inyectado a aumento elevado (200 X).

Las Figuras 8A y 8B ilustran los resultados de inyecciones de MDC en tejido hepático. Las inyecciones se realizaron en tejido hepático en el lóbulo inferior izquierdo, y se prepararon muestras de tejido 4 días después de la inyección. Las MDC se indican mediante tinción con β -galactosidasa. La Figura 8A muestra bajo aumento (100 X); La Figura 8B muestra aumento elevado (200 X).

Las Figuras 9A y 9B ilustran los resultados de inyecciones de MDC en tejido de bazo. Las inyecciones se realizaron en tejido de bazo en el alargamiento interno, y las muestras de tejido se prepararon 4 días después de la inyección. Las MDC se indican mediante tinción con β -galactosidasa. La Figura 9A muestra los tejidos inyectados a aumento bajo (100 X); La Figura 9B muestra los tejidos inyectados a aumento elevado (200 X).

Las Figuras 10A y 10B ilustran los resultados inyecciones de MDC en tejido de médula espinal. Las inyecciones se realizaron en el tejido de la médula espinal, y las muestras de tejido se prepararon 4 días después de la inyección. Las MDC se indican mediante tinción con β -galactosidasa. La Figura 10A muestra los tejidos inyectados a aumento

bajo (100 X); La Figura 10B muestra los tejidos inyectados a aumento elevado (200 X). Las Figuras 7A-7B, 8A-8B, 9A-9B, y 10A-10B demuestran que las MDC permanecen viables después de la inyección en una variedad de tipos de tejidos, sin dañar los tejidos hospedadores.

5 Las Figuras 11A-11L ilustran el análisis inmunohistoquímico de poblaciones celulares PP1-4 y PP6 de ratones *mdx*, mostrando la expresión de marcadores celulares, incluyendo desmina, MyoD y miogenina (marcadores específicos para linajes miogénicos), M-caderina (marcador específico de las células satélite), Bcl-2 (marcador de miogénesis temprano), CD34 (marcador de células hematopoyéticas o estromales). Las Figuras 11A-11L demuestran que las poblaciones celulares PP1-4 y PP6 muestran porcentajes comparables de células que expresan desmina (Figuras 11A y 11G), MyoD (Figuras 11E y 11K), y miogenina (Figuras 11F y 11L), mientras que la población PP6 muestra un porcentaje inferior de células que expresan M-caderina (Figuras 11D y 11J), pero un porcentaje mayor de células que expresan Bcl-2 (Figuras 11C y 11I) y CD34 (Figuras 11B y 11H), comparado con la población PP1-4.

15 Las Figuras 12A-12I ilustran la localización conjunta intracelular de la tinción CD34 o Bcl-2 con tinción de desmina en células musculares y células vasculares endoteliales de ratón. La Figura 12A muestra células musculares de ratón normales (véase flecha) y células endoteliales vasculares (véase cabeza de flecha), teñidas con anticuerpos anti-CD34 y visualizadas con microscopía de fluorescencia. La Figura 12B muestra las mismas células, teñidas conjuntamente con desmina y anticuerpos de colágeno tipo IV. La Figura 12C muestra las mismas células teñidas conjuntamente con Hoechst, para mostrar los núcleos. La Figura 12D muestra una composición de las células teñidas conjuntamente para CD34, desmina, colágeno tipo IV y Hoechst. La Figura 12E muestra células musculares de ratón normales (véase flecha), teñidas con anticuerpos anti-Bcl-2 y visualizadas mediante microscopía de fluorescencia. La Figura 12F muestra las mismas células teñidas conjuntamente con desmina y anticuerpos de colágeno tipo IV. La Figura 12G muestra las mismas células teñidas conjuntamente con Hoechst para mostrar los núcleos. La Figura 12H muestra una composición de las células teñidas conjuntamente con CD34, desmina, colágeno tipo IV y Hoechst. La Figura 12I muestra células satélite teñidas con anticuerpos anti-M-caderina (véase flecha). Las células se visualizaron a un aumento de 40 X. Las Figuras 12A-12D demuestran la localización conjunta de CD34 y desmina, mientras que las Figuras 12E-12H demuestran la localización conjunta de Bcl-2 y desmina.

30 Las Figuras 13A-13E ilustran los cambios morfológicos y la expresión de osteocalcina, resultante de la exposición de células mc13 a rhBMP-2. Las células mc13 se incubaron en medios de crecimiento con o sin rhBMP-2 durante 6 días. La Figura 13A muestra las células cultivadas hasta >50% de confluencia celular, en ausencia de rhBMP-2. La Figura 13B muestra las células cultivadas hasta >50% de confluencia celular, en presencia de 200 ng/ml de rhBMP-2. La Figura 13C muestra las células cultivadas hasta >90% de confluencia celular, en ausencia de rhBMP-2. La Figura 13D muestra células cultivadas hasta >90% de confluencia, en presencia de 200 ng/ml de rhBMP-2. La Figura 13E muestra células teñidas para expresión de osteocalcina (marcador de osteoblastos; véanse flechas). Las células se observaron a un aumento de 10 X. Las Figuras 13A-13E demuestran que las células mc13 son capaces de diferenciarse en osteoblastos después de la exposición a rhBMP-2.

40 Las Figuras 14A-14D ilustran los efectos sobre el porcentaje de células mc13 que expresan desmina y fosfatasa alcalina como respuesta al tratamiento con rhBMP-2. La Figura 14B muestra una vista de contraste de fase de las mismas células. La Figura 14C muestra los niveles de tinción con desmina en células mc13, después de 6 días de incubación en medios de crecimiento con o sin 200 ng/ml de rhBMP-2. La Figura 14D muestra los niveles de tinción con fosfatasa alcalina en células PP1-4 y células mc13, después de 6 días de incubación en medios de crecimiento con o sin 200 ng/ml de rhBMP-2. * indica un resultado estadísticamente significativo (test t de student). La Figura 14C demuestra que un número decreciente de células mc13 expresan desmina en presencia de rhBMP-2, mientras que la Figura 14D demuestra que un número creciente de células mc13 expresa fosfatasa alcalina en presencia de rhBMP-2, sugiriendo la reducción de las características miogénicas y el incremento de las características osteogénicas de las células, en presencia de rhBMP-2.

50 Las Figuras 15A-15G ilustran la diferenciación *in vivo* de células mc13 en linajes miogénicos y osteogénicos. Las células mc13 se transfectaron de forma estable con una construcción que contenía LacZ y el gen de distrofina, y se introdujeron mediante inyección intramuscular o intravenosa en los cuartos traseros de las extremidades de ratones *mdx*. Después de 15 días, los animales fueron sacrificados y se aisló la musculatura del cuarto trasero de la extremidad para histología. La Figura 15A muestra células mc13 en el sitio de la inyección intramuscular, teñido para LacZ. La Figura 15B muestra las mismas células teñidas conjuntamente para distrofina. La Figura 15C muestra células mc13 en la región de la inyección intravenosa, teñidas para LacZ. La Figura 15D muestra las mismas células, teñidas conjuntamente para distrofina. En un experimento separado, las células mc13 se transdujeron con adBMP-2, y 0,5-1,0 x 10⁶ células se inyectaron en los cuartos traseros de las extremidades de ratones SCID. Después de 14 días, los animales fueron sacrificados, y se analizaron los tejidos musculares. La Figura 15E muestra el análisis radiográfico del cuarto trasero de la extremidad para determinar la formación de hueso. La Figura 15F muestra las células derivadas del cuarto trasero de la extremidad, teñidas para LacZ. La Figura 15G muestra las células teñidas para distrofina. Las Figuras 15A-15D demuestran que las células mc13 pueden recuperar la expresión de distrofina a través de suministro intramuscular o intravenoso. Las Figuras 15E-15G demuestran que las células mc13 están implicadas en la formación ectópica de hueso. Las células se observaron con los siguientes aumentos: 40 X (Figuras 15A-15D), 10 X (Figuras 15F-15G).

65 Las Figuras 16A-16E ilustran el incremento de cicatrización ósea por células musculares primarias que producen rhBMP-2. Se creó un defecto de 5 mm en el cráneo en ratones SCID hembra, usando un trépano dental, y el defecto se

rellenó con una esponja de colágeno sembrada con células mc13, con o sin adBMP-2. Los animales fueron sacrificados a los 14 días, se inspeccionaron y analizaron microscópicamente para indicaciones de cicatrización ósea. La Figura 16A muestra un cráneo tratado con células mc13 sin adBMP-2. La Figura 16B muestra un cráneo tratado con células mc13 transducidas con adBMP-2. La Figura 16 C muestra una muestra histológica del cráneo tratado con células mc13 sin adBMP-2, analizada mediante tinción de von Kossa. La Figura 16D presenta una muestra histológica del cráneo tratado con células mc13 transducidas con adBMP-2, analizada mediante tinción de von Kossa. La Figura 16E presenta una muestra histológica del cráneo tratado con células mc13 transducidas con adBMP-2, analizada mediante hibridación con una sonda específica del cromosoma Y, para identificar las células inyectadas (fluorescencia verde mostrada mediante flechas), y teñida con bromuro de etidio para identificar los núcleos (indicados mediante fluorescencia roja). Las Figuras 16A-16E demuestran que las células mc13 que expresan rhBMP-2, pueden contribuir a la cicatrización de defectos óseos.

Las Figuras 17A-17F muestran injertos prendidos resultantes de la inyección de MDSC, bien de la preplaca tardía (LP), (es decir, MDSC [LP] - PP5 o PP6), o de la preplaca temprana (EP), (es decir, MDSC [EP]) - PP1-2). Según se muestra en las Figs. 17C y 17D, se observaba un gran injerto con un número significativo de miofibras positivas para distrofina (distrofina+) en el músculo de *mdx* inyectado con MDSC [LP], alrededor de diez días después de la inyección (Ejemplo 10). Una comparación del músculo inyectado con MDSC [LP] con el músculo inyectado con MDSC [EP] (Figs. 17A y 17B), muestra que el injerto prendido de MDSC [LP] contiene muchas más miofibras pequeñas, sugiriendo por tanto que las células a las que se inyectaba MDSC [LP] poseían una capacidad proliferativa elevada *in vivo*. En ambos músculos, se inyectó el mismo número de células de cada tipo. El número de miofibras distrofina+ en músculo inyectado con MDSC [LP] era aproximadamente 5 veces el encontrado en músculo inyectado con MDSC [EP] (2.798 +/- 1.114, n=4 en mdsc, frente a 430 +/- 148, n=6 en EP; Promedio +/- SD).

Cabe destacar que, cuando se usaba MDSC [LP], estaban presentes muchas miofibras distrofina+ en el músculo, alrededor de 30 días después de la inyección (Figs. 17E y 17F). Una comparación de la Fig. 17C con Fig. 17E indica que ambos injertos prendidos tenían áreas similares; sin embargo, para el músculo del día 30 (Fig. 17E), sólo se inyectaba la mitad de células que se inyectaban para el músculo del día 10 (Fig. 17C). Además, las fibras musculares eran mucho más grandes en el injerto del día 30 que en el injerto del día 10, indicando por tanto que la mayoría de las miofibras distrofina+ que se habían formado alrededor de 10 días después de la inyección, sobrevivían todavía 20 días más tarde. Como contraste, se observaba una reducción espectacular en el número de miofibras distrofina+ en músculo inyectado con MDSC [EP] alrededor de 30 días después de la inyección, produciendo una diferencia superior a diez veces en las miofibras distrofina+ entre el grupo MDSC [EP] (134 +/- 42, n=3) y el grupo MDSC [LP] (2.000 +/- 658, n=3).

Las Figuras 18A y 18B demuestran la viabilidad de emplear MDSC fetal humana en los métodos según la presente invención. Se demostró que tales células eran inmunotolerantes y se mantenían en ratones SCID durante >2 semanas. Se inyectaron 1×10^5 MDSC [LP] fetales humanas que contenían el gen LacZ en un vector de expresión, en la pared vesical de ratones SCID. Se observó tinción de LacZ el día 5 (Fig. 18A) y el día 15 (Fig. 18B) después de la inyección, demostrando por tanto una supervivencia excelente de MDSC.

Las Figuras 19A y 19B muestran tinción con desmina de animales normales y animales a los que se les inyectó MDSC [LP]. 3×10^5 MDSC de ratones normales se inyectaron intravenosamente en ratones normales no inmunodeprimidos. Dos semanas más tarde, se recogió el timo de los ratones inyectados y se tiñó para desmina específica de músculo esquelético. La Fig. 19 A muestra que el testigo de timo normal se tiñe negativamente para desmina. Sin embargo, 2 semanas después de la inyección periférica de MDSC de otro animal, el timo es positivo para tinción con desmina (Fig. 19B).

Las Figuras 20A y 20B ilustran los resultados de la inyección de composiciones de MDSC en el disco intervertebral de conejos. Las MDSC contenían vectores de expresión con LacZ para expresión de β -galactosidasa, según se describió. Las inyecciones de MDSC obtenidas de ratones se introdujeron en el nivel T6 del disco intervertebral del conejo. El día 10 después de la inyección, se obtuvieron muestras y se prepararon para el análisis. La presencia de MDSC inyectadas se indicaba mediante tinción con β -galactosidasa. La Figura 20A muestra tejidos inyectados a 100 X (aumento elevado); la Figura 20B muestra tejidos inyectados a 40 X (aumento bajo). Los resultados esquematizados en las Figs. 20A y 20B demuestran que las inyecciones de MDSC se mantienen en el disco intervertebral durante al menos 10 días, y pueden aumentar el tamaño y función de los discos normales y disfuncionales.

Células y composiciones derivadas de músculo

La presente invención proporciona MDC formadas por células progenitoras tempranas (también denominadas aquí células progenitoras derivadas de músculo o células madre derivadas de músculo), que muestran tasas de supervivencia a largo plazo elevadas después del trasplante en tejidos corporales, preferiblemente tejidos blandos. Para obtener las MDC de esta invención, se obtiene un explante de músculo, preferiblemente de músculo esquelético, de un donante animal, preferiblemente de un mamífero, incluyendo seres humanos. Este explante sirve como sincitio estructural y funcional, incluyendo "restos" de células precursoras musculares (T.A. Partridge *et al.*, 1978, *Nature* **73**:306-8; B.H. Lipton *et al.*, 1979, *Science* **205**:1292-4). Las MDC usadas para trasplante o como terapia celular, según la presente invención, se pueden obtener de donantes autólogos o no autólogos (es decir, alogénicos), incluyendo células donadoras humanas adultas, fetales, embrionarias o placentarias.

Las células aisladas de tejido muscular primario contienen una mezcla de fibroblastos, mioblastos, adipocitos, células hematopoyéticas y células progenitoras derivadas de músculo. Las células progenitoras de una población derivada del músculo se pueden enriquecer usando características de adherencia diferenciales de células musculares primarias sobre matraces de tejido recubiertos de colágeno, según se describe en la solicitud de patente de EE.UU. de N° de serie 09/302.896 de Chancellor *et al.*, Las células que son lentas para adherirse, tienden a ser morfológicamente redondas, expresan concentraciones de desmina elevadas, y tienen la capacidad de fusionarse y de diferenciarse en miotubos multinucleares (EE.UU., N° de serie 09/302.896 de Chancellor *et al.*). Se demostró que una subpoblación de estas células respondía a la proteína morfogénica ósea humana recombinante tipo 2 (rhBMP-2) *in vitro*, expresando concentraciones incrementadas de fosfatasa alcalina, 3',5'-cAMP dependiente de hormona paratiroidea, y osteocalcina, indicativos de su capacidad para diferenciarse, tanto a través del linaje osteogénico como miogénico (EE.UU. N° de serie 09/302.896 de Chancellor *et al.*; T. Katagiri *et al.*, 1994, *J. Cell Biol.* **127**:1755-1766).

Según la presente invención, las poblaciones de MDC redondas (PP6) que se adherían rápidamente (PP1-4) y lentamente se aislaron y se enriquecieron de explantes de músculo esquelético, y se ensayaron para la expresión de diversos marcadores, usando inmunohistoquímica, para determinar la presencia de células pluripotentes entre las células que se adherían lentamente (Ejemplo 1; solicitud de patente de EE.UU. de N° de serie 09/302.896 de Chancellor *et al.*). Según se muestra en la Tabla 3 del Ejemplo 9 de la presente invención, las células PP6 expresaban marcadores miogénicos, incluyendo desmina, MyoD y Myogenina. Las células PP6 expresaban también c-met y MNF, dos genes que se expresan en una etapa temprana de la miogénesis (J.B. Miller *et al.*, 1999, *Curr. Top. Dev. Biol.* **43**:191-219; véase Tabla 3). Las PP6 mostraban un porcentaje inferior de células que expresaban M-caderina, un marcador específico de las células satélite (A. Irintchev *et al.*, 1994, *Development Dynamics* **199**:326-337), pero un porcentaje mayor de células que expresaban Bcl-2, un marcador limitado a células en etapas tempranas de la miogénesis (J.A. Dominov *et al.*, 1998, *J. Cell Biol.* **142**:537-544). Las células PP6 también expresaban CD34, un marcador identificado con las células progenitoras hematopoyéticas humanas, así como precursores de células estromales en la médula ósea (R.G. Andrews *et al.*, 1986, *Blood* **67**:842-845; C.I. Civin *et al.*, 1984, *J. Immunol.* **133**:157-165; L. Fina *et al.*, 1990, *Blood* **75**:2417-2426; P.J. Simmons *et al.*, 1991, *Blood* **78**:2848-2853; véase Tabla 3).

Las células PP6 expresaban también Flk-1, un homólogo de ratón del gen KDR humano que se identificó recientemente como marcador de células hematopoyéticas con características análogas a células madre (B.L. Ziegler *et al.*, 1999, *Science* **285**:1553-1558; véase Tabla 3). De forma similar, las células PP6 expresaban Sca-1, un marcador presente en células hematopoyéticas con características análogas a células madre (M. van de Rijn *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:4634-8; M. Osawa *et al.*, 1996, *J. Immunol.* **156**:3207-14; véase Tabla 3). Sin embargo, las células PP6 no expresaban los marcadores de células madre hematopoyéticas CD45 o c-Kit (analizados en L.K. Ashman, 1999, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**:1037-51; G.A. Koretzky, 1993, *FASEB J.* **7**:420-426; véase Tabla 3).

En la presente invención se prefiere la población PP6 de células progenitoras derivadas de músculo, que tienen las características aquí descritas. Estas células progenitoras derivadas de músculo expresan los marcadores celulares desmina, CD34 y Bcl-2. Según la presente invención, las células PP6 se aíslan mediante las técnicas aquí descritas (Ejemplo 1) para obtener una población de células progenitoras derivadas del músculo, que tiene supervivencia a largo plazo después del trasplante. La población PP6 de células progenitoras derivadas del músculo comprende un porcentaje significativo de células que expresa marcadores celulares como desmina, CD34 y Bcl-2. Además, las células PP6 expresan los marcadores celulares Flk-1 y Sca-1, pero no expresan los marcadores CD45 o c-Kit. Preferiblemente, más de 95% de las células PP6 expresa los marcadores desmina, Sca-1 y Flk-1, pero no expresa los marcadores CD45 o c-Kit. Se prefiere que las células PP6 se utilicen entre aproximadamente 1 día o 24 horas después del último cultivo en placa.

Como alternativa al método de cultivo previo en placa, las MDC de la presente invención se pueden aislar mediante análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), usando anticuerpos marcados frente a uno o más de los marcadores superficiales celulares expresados por las MDC (C. Webster *et al.*, 1988, *Exp. Cell. Res.* **174**:252-65; J.R. Blanton *et al.*, 1999, *Muscle Nerve* **22**:43-50). Por ejemplo, se puede realizar análisis FACS usando anticuerpos marcados dirigidos contra CD34, Flk-1, Sca-1 y/o los otros marcadores superficiales aquí descritos, para seleccionar una población de células análogas a PP6, que presentan supervivencia a largo plazo cuando se introducen en el tejido hospedador. Asimismo, la presente invención abarca el uso de uno o más marcadores de detección de fluorescencia, por ejemplo, fluoresceína o rodamina, para detección de anticuerpos de diferentes proteínas marcadoras de células.

Tratamientos a base de células derivadas de músculo

En la presente invención, las MDC se pueden aislar de una fuente de músculo esquelético e introducir las o transplantarlas en un tejido blando muscular o no muscular de interés, o en estructuras óseas. Ventajosamente, las MDC de la presente invención se aíslan y enriquecen para contener un gran número de células progenitoras que muestran supervivencia a largo plazo después del trasplante. Además, las células progenitoras derivadas de músculo de esta invención expresan diversos marcadores celulares característicos, como desmina, CD34 y Bcl-2. Además, las células progenitoras derivadas de músculo de esta invención expresan los marcadores celulares Sca-1 y Flk-1, pero no expresan los marcadores celulares CD45 o c-Kit (véase Ejemplo 1).

Las MDC y composiciones que comprenden MDC de la presente invención, se pueden usar para reparar, tratar o mejorar diversos trastornos estéticos o funcionales (p.ej. defectos), a través del aumento de tejidos blandos musculares

o no musculares. En particular, tales composiciones se pueden usar como sustancias de abultamiento de tejido blando para el tratamiento de: 1) trastornos cosméticos y estéticos de la piel; 2) trastornos del lumen; 3) síntomas o trastornos de reflujo gastroesofágico; 4) incontinencia fecal; 5) debilidad, enfermedad, lesión o disfunción del músculo esquelético; 6) debilidad, enfermedad, lesión o disfunción del músculo liso; y 7) síntomas o trastornos congénitos, degenerativos o traumáticos de los discos intervertebrales, incluyendo dolor de espalda y deficiencia de discos. Además tales MDC y sus composiciones se pueden usar para aumentar tejido blando no asociado con lesión, añadiendo relleno a un área de tejido blando, orificio, depresión o hueco, en ausencia de enfermedad o traumatismo, como para “alisamiento” o eliminación de una arruga. La presente invención abarca asimismo las administraciones múltiples y sucesivas de MDC.

Para tratamientos basados en MDC, se obtiene preferiblemente un explante de músculo esquelético de una fuente humana o animal autóloga o heteróloga, es decir, alogénica. Se prefiere una fuente animal o humana autóloga, aunque las células madre derivadas de músculo alogénico son muy adecuadas para usarlas en muchos casos. Las composiciones de MDC se preparan a continuación y se aíslan según se describió aquí. Para introducir o transplantar las MDC y/o composiciones que comprenden MDC según la presente invención en un receptor humano o animal, se prepara una suspensión de células musculares mononucleares. Tales suspensiones contienen concentraciones de las células progenitoras derivadas de músculo de la invención, en un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable. Por ejemplo, las suspensiones de MDC para administrar a un sujeto pueden comprender de 10^8 a 10^9 células/ml en una solución estéril de medio completo modificado para contener el suero del sujeto, como una alternativa al suero bovino fetal. Alternativamente, las suspensiones de MDC se pueden realizar en soluciones estériles exentas de suero, como soluciones de criopreservación (Celox Laboratories, St. Paul, MN). Las suspensiones de MDC se pueden introducir después, p.ej. vía inyección, en uno o más sitios del tejido donador.

Las células descritas se pueden administrar como una preparación o composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable que contiene un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable y se administran a los tejidos del organismo receptor de interés, incluyendo seres humanos y animales no humanos. La composición que contiene MDC se puede preparar volviendo o suspender las células en un líquido o solución adecuada, como solución salina fisiológica estéril u otros líquidos acuosos inyectables fisiológicamente aceptables. Las cantidades de los componentes a usar en tales composiciones se pueden determinar rutinariamente por los expertos en la técnica.

La MDC o sus composiciones se pueden administrar mediante colocación de las suspensiones de MDC sobre material absorbente o adherente, es decir, una matriz de esponja de colágeno, e inserción del material que contiene MDC en o sobre el sitio de interés. Alternativamente, la MDC se puede administrar mediante rutas parenterales de inyección, incluyendo subcutánea, intravenosa, intramuscular e intraesternal. Otros modos de administración incluyen, pero no están limitados a, intranasal, intratecal, intracutáneo, percutáneo, entérico y sublingual. En una realización de la presente invención, en la administración de las MDC puede intervenir la cirugía endoscópica.

Para administración inyectable, la composición está en solución o suspensión estéril o se puede volver a suspender en vehículos acuosos u oleaginosos farmacéutica y fisiológicamente aceptables, que pueden contener conservantes, estabilizadores y material para hacer la solución o suspensión isotónica con los fluidos corporales (es decir, sangre) del receptor. Ejemplos no limitativos de excipientes adecuados para el uso incluyen agua, solución salina tamponada con fosfato, pH 4, solución de cloruro sódico acuoso 0,15 M, dextrosa, glicerol, etanol diluido y similares, y sus mezclas. Estabilizadores ilustrativos son polietilenglicol, proteínas, sacáridos, aminoácidos, ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos, que se pueden usar bien solos o como mezclas. Las proporciones o cantidades, así como las vías de administración usadas, se determinan sobre una base individual, y corresponden a las proporciones usadas en tipos similares de aplicaciones o indicaciones conocidas para los expertos en la técnica.

Para optimizar el éxito del trasplante, es deseable una correspondencia lo más próxima posible entre el donador y el receptor. Si no está disponible una fuente autóloga, se pueden analizar los antígenos de histocompatibilidad de clase I y clase II del donador y el receptor, para determinar la correspondencia más próxima disponible. Esto minimiza o elimina el rechazo inmunológico y reduce la necesidad de terapia inmunosupresora o inmunomoduladora. Si se requiere, se puede iniciar la terapia inmunosupresora o inmunomoduladora antes, durante y/o después del procedimiento del trasplante. Por ejemplo, se pueden administrar ciclosporina A u otros fármacos inmunosupresores al receptor del trasplante. La tolerancia inmunológica se puede inducir también previamente al trasplante mediante métodos alternativos conocidos en la técnica (D.J. Watt *et al.*, 1984, *Clin. Exp. Immunol.* **55**:419; D. Faustman *et al.*, 1991, *Science* **252**:1701).

Consecuentemente con la presente invención, las MDC se pueden administrar a los tejidos corporales, incluyendo hueso, tejido epitelial (es decir, piel, lumen, etc.), tejido conectivo (es decir, adiposo, cartílago, ligamento, linfa, etc.), tejido muscular (es decir, músculo esquelético/estriado o liso), y diversos tejidos orgánicos, como aquellos órganos que están asociados con el sistema digestivo (es decir, boca, lengua, esófago, estómago, hígado, páncreas, vesícula biliar, vejiga, intestino, ano, etc.), sistema cardiovascular (es decir, corazón, venas, arterias, capilares, etc.), sistema respiratorio (es decir, pulmones, tráquea, etc.), sistema reproductivo (es decir, conducto deferente, escroto, testículos, pene, trompas de falopio, vagina, clítoris, útero, mamas, ovarios, vulva, etc.), sistema urológico (es decir, vejiga, uretra, uréter, riñones, etc.), y sistema nervioso (es decir, cerebro, médula espinal, nervios, etc.).

El número de células en una suspensión de MDC y el modo de administración pueden variar dependiendo del sitio y enfermedad a tratar. Como ejemplos no limitativos, según la presente invención, se inyectan aproximadamente

ES 2 288 946 T3

1-1,5 x 10⁶ MDC para el tratamiento de una región de aproximadamente 8 mm de diámetro de criolesión en tejido muscular liso vesical (véase Ejemplo 6), mientras que aproximadamente 0,5-1,0 x 10⁶ MDC se administran a través de una matriz de esponja de colágeno, para el tratamiento de una región de aproximadamente 5 mm de un defecto del cráneo (véase Ejemplo 9). De acuerdo con los ejemplos aquí descritos, un médico experimentado puede modular las cantidades y métodos de tratamientos basados en MDC, según los requerimientos, limitaciones y/o optimizaciones determinados para cada caso.

Trastornos dermatológicos

Las MDC y sus composiciones según la presente invención tienen una utilidad notable como materiales para el aumento de tejidos blandos en procedimientos cosméticos, p.ej., cirugía plástica o procedimientos antienvjecimiento. Específicamente, tales MDC y composiciones que contienen MDC, se pueden usar para tratar diversos trastornos dermatológicos en un ser humano o sujeto animal, incluyendo, pero no limitados a, heridas, arrugas, ritides, depresiones cutáneas de origen no traumático, marcas de estiramientos, cicatrices deprimidas, cicatrización de acné vulgar, e hipoplasia del labio. Más específicamente, las MDC y composiciones de la presente invención se pueden usar para tratar arrugas, ritides o depresiones cutáneas faciales, y especialmente, la región que rodea los ojos. Para tratar los trastornos dermatológicos, las MDC se preparan según se describe aquí, y luego se administran, p.ej., vía inyección, a la piel, subcutánea o intradérmicamente, para rellenar, abultar o reparar el defecto. El número de MDC introducidas se modula para reparar depresiones o defectos cutáneos profundos, así como depresiones o defectos superficiales, según se requiera. Por ejemplo se utilizan aproximadamente 1-1,5 x 10⁶ MDC para el aumento de una región de aproximadamente 5 mm de la piel (véase Ejemplo 3).

Trastornos del lumen

Las MDC y sus composiciones según la presente invención tienen utilidad adicionalmente como tratamientos para trastornos del lumen en un sujeto animal o mamífero, incluyendo seres humanos. Específicamente, las células progenitoras derivadas del músculo se usan para bloquear, incrementar, agrandar, sellar, reparar, abultar o rellenar, completa o parcialmente, diversos lúmenes biológicos u orificios en el cuerpo. Los lúmenes incluyen, sin limitación, vasos sanguíneos, intestino, estómago, esófago, uretra, vagina, trompas de Falopio, conducto deferente y tráquea. Los orificios pueden incluir, sin limitación, diversas heridas de tejidos (es decir, pérdida de músculo y abultamiento de tejido blando debido a traumatismo; destrucción de tejido blando debida a penetración de proyectiles como una herida de arma blanca o de bala; pérdida de tejido blando procedente de enfermedad o muerte de tejidos debida a eliminación quirúrgica del tejido, incluyendo pérdida de tejido mamario después de una mastectomía para cáncer de mama o pérdida de tejido muscular después de la cirugía para tratar sarcoma, etc.); lesiones, fisuras, divertículos, quistes, fístulas, aneurismas y otras depresiones u orificios no deseados que pueden existir en el cuerpo de un animal o mamífero, incluyendo seres humanos. Para el tratamiento de trastornos del lumen, las MDC se preparan como se describe aquí y luego se administran, p.ej. vía inyección o suministro intravenoso, al tejido luminal para rellenar o reparar el orificio. El número de MDC introducido se modula para reparar orificios grandes o pequeños en un medio de tejido blando, según se requiera.

Trastornos del esfínter

Las MDC y sus composiciones según la presente invención se pueden usar también para el tratamiento de una lesión, debilidad, enfermedad o disfunción del esfínter, en un animal o mamífero, incluyendo seres humanos. En particular, las MDC se usan para aumentar tejidos de los esfínteres esofágico, anal, cardíaco, pilórico, y urinario. Más específicamente, la presente invención proporciona tratamientos de aumento del tejido blando para síntomas de reflujo gastroesofágico, e incontinencia urinaria y fecal. Para el tratamiento de defectos de esfínter, las MDC se preparan según se describe aquí, y luego se administran al tejido del esfínter, p.ej., vía inyección, para proporcionar abultamiento, relleno o soporte adicional. El número de MDC introducido se modula para proporcionar cantidades variables de material de abultamiento, según se requiera. Por ejemplo, se usan aproximadamente 1-1,5 x 10⁶ MDC para proporcionar aumento para una región de aproximadamente 5 mm de unión gastroesofágica, o una región de aproximadamente 5-10 mm del esfínter anal (véase Ejemplo 4).

Aumento muscular y contractilidad

En la presente invención, las MDC y sus composiciones se pueden usar para el tratamiento de trastornos musculares en un sujeto humano o animal. En particular, las MDC se pueden usar para aumentar los músculos esquelético o liso, para tratar la debilidad o disfunción producida por lesión, enfermedad, inactividad o traumatismo inducido por anoxia o cirugía. Más específicamente, la presente invención proporciona tratamientos para debilidad o disfunción muscular, como una lesión relacionada con los deportes. La presente invención proporciona asimismo tratamientos para enfermedad o disfunción del músculo liso, como insuficiencia cardíaca o lesión asociada con infarto de miocardio.

Para el aumento del músculo o el tratamiento de trastornos relacionados con el músculo, las MDC se preparan según se describió anteriormente y se administran, p.ej., vía inyección, en el tejido muscular, para proporcionar abultamiento, relleno o soporte adicionales. Según se puede apreciar por el facultativo experimentado, el número de MDC introducidas se modula para proporcionar cantidades variables de material de abultamiento, según se necesite o requiera. Por ejemplo, se inyectan aproximadamente 1-1,5 x 10⁶ MDC para el aumento de una región de aproximadamente 5 mm de tejido cardíaco (véase Ejemplo 7).

Además, las MDC y sus composiciones se pueden usar para afectar a la contractilidad del tejido muscular liso, como tejido gastrointestinal, tejido esofágico y tejido de la vejiga, por ejemplo. En efecto, se observó que la contractilidad muscular se restauraba en tejido de la vejiga criolesionado, después de la introducción de células progenitoras derivadas de músculo, es decir, MDC, según se demuestra en el Ejemplo 6. Por tanto, la presente invención también abarca el uso de las MDC de la invención para restablecer la contracción muscular y/o mejorar o solventar los problemas de contractilidad del músculo liso, como motilidad gastrointestinal reducida, incluyendo el músculo liso del esófago, estómago e intestino. Un ejemplo específico, aunque no limitativo de un trastorno que pueden mejorar, reducir o corregir las MDC de la invención es la gastroparesis, es decir, escasa motilidad y vaciado del estómago.

10 *Células derivadas de músculo modificadas mediante ingeniería genética*

Las MDC de esta invención se pueden modificar mediante ingeniería genética, para que contengan una secuencia o secuencias de ácido nucleico que codifiquen una o más biomoléculas activas, y para que expresen estas biomoléculas, incluyendo proteínas, polipéptidos, péptidos, hormonas, metabolitos, fármacos, enzimas y similares. Tales MDC pueden ser histocompatibles (autólogas) o no histocompatibles (alogénicas) para el receptor, incluyendo seres humanos. Estas células pueden servir como sistemas de suministro local a largo plazo para diversos tratamientos, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades y patologías tales como cáncer, rechazo de trasplantes, y regeneración de tejidos muscular y nervioso, diabetes, insuficiencia hepática, insuficiencia renal, defectos neurales y enfermedades como la enfermedad de Parkinson, y para suministrar un producto génico a un punto de aumento de tejido o relleno de orificio, como una sustancia terapéutica, según se describe aquí.

En la presente invención se prefieren las células progenitoras derivadas de músculo autólogas, que no serán reconocidas como extrañas por el receptor. A este respecto, las MDC usadas para transferencia o suministro génico en el que intervienen células, se harán coincidir frente al locus principal de histocompatibilidad (MHC o HLA en seres humanos). Tales células coincidentes para MHC o HLA pueden ser autólogas. Alternativamente, las células pueden ser de una persona que tenga un perfil antigénico de MHC o HLA igual o similar. La presente invención abarca también el uso de células que carecen de los antígenos de clase I y/o II de MHC, según se describe en la patente de EE.UU. N° 5.538.722.

Las MDC se pueden modificar mediante ingeniería genética por diversas técnicas moleculares y métodos conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo, transfección, infección o transducción. La transducción, según se usa aquí, se refiere normalmente a células que se han modificado genéticamente para que contengan un gen extraño o heterólogo, a través de la introducción de un vector vírico o no vírico en las células. La transfección se refiere más normalmente a células que se han modificado genéticamente para que contengan un gen extraño albergado en un plásmido o vector no vírico. Las MDC se pueden transfectar o transducir mediante diferentes vectores y, por tanto, pueden servir como vehículos de suministro génico para transferir los productos expresados hacia el músculo.

Aunque se prefieren los vectores víricos, los expertos en la técnica se darán cuenta de que la modificación genética de las células para que contengan secuencias de ácido nucleico que codifiquen proteínas o polipéptidos, citoquinas y similares deseados, se pueden realizar mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo según se describe en la patente de EE.UU. N° 5.538.722, incluyendo fusión, transfección, lipofección en la que intervienen liposomas, electroporación, precipitación con DEAE-dextrano o fosfato cálcico, bombardeo de partículas (biolística) con partículas recubiertas por ácidos nucleicos (p.ej., partículas de oro), microinyección y similares.

Los vectores para introducir ácidos nucleicos (ADN o ARN) heterólogos (es decir, extraños) en células musculares para la expresión de productos bioactivos, son bien conocidos en la técnica. Tales vectores poseen una secuencia promotora, preferiblemente, un promotor que es específico de la célula y se sitúa aguas arriba de la secuencia a expresar. Los vectores pueden contener también, opcionalmente, uno o más genes marcadores expresables para expresión como una indicación de transfección satisfactoria y expresión de las secuencias de ácidos nucleicos contenidas en el vector.

Ejemplos ilustrativos de vehículos o construcciones de vectores para la transfección o infección de las células derivadas de músculo de la presente invención, incluyen los vectores víricos defectivos para replicación, vectores de virus de ADN o ARN (retrovirus), como adenovirus, virus de Herpes simplex y vectores víricos adeno-asociados. Los vectores de virus adeno-asociados son monocatenarios y permiten el suministro eficiente de copias múltiples de ácido nucleico al núcleo de las células. Se prefieren los vectores de adenovirus. Los vectores estarán exentos normalmente de cualquier ADN procariótico, y pueden comprender diversas secuencias de ácido nucleico funcionales. Ejemplos de tales secuencias funcionales incluyen secuencias de polinucleótidos, p.ej., ADN o ARN, secuencias que comprenden secuencias reguladoras de iniciación y terminación de la transcripción y de la traducción, incluyendo promotores (p.ej., promotores fuertes, promotores inducibles y similares), e intensificadores que son activos en células musculares.

Asimismo, incluido como parte de las secuencias funcionales está un marco de lectura abierto (secuencia polinucleótida) que codifica una proteína de interés; también pueden estar incluidas secuencias flanqueantes para una integración dirigida. En algunas situaciones, la secuencia flanqueante 5' permitirá la recombinación homóloga, cambiando por tanto la naturaleza de la región de iniciación transcripcional, de forma que proporcione una transcripción inducible o no inducible, para incrementar o reducir el nivel de transcripción, por ejemplo.

En general, la secuencia de ácido nucleico que se desea que se exprese por la célula progenitora derivada del músculo, es la de un gen estructural, o un fragmento, segmento o parte funcional del gen que es heterólogo a la célula

progenitora derivada del músculo, y codifica una proteína o producto polipeptídico deseado, por ejemplo. El producto codificado y expresado puede ser intracelular, es decir, retenido en el citoplasma, núcleo o un organelo de una célula, o puede ser secretado por la célula. Para secreción, se puede conservar la secuencia señalizadora natural presente en el gen estructural, o se puede usar una secuencia señalizadora que no está presente de forma natural en el gen estructural.

5 Cuando el polipéptido o péptido es un fragmento de una proteína que es mayor, se puede proporcionar una secuencia señalizadora, de forma que, después de la secreción y procesamiento en el punto de procesamiento, la proteína deseada tendrá la secuencia natural. Ejemplos de genes de interés para uso según la presente invención, incluyen genes que codifican factores de crecimiento celular, factores de diferenciación celular, factores de señalización celular y factores de muerte celular programada. Ejemplos específicos incluyen, pero no están limitados a, genes que codifican BMP-2 (rhBMP-2), IL-1Ra, Factor IX y conexina 43,

Según se mencionó anteriormente, puede estar presente un marcador para la selección de las células que contienen la construcción del vector. El marcador puede ser un gen inducible o no inducible, y permitirá generalmente la selección positiva bajo inducción, o sin inducción, respectivamente. Ejemplos de genes marcadores usados normalmente incluyen neomicina, dihidrofolato-reductasa, glutamina-sintetasa, y análogos.

El vector empleado incluirá también generalmente un origen de replicación y otros genes que son necesarios para replicación en las células hospedadoras, según se emplean rutinariamente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un sistema de replicación que comprenda el origen de replicación y cualquier proteína asociada con la replicación codificada por un virus particular, se puede incluir como parte de la construcción. El sistema de replicación se tiene que seleccionar, de forma que los genes que codifican los productos necesarios para la replicación no transforman finalmente las células derivadas del músculo. Tales sistemas de replicación están representados por adenovirus defectivos para replicación, construidos según se describe, por ejemplo, por G. Acsadi *et al.*, 1994, *Hum. Mol. Genet.* 3:579-584, y por virus de Epstein-Barr. Ejemplos de vectores defectivos para replicación, particularmente, vectores retrovíricos que son defectivos para replicación, son BAG, descrito por Price *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:156; y Sanes *et al.*, 1986, *EMBO J.*, 5:3133. Se entenderá que la construcción génica final puede contener uno o más genes de interés, por ejemplo, un gen que codifique una molécula metabólica bioactiva. Además, se puede emplear ADNc, ADN producido sintéticamente o ADN cromosómico, utilizando métodos y protocolos conocidos y puestos en práctica por los expertos en la técnica.

Si se desea, se pueden usar vectores víricos defectivos para replicación, para modificar genéticamente las células antes de la inyección *in vivo* de las células. A este respecto, los vectores se pueden introducir en células productoras retrovíricas para el empaquetamiento anfotrófico. La expansión natural de las células progenitoras derivadas del músculo hacia regiones adyacentes, obvia un gran número de inyecciones dirigidas hacia o en el punto de interés.

La presente invención proporciona asimismo el suministro génico *ex vivo* a células y tejidos de un hospedador mamífero receptor, incluyendo seres humanos, a través del uso de MDC, p.ej., células musculares progenitoras tempranas, que se han transducido víricamente usando un vector adenovírico modificado genéticamente para contener un gen heterólogo que codifica un producto génico deseado. Tal enfoque *ex vivo* proporciona la ventaja de transferencia génica vírica eficiente, que es superior a los enfoques de transferencia génica directa. El procedimiento *ex vivo* implica el uso de células progenitoras derivadas de músculo procedentes de células aisladas de tejido muscular. La biopsia muscular que servirá como fuente de células progenitoras derivadas de músculo se puede obtener de un punto de lesión o de otro área que se pueda obtener más fácilmente procedente del cirujano clínico.

Se apreciará que, según la presente invención, los aislados clonales se pueden derivar de la población de células progenitoras derivadas de músculo (es decir, células PP6), usando diversos procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, limitar la dilución del cultivo en placa en el medio de cultivo de tejidos. Los aislados clonales comprenden células genéticamente idénticas que se originan de una célula única, solitaria. Además, los aislados clonales se pueden derivar usando el análisis FACS, según se describió anteriormente, seguido por limitación de la dilución, para lograr una única célula por pocillo, para establecer una línea celular aislada clonalmente. Un ejemplo de aislado clonal derivado de la población de células PP6 es mc13, que se describe en el Ejemplo 9. Preferiblemente, en los presentes métodos se utilizan aislados clonales de MDC, así como para modificar la expresión génica para la expresión de una o más moléculas bioactivas, o en terapias de sustitución génica.

Las MDC se infectan primero con vectores víricos modificados genéticamente, que contienen al menos un gen heterólogo que codifica un producto génico deseado, puestos en suspensión en un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable, como solución salina o solución salina tamponada con fosfato, y luego se administran a un punto apropiado en el hospedador. Consecuentemente con la presente invención, las MDC se pueden administrar a los tejidos corporales, incluyendo hueso, tejido epitelial, tejido conectivo, tejido muscular, y diversos tejidos orgánicos, como aquellos órganos que están asociados con el sistema digestivo, sistema cardiovascular, sistema respiratorio, sistema reproductivo, sistema urológico y sistema nervioso, según se describió anteriormente. El producto génico deseado se expresa por las células inyectadas, que introducen así el producto génico en el hospedador. Los productos génicos introducidos y expresados pueden, por tanto, utilizarse para tratar, reparar o mejorar la lesión, disfunción o enfermedad debido a su expresión durante largos períodos de tiempo por las MDC de la invención, que tienen supervivencia a largo plazo en el hospedador.

En estudios de modelos animales de terapia génica en la que intervienen mioblastos, se requería el implante de 10⁶ mioblastos por 100 mg de músculo, para la corrección de defectos enzimáticos del músculo (véase J.E. Morgan

et al., 1988, *J. Neural. Sci.* **86**:137; T.A. Partridge *et al.*, 1989, *Nature* **337**:176). Extrapolando a partir de estos datos, se pueden implantar aproximadamente 10^{12} MDC puestas en suspensión en un medio fisiológicamente compatible, en tejido muscular para terapia génica para un ser humano de 70 kg. Este número de MDC de la invención se puede producir a partir de 100 mg de biopsia de músculo esquelético procedente de una fuente humana (véase más adelante).

5 Para el tratamiento de un punto de lesión específico, una inyección de MDC modificadas genéticamente en un tejido o punto de lesión determinados, comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de células en solución o suspensión, preferiblemente aproximadamente 10^5 a 10^6 células por cm^3 de tejido a tratar, en un medio fisiológicamente aceptable.

Células madre derivadas de músculo alogénico proporcionan trasplante celular efectivo

10 Se ha obtenido un trasplante celular eficiente inyectando el MDSC de las preplacas tardías, p.ej., PP5-6, según se describió, en un hospedador no autólogo (alogénico). Por ejemplo, se observaron grandes números de células que formaban injertos alogénicos en los músculos de los hospedadores a los 30 días después de la inyección (p.ej. se encontraron >2000 miofibras distrofina+ en músculos del hospedador después de la inyección de 3×10^5 células madre derivadas de músculo de origen distinto al del hospedador). (Ejemplo 10). Este resultado indica que las MDSC inyectadas no sólo evitan la extensión generalmente escasa y la escasa supervivencia posterior a la inyección, sino que también las células inyectadas evitaban el rechazo inmunológico en los músculos del hospedador, que se observa a menudo en el trasplante celular entre MDSC de diferentes donadores de trasplante que tienen un origen diferente del hospedador, p.ej., en diferentes cepas de ratones. Los resultados demostraron que las células madre derivadas de músculos no autólogos, mejoraban significativamente la eficiencia de la terapia celular en músculos enfermos del hospedador. Además, las MDSC se pueden considerar privilegiadas inmunológicamente. Las células MDSC alogénicas de la preplaca tardía (p.ej., PP5 o 6), sobreviven más de 10 veces más que las células no madre de las preplacas tempranas, p.ej., PP1-2 O PP1-4, cuando se inyectan o transplantan en un animal hospedador de una estirpe diferente.

25 La Tabla 1 presenta los resultados descritos en el Ejemplo 10 y las Figuras 17A-17F, comparando el uso de células MDSC [EP] normales y MDSC [LP] transplantadas en ratones hospedadores *mdx*. Los datos de la Tabla 1 representan el número de miofibras positivas para distrofina (distrofina+) que se encuentran en músculo de *mdx* inyectado, con células madre MDSC [EP] o MDSC [LP].

30 TABLA 1

	MDSC [EP]		MDSC [LP]	
	M	SD	M	SD
35 Día 10	430,7	147,9	2798,0	1141,6
40 Día 30	134,0	41,6	2000,1	657,6

45 **3-6 músculos por grupo; M = promedio; SD = desviación estándar**

La naturaleza inmunoprivilegiada de las células MDSC de la preplaca tardía se apoya en resultados inmunohistoquímicos (tinción con desmina), que muestran que, cuando las MDSC se inyectan periféricamente, pueden migrar y de hecho migran al timo. Después de esto, las MDSC inyectadas pueden diferenciarse en linfocitos T e inducir tolerancia quimérica (p.ej., Fig. 19 - tinción del timo positiva para desmina después de inyección de MDSC periférica).

Además, comparadas con MDSC [EP], algunas MDSC [LP] pueden diferenciarse no sólo en células maduras musculares, o de un linaje diferente, después de la inyección en un animal hospedador, sino también en células satélite, cuando se inyectan en músculo del hospedador. En tales casos, se localiza una población de células MDSC [LP] en el músculo, así como en la lámina basal de las miofibras, que es un sitio de células satélite. Las células derivadas de las MDSC [LP] y localizadas en la lámina basal de las miofibras se transforman con el tiempo en M-caderina-positivas. Las células satélite creadas recientemente en estos sitios pueden formar nuevas miofibras, por ejemplo si las miofibras del hospedador mueren. Sin querer vincularse a ninguna teoría, las MDSC [LP] que migran a la lámina basal de las miofibras, pueden responder a señales o factores en este punto y alrededor del mismo, que las hacen desarrollarse en células satélite. Por tanto, la inyección de MDSC [LP] proporciona un medio para suministrar una población mantenida futura de células precursoras musculares que forman células satélite en sitios de músculo del hospedador, en los que las células satélite existen y se desarrollan.

La invención también proporciona la capacidad de emplear MDSC fetales o embrionarias humanas en metodologías y tratamientos de trasplante, bajo directrices apropiadas y regulaciones y condiciones aprobadas, con ningún problema o problemas mínimos de rechazo debido a incompatibilidades donador-hospedador. Por ejemplo, se descubrió que las MDSC humanas del músculo de extremidades fetales eran inmunotolerantes y presentaban niveles elevados de supervivencia, ya que eran capaces de mantenerse en ratones SCID durante > 2 semanas después de la in-

yección (Figs. 18A y 18B). Por tanto, según la invención y bajo las directrices, regulaciones y condiciones apropiadas, se pueden utilizar MDSC fetales humanas guardadas en bancos, por ejemplo, e inyectarlas en los tejidos u órganos de cualquier paciente que sean sensibles a inyección de MDSC o trasplante, según se describió aquí.

5 Ejemplo 1

Enriquecimiento, aislamiento y análisis de MDC

Enriquecimiento y aislamiento de MDC

10 Se prepararon MDC según se describió (solicitud de patente de EE.UU. de N° de serie 09/302.896 de Chancellor *et al.*). Se obtuvieron explantes de los cuartos traseros de las extremidades de diversas fuentes, concretamente de ratones *mdx* (distróficos) de 3 semanas de edad (C57BL/10ScSn *mdx/mdx*, Jackson Laboratories), ratas SD (Sprague Dawley) hembra normales de 4-6 semanas de edad, o ratones SCID (deficiencia inmunológica combinada grave). El tejido muscular de cada una de las fuentes animales se diseccionó para eliminar cualquier hueso, y se trituró en forma de suspensión acuosa. La suspensión se digirió mediante incubaciones en serie de 1 hora con colagenasa tipo XI al 0,2%, dispasa (clase II, 240 unidades), y tripsina al 0,1% a 37°C. La suspensión celular resultante se hizo pasar a través de agujas de calibre 18, 20 y 22, y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, las células se pusieron en suspensión en medio de crecimiento (DMEM complementado con suero bovino fetal al 10%, suero equino al 10%, extracto embrionario de pollo al 0,5%, y penicilina/estreptomicina al 2%). Las células se cultivaron en placa previamente en matraces recubiertos con colágeno (solicitud de patente de EE.UU. de N° de serie 09/302.896 de Chancellor *et al.*). Después de aproximadamente 1 hora, el sobrenadante se eliminó del matraz y se volvió a cultivar en placa en un matraz recubierto de colágeno. Las células que se adherían rápidamente en esta incubación de 1 hora eran principalmente fibroblastos (Z. Qu *et al.*, más arriba; solicitud de EE.UU. de N° de serie 09/302.896 de Chancellor *et al.*). El sobrenadante se eliminó y se volvió a cultivar en placa una vez que 30-40% de las células se había adherido a cada matraz. Después de aproximadamente 5-6 cultivos en placa seriados, el cultivo se enriquecía con células pequeñas, redondas, denominadas células PP6, que se aislaban de la población celular inicial y se usaban en estudios posteriores. Las células adherentes aisladas en los cultivos tempranos se agrupaban entre sí y se denominaban células PP1-4.

30 Las poblaciones celulares de PP1-4 de *mdx*, PP6 de *mdx*, PP6 normales y fibroblastos se examinaron mediante análisis inmunohistoquímico para la expresión de marcadores celulares. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 2.

35 TABLA 2

Marcadores celulares expresados en poblaciones celulares PP1-4 y PP6

	Células PP1-4 de <i>mdx</i>	Células PP6 de <i>mdx</i>	Células PP6 de nor	Fibroblastos
40 Desmina	+/-	+	+	-
45 CD34	-	+	+	-
Bcl-2	(-)	+	+	-
50 Fik-1	Na	+	+	-
Sca-1	Na	+	+	-
55 M-caderina	-/+	-/+	-/+	-
MyoD	-/+	+/-	+/-	-
60 Miogenina	-/+	+/-	+/-	-

Tabla 2

65 Las células PP1-4 de *mdx*, PP6 de *mdx*, PP6 normales, y fibroblastos se derivaron mediante técnica de cultivo en placa previo y se examinaron mediante análisis inmunohistoquímico. “-” indica que menos de 2% de las células mostraba expresión; “-/+” indica que 5-50% de las células mostraba expresión; “+/-” indica que ~40-80% de las células mostraba expresión; “+” indica que >95% de las células mostraba expresión; “nor” indica células normales; “na” indica que los datos inmunohistoquímicos no están disponibles.

ES 2 288 946 T3

Hay que destacar que tanto los ratones *mdx* como normales mostraban una distribución idéntica de todos los marcadores celulares analizados en esta prueba. Por tanto, la presencia de la mutación *mdx* no afecta a la expresión del marcador celular de la población derivada de la célula muscular PP6 aislada.

5 Las MDC se cultivaron en medio de proliferación que contenía DMEM (medio de Eagle modificado con Dulbecco) con FBS al 10% (suero bovino fetal), HS al 10% (suero equino), extracto de embrión de pollo al 0,5%, y penicilina/estreptomina al 1%, o medio de fusión que contenía DMEM complementado con suero bovino fetal al 2% y solución antibiótica al 1%. Todos los suministros de medios se adquirieron a través de Gibco Laboratories (Grand Island, NY).

10

Ejemplo 2

Vectores MDC y transfección

15 *Vectores de retrovirus y adenovirus*

El vector retroviral MFG-NB (N. Ferry *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8377-81) se usó para los experimentos de MDC. Este vector contiene un gen LacZ modificado (NLS-LacZ) que incluye una secuencia de localización nuclear clonada del antígeno T grande del virus del simio (SV40) transcrita a partir de la repetición terminal larga (LTR). La cepa retroviral se cultivó y preparó según se describió previamente (J.C. van Deutekom *et al.*, 1998, *Neuromuscul. Disord.* 8:135-48). El retrovirus se valoró de 1×10^7 a 1×10^9 ufc/ml.

Se usó también un vector adenoviral. Este vector contenía el gen LacZ bajo el control del promotor del citomegalovirus humano (HuCMV) (J. Huard *et al.*, 1994, *Hum Gene Ther.* 5:949-58). El adenovirus recombinante delecionado E1-E3 se obtuvo a través del Dr. I. Kovesi (Gene Vec. Inc., Rockville, MD).

25

Transducción vírica de MDC

Para la transducción vírica, se cultivaron en placa MDC a una densidad de $1-1,5 \times 10^6$ en matraces T 75. Las MDC PP6 se lavaron en HBSS (solución salina equilibrada de Hank) y se incubaron con suspensiones, bien de retrovirus ($1 \times 10^7-1 \times 10^9$ ufc/ml) o de adenovirus (1×10^9 ufc/ml) en 5 ml de DMEM que contenía $8 \mu\text{g/ml}$ de Polybrene® (Abbott Laboratories, Chicago, IL) durante 4 h a 37°C. Las MDC transducidas víricamente se cultivaron en 10 ml de medio de proliferación durante 24 h a 37°C. Las MDC transducidas víricamente se cultivaron en 10 ml de medio de proliferación durante 24 h a 37°C. Las MDC se aclararon luego con HBSS, y se digirieron enzimáticamente con tripsina al 0,25% durante 1 minuto. Las MDC tratadas, transducidas víricamente, se centrifugaron durante 5 minutos a 3.500 rpm, y el glóbulo se volvió a poner en suspensión en $20 \mu\text{l}$ de HBSS.

35

Ejemplo 3

40 *Aumento de tejido blando de la piel*

MDC e inyección de colágeno

Se prepararon ratas SD para cirugía, anestesiando con halotano usando métodos estándar, y lavando el sitio quirúrgico con solución de Betadine®. Se inyectaron en la piel del abdomen inferior, bien 10 microlitros (μl) de una suspensión de MDC en HBSS (aproximadamente $1-1,5 \times 10^5$ células), $10 \mu\text{l}$ de colágeno bovino disponible comercialmente (Contingen®; C.R. Bard, Covington, GA), o $10 \mu\text{l}$ de solución salina estéril, usando una microjeringa de Hamilton. A los 5 días, 2 semanas y 4 semanas después de la inyección, se extirpó el área que rodeaba cada sitio de inyección, se preparó para análisis histoquímico, se examinó al microscopio y se fotografió. El análisis histoquímico incluía hematoxilina, eosina o tinción con tricromo.

50

Los resultados demuestran que las MDC eran viables durante, como máximo, al menos 4 semanas después de la inyección en el tejido cutáneo, sin evidencia de inflamación del tejido en el sitio de inyección (Figuras 1D-1F). Como contraste, el colágeno no estaba visible a las 2 semanas después de la inyección en el tejido cutáneo (Figuras 1B y 1C). Por tanto, las composiciones de MDC se pueden usar como materiales de aumento cutáneo para uso, por ejemplo, en aplicaciones cosméticas y estéticas o cirugía. Este es un hallazgo inesperado, ya que previamente se creía que las células musculares transplantadas necesitaban alrededor fibras musculares hospedadoras a las que unirse, a fin de sobrevivir. La supervivencia de las MDC de la presente invención después de la inyección en tejido no muscular se demuestra con más detalle en los Ejemplos 8 y 9.

60

Ejemplo 4

Aumento del tejido blando de la unión gastroesofágica y del esfínter anal

Se prepararon ratas SD para cirugía, según se describió anteriormente. Se realizó una incisión en la línea media del abdomen para exponer la unión gastroesofágica y el esfínter anal. El tejido blando se inyectó con $10 \mu\text{l}$ de una suspensión de células progenitoras derivadas de músculo en HBSS ($1-1,5 \times 10^6$ células), usando una microjeringa de Hamilton. En el día 3 después de la inyección, se extirpó el área que rodeaba cada sitio de inyección, se preparó

65

ES 2 288 946 T3

para el análisis histoquímico, se tiñó para β -galactosidasa para determinar la localización y viabilidad de las células que llevaban el marcador LacZ, se examinó microscópicamente y se fotografió. Los resultados de estos experimentos demuestran que las composiciones de MDC se pueden usar como materiales de abultamiento esofágico y del esfínter anal (Figuras 2A y 2B), para el tratamiento del reflujo gastroesofágico o de síntomas o trastornos de incontinencia fecal.

Ejemplo 5

Aumento de tejido blando de la unión vesico-ureteral

Se prepararon ratas SD para cirugía, según se describió anteriormente. Se realizó una incisión en la línea media del abdomen para exponer la unión uréter-vejiga(vesico-ureteral). Se inyectaron en el tejido 10 μ l de suspensión de MDC en HBSS (1-1,5 x 10⁶ células), usando una microjeringa de Hamilton. A los 3 días de la inyección, se extirpó el área que rodeaba cada sitio de inyección, se preparó para análisis histológico, se tiñó para β -galactosidasa para determinar la localización y viabilidad de las células que llevaban el marcador LacZ, se examinó al microscopio, y se fotografió. Estos resultados demuestran que las composiciones basadas en MDC se pueden usar como materiales de aumento ureteral-vesical (Figuras 3A y 3B) para el tratamiento de síntomas o trastornos de reflujo vesico-ureteral.

Ejemplo 6

Tratamiento con MDC de tejido de vejiga criolesionado

Criolesión y trasplante de MDC

Se prepararon ratas SD para cirugía según se describió anteriormente. Se realizó una incisión en la línea media inferior para exponer la vejiga y la uretra. La vejiga se rellenó a continuación con 1 ml de solución salina. La criolesión se realizó con una varilla de aluminio de 8 mm de diámetro enfriada sobre hielo seco. La sonda enfriada se colocó contra un lado de la pared vesical durante 15 o 30 segundos (referidos como lesión "leve" o "grave", respectivamente). Inmediatamente después de la criolesión, a un grupo con lesión grave se le inyectaron células derivadas del músculo de la invención (1-1,5 x 10⁶ células en 15 μ l de HBSS), mientras que a un grupo testigo con lesión grave se le inyectó HBSS (15 μ l) (n = 3 por grupo). Una semana después de la criolesión, a los otros grupos con lesión leve y grave se les inyectó una suspensión de MDC en 50 μ l de HBSS (2-3 x 10⁶ células), mientras que a los grupos testigo con lesión leve y grave se les inyectaron 50 μ l de HBSS (n = 4 por grupo). Para cada grupo, las inyecciones se realizaron en el centro de la región lesionada, usando una aguja de calibre 30 y una microjeringa de Hamilton.

Tinción inmunohistoquímica para actina del músculo liso (actina α -SM)

Para preparar muestras para análisis inmunohistoquímico, se fijaron muestras de tejidos o células en acetona fría a -20°C durante 2 minutos, y se bloquearon con HS al 5% durante 1 hora. Las muestras se incubaron durante la noche a temperatura ambiente en una cámara de humedad con anticuerpos monoclonales de ratón primarios anti-actina del músculo liso (n° de catálogo F-3777; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (dilución 1:400 en PBS, pH 7,4). Las muestras se lavaron luego tres veces con PBS, y se incubaron con anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón, conjugados con el fluorocromo Cy3 (Sigma Chemical Co.) (dilución 1:200 en PBS, pH 7,4).

Tinción inmunohistoquímica para la cadena pesada de miosina rápida (Fast MyHC)

Se fijaron muestras de tejidos o células en acetona fría a -20°C durante 2 minutos, y se bloquearon con HS al 5% durante 1 hora. Las muestras se incubaron a continuación durante la noche a temperatura ambiente en una cámara de humedad con anticuerpos monoclonales de ratón primarios anti-miosina esquelética (rápida) (n° de catálogo M-4276; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (dilución 1:400 en PBS, pH 7,4). Las muestras se lavaron luego tres veces con PBS, y se incubaron con anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón, conjugados con Cy3 (Sigma Chemical Co.) (dilución 1:200 en PBS, pH 7,4).

Cultivo celular

Las células progenitoras derivadas de músculo, según se prepararon en el Ejemplo 1, se cultivaron en placas de 35 mm recubiertas de colágeno, en medio de proliferación. Después de 24 horas, el medio de proliferación se reemplazó con medio de fusión. Las células se mantuvieron en medio de fusión con cambios diarios de medio hasta que las MDC se diferenciaron en miotubos.

Estudios de contractilidad

Dos semanas después de la inyección de MDC, se sacrificó a los animales y se usaron para preparar tiras de vejiga. Se prepararon dos tiras de cada vejiga, y ambas tiras se cortaron para extenderlas a lo largo de la circunferencia de la vejiga. Las tiras de vejiga se montaron en un baño de tejido y se sometieron a contracciones neurales (20 Hz, 10 y 80 choques), que se registraron y analizaron según se describe más abajo.

Recogida de tejido e histología

Se sacrificaron ratas SD y se extrajeron muestras del tejido que rodeaba el sitio de inyección. Las muestras se congelaron instantáneamente usando 2-metil-butano enfriado previamente en nitrógeno líquido. El análisis histoquímico de las muestras incluía tinción con hematoxilina y eosina. Las muestras se tiñeron, se examinaron al microscopio y se fotografiaron. Cada sección de criostato medía 10 μm de grosor

Electroestimulación de tejido muscular liso de la vejiga

El animal fue sacrificado y se extrajo la vejiga rápidamente. Se obtuvieron de cada vejiga dos tiras que cubrían la circunferencia de la pared de la vejiga. Las tiras se montaron en baños de órgano de 5 ml que contenían solución de Krebs (113 mmol/l de NaCl, 4,7 mmol/l de KCl, 1,25 mmol/l de CaCl_2 , 1,2 mmol/l de MgSO_4 , 25 mmol/l de NaHCO_3 , 1,2 mmol/l de KH_2PO_4 , y 11,5 mmol/l de glucosa) aireada con O_2 al 95% y CO_2 al 5%. La tensión inicial se fijó a 10 mN, y las contracciones isométricas se midieron con transductores de extensómetro acoplados con un amplificador de extensómetro TBM4 (World Precision Instruments). Las mediciones de contracción se compilaron usando un programa de adquisición de datos (Windaq, DATAQ Instruments, Inc., Akron, OH). La velocidad de muestreo por canal se fijó en 100 Hz. La amplitud de las contracciones se calculó utilizando un programa de cálculo (WindaqEx, DATAQ Instruments, Inc.). Después de un período de equilibrado de 20 minutos, se aplicaron estímulos de campo eléctrico a través de dos electrodos de hilo de platino separados por 4 cm en la superficie y el fondo del baño de órganos. La temperatura se mantuvo a 37°C durante el experimento.

Estimulación química del músculo liso de la vejiga

Las tiras de vejiga se estimularon con pulsos de onda cuadrada de 0,25 ms de duración con voltaje máximo (100 V) y se construyó una curva de frecuencia de respuesta usando 10 o 80 choques a 1,2,5,10,20 o 40 Hz. Después de la electroestimulación, se añadieron 5, 10 o 20 M de carbacol a las tiras de vejiga para inducir contracciones. En experimentos paralelos, se añadió atropina 1 μM , se aplicó electroestimulación como anteriormente, y se añadió metileno-ATP 50 μM para inducir contracciones.

Tinción para innervación

Se usó tinción con acetilcolina (Ach) para valorar la reinervación de MDC en músculo liso. Ach es una tinción para la unión neuromuscular, que indica la presencia de terminaciones nerviosas. Después de la inyección de MDC, el tejido se extirpó en el día 3, 15, 30 o después de 6 meses, se tiñó para Ach, se observó mediante microscopía y se fotografió.

Análisis estadístico

Se describen valores como medias \pm desviaciones estándar. Un valor "P" inferior a 0,05 se consideraba estadísticamente significativo. Se usó el test de Student.

Diferenciación de MDC

Se evaluaron células progenitoras derivadas de músculo según se prepararon en el Ejemplo 1, para diferenciación celular. La actina alfa-SM es el marcador más temprano conocido para el fenotipo de la célula muscular lisa (K.M. McHugh, 1995, *Dev. Dyn.* **204**:278-90), y el principal marcador para el fenotipo miofibroblástico (I. Darby *et al.*, 1990, *Lab. Invest.* **63**:21-9). Durante la diferenciación de la célula muscular, la expresión de actina α -SM se reduce, mientras que la expresión de MyHC rápida se incrementa. El análisis histoquímico de tejidos de vejiga tratados con MDC utilizando marcadores actina α -SM y MyHC rápida demuestra la diferenciación de MDC después de la inyección en el sitio de criolesión. En el día 5 después de la inyección en tejido de vejiga criolesionado, varias MDC (al menos el 20%) muestran tinción con actina α -SM (Figura 5B), indicando que las células están todavía sin diferenciar. Después de 6 meses tras la inyección, sin embargo, virtualmente todas las MDC se han diferenciado en miotubos o miofibras, según se demuestra por una reducción en la tinción de actina α -SM (Figura 5F), con un incremento concomitante en la tinción de MyHC rápida (Figura 5I).

Reinervación del músculo

Debido a que la acetilcolina (Ach) está presente en la unión neuromuscular, puede servir como indicador de la innervación muscular. El análisis histoquímico de tejidos de vejiga tratados con MDC, utilizando el marcador Ach, demuestra la reinervación de las MDC después de la inyección en sitios de criolesión. En el día 3 después de la inyección en tejido de vejiga criolesionado, las MDC inyectadas muestran una innervación mínima, según se indica por las concentraciones relativamente bajas de tinción de Ach (Figura 6A). En el día 15 después de la inyección, se observan concentraciones incrementadas de innervación, según se indica por concentraciones elevadas de tinción de Ach (Figura 6B). En el día 30 después de la inyección, se observa aún más tinción Ach (Figura 6C), indicativa de mayores incrementos en la innervación. A los 6 meses después de la inyección, se observa una innervación extensiva, según se indica mediante tinción Ach sustancial a través del área a la que se inyectaron MDC, observada a baja resolución (Figura 6D). Estos resultados indican que el nervio pélvico está creciendo hacia el área de la vejiga a la que se inyectaron MDC, y sugieren que las MDC pueden mejorar la contractilidad y función del tejido al que se inyectó.

Estudios de fisiología de contractilidad

Para determinar si las MDC inyectadas mejoraban la función de los tejidos de vejiga tratados, se completaron diversos estudios de contractilidad (véase arriba). La Tabla 3 presenta los datos que muestran los parámetros contráctiles del músculo de la vejiga, después de criolesión con o sin inyecciones de MDC.

TABLA 3

Parámetros contráctiles de músculo de vejiga después de criolesión

Nº de grupo		Amplitud de contracción (mN/mg)		Velocidad (contracción)(mN/s)		Nº de muestras
		20Hz/10 descargas	20Hz/80 descargas	20Hz/10 descargas	20Hz/80 descargas	
1	Sham	0,375±0,24	0,697±0,46	18,08±8,15	15,56±8,39	6
	MDC	0,368±0,26	0,812±0,31	16,23±10,3	16,38±7,54	6
2	Sham	0,427±0,17	0,966±0,31	22,96±8,93	24,56±5,03	8
	MDC	0,539±0,24	1,161±0,55	27,86±14,08	30,59±13,05	8
3	Sham	0,389±0,14*	0,708±0,26**	25,70±5,87	24,24±6,38	8
	MDC	0,564±0,16*	1,139±0,29**	30,59±17,8	29,31±15,3	8
4	Normales	0,927±0,23	1,748±0,52	34,23±8,82	29,05±7,06	6

* p<0,05, ** p<0,01

Tabla 3

Los valores son medias±desviaciones estándar. Para análisis estadístico, se realizó el test de Student para los grupos testigo y a los que se inyectó MDC. Grupo N° 1: grupo con lesión grave con inyecciones de MDC inmediatas después de la criolesión. Grupo N° 2: grupo con lesión leve con inyecciones de MDC una semana después de la criolesión. Grupo N° 3: grupo con lesión grave con inyecciones de MDC una semana después de la criolesión. Grupo N° 4: tejido de vejiga normal.

El grupo con lesión grave al que se le inyectaron MDC inmediatamente después de la criolesión (Grupo 1) mostraba una contractilidad similar al grupo testigo (Sham) (comparar niveles de contractilidad mostrados en las filas de sham y MDC en Grupo 1, Tabla 3). Sin embargo, el grupo con lesión grave al que se le inyectaron MDC una semana después de la criolesión (Grupo 3), mostraba una amplitud de contracción incrementada (145% y 161% de la vejiga testigo a 20 Hz/10 descargas y 20 Hz/80 descargas, respectivamente), comparado con el grupo testigo (compárense los niveles de amplitud contráctil mostrados en las filas de sham y MDC, indicados con asteriscos en la Tabla 3). De forma similar, el grupo con lesión grave al que se le inyectaron MDC una semana después de la criolesión (Grupo 3) mostraba una velocidad de contracción incrementada (119% y 121% de la de la tira testigo a 20 Hz/10 descargas y 20Hz/80 descargas, respectivamente), comparado con el grupo testigo (compárense los valores de velocidad contráctil en las filas sham y MDC en el Grupo 3, Tabla 3). El grupo con lesión leve al que se le inyectaron MDC una semana después de la criolesión (Grupo 2), también mostraba una amplitud y velocidad de contracción incrementadas, comparado con el grupo testigo (comparar niveles de contractilidad en filas sham y MDC en el Grupo 2, Tabla 3). Los resultados de estos estudios muestran que las inyecciones de MDC pueden restablecer la contractilidad del tejido muscular de vejiga criolesionado, e indican que las composiciones basadas en MDC se pueden utilizar para el tratamiento de la incontinencia urinaria.

Ejemplo 7

65 *Aumento de tejido blando del miocardio*

Se prepararon ratas SD para cirugía, según se describió anteriormente. Se realizó una incisión torácica para exponer el corazón. Se inyectaron a la pared ventricular 10 µl de suspensión de MDC en HBSS (1-1,5 x 10⁸ células), usando una

ES 2 288 946 T3

microjeringa de Hamilton. En el día 3, el área que rodeaba cada sitio de inyección se extirpó, se preparó para análisis histoquímico, se tiñó para β -galactosidasa para determinar la localización y viabilidad de las células que llevaban el marcador LacZ, se examinó al microscopio y se fotografió. Los resultados de estos experimentos demuestran que las composiciones de MDC se pueden usar como materiales de aumento de tejido blando miocárdico (Figuras 7A y 7B), para el tratamiento de lesión o debilidad secundaria a la insuficiencia cardíaca o infarto de miocardio.

Ejemplo 8

Inyección de MDC en tejidos del hígado, bazo y médula espinal

Se prepararon ratas SD para cirugía según se describió anteriormente. Se realizó una incisión en la línea media del abdomen para exponer el hígado y el bazo. Se inyectaron en ambos sitios 10 μ l de suspensión de MDC en HBSS (1-1,5 x 10⁶ células), usando una microjeringa de Hamilton. Al mismo tiempo, se realizó una incisión en la línea media de la espalda y se realizó una laminectomía parcial para exponer la médula espinal. A los tejidos de la médula espinal a nivel de T10 se les inyectó la suspensión de MDC en HBSS, como se hizo para los tejidos de hígado y bazo. En el día 4, se extirpó el área que rodeaba cada sitio de inyección, se preparó el análisis histoquímico, se tiñó para β -galactosidasa para determinar la localización y viabilidad de las células que llevaban el marcador LacZ, se examinaron microscópicamente y se fotografiaron. Estos experimentos muestran que las composiciones de MDC se pueden usar como materiales de aumento de tejido blando del hígado, bazo y médula espinal (Figuras 8A-8B, 9A-9B, y 10A-10B) para tratar diversas enfermedades o disfunciones del hígado, bazo y médula espinal.

Ejemplo 9

Tratamiento de defectos óseos con MDC

Aislamiento de células derivadas del músculo

Las MDC se obtuvieron de ratones *mdx*, según se describió en el Ejemplo 1.

Aislamiento clonal de células progenitoras PP6 derivadas del músculo

Para aislar clones de la población de células PP6, las células PP6 se transfectaron con un plásmido que contenía los genes LacZ, mini-distrofina y resistencia a neomicina. En resumen, se insertó un fragmento *SmaI/SalI* que contenía el gen de resistencia a neomicina de pPGK-NEO, en el sitio *SmaI/SalI* en el plásmido pIEPlacZ que contenía el gen LacZ, creando el plásmido pNEOlacZ. El fragmento *XhoI/SalI* de DysM3, que contiene la versión corta del gen de distrofina (K. Yuasa *et al.*, 1998, *FEBS Lett.* **425**:329-336; regalo del Dr. Takeda, Japón), se insertó en el sitio *SalI* en el pNEOlacZ, para generar un plásmido que contiene los genes de minidistrofina, LacZ y resistencia a neomicina. El plásmido se linealizó mediante digestión con *SalI*, previamente a la transfección.

Las células PP6 se transfectaron con 10 μ g de plásmido lineal que contenía genes de minidistrofina, LacZ y resistencia a neomicina, usando el reactivo Lipofectamina (Gibco BRL), según las instrucciones del fabricante. A las 72 horas después de la transfección, las células se seleccionaron con 3000 μ g/l de G418 (Gibco BRL) durante 10 días, hasta que aparecieron colonias discretas. Posteriormente, las colonias se aislaron y expandieron para obtener una gran cantidad de las células transfectadas, y luego se ensayaron para expresión de LacZ. Uno de estos clones derivados de PP6, mc13, se usó para estudios posteriores.

Inmunohistoquímica

Se cultivaron en placa células PP6, mc13 y fibroblastos de ratón, en una placa de cultivo de 6 pocillos, y se fijaron con metanol frío durante 1 minuto. Las células se lavaron luego con solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se bloquearon con suero equino al 5% a temperatura ambiente durante 1 hora. Los anticuerpos primarios se diluyeron en PBS como sigue: anti-desmina (1:100, Sigma), CD34 anti-ratón biotinilado (1:200, Pharmingen), Bcl-2 anti-ratón de conejo (1:500, Pharmingen), M-caderina anti-ratón de conejo (1:50, regalo del Dr. A. Wernig), MyoD anti-ratón de ratón (1:100, Pharmingen), miogenina anti-rata de ratón (1:100, Pharmingen), Flk-1 anti-ratón de conejo (1:50, Research Diagnostics), y Sca-1 biotinilado (1:100, Pharmingen). Las células se incubaron con los anticuerpos primarios a temperatura ambiente durante la noche. A continuación, las células se lavaron e incubaron con los anticuerpos secundarios biotinilados apropiados durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se aclararon con PBS, luego se incubaron a temperatura ambiente con estreptavidina 1/300 conjugada con fluorocromo Cy3 durante 1 hora. Luego, las células se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. Para cada marcador, el porcentaje de células teñidas se calculó para 10 campos de células elegidos aleatoriamente.

Se fijaron criosecciones de muestras de músculo de un ratón normal de cuatro semanas de edad (C-57 BL/6J, Jackson Laboratories) con acetona fría durante 2 minutos, y se incubaron previamente en suero equino al 5% diluido en PBS durante 1 hora. Para CD34, Bcl-2 y colágeno tipo IV, se usaron los siguientes anticuerpos: biotina anti-CD34 de ratón (1:200 en PBS, Pharmingen), Bcl2 anti-ratón de conejo (1:1000, Pharmingen), y colágeno tipo IV anti-ratón de conejo (1:100 en PBS, Chemicon). Para la tinción con distrofina, se usó anticuerpo anti-DY10 humana de oveja (dilución 1:250 en PBS) como anticuerpo primario, y la señal se amplificó usando anti-biotina de oveja (dilución 1:250 en PBS), y estreptavidina-FITC (dilución 1:250 en PBS).

ES 2 288 946 T3

Estimulación con rhBMP-2, tinción con osteocalcina y prueba de fosfatasa alcalina

Se cultivaron células en placa por triplicado a una densidad de $1-2 \times 10^4$ células por pocillo en matraces de 12 pocillos revestidos con colágeno. Las células se estimularon mediante la adición de 200 ng/ml de BMP-2 humana recombinante (rhBMP-2) al medio de cultivo. El medio de crecimiento se cambió los días 1, 3 y 5 después del cultivo en placa inicial. Se cultivó un grupo testigo de células en paralelo sin rhBMP-2 añadida. Después de 6 días con o sin estimulación de rhBMP-2, las células se contaron usando un microcitómetro, y se analizaron para expresión de osteocalcina y fosfatasa alcalina. Para tinción de osteocalcina, se incubaron las células con anticuerpos de cabra anti-osteocalcina de ratón (1:100 en PBS, Chemicon), seguido de incubación con anticuerpos anti-cabra conjugados con el fluorocromo Cy3. Para medir la actividad de fosfatasa alcalina, se prepararon lisados celulares y se analizaron usando un kit disponible comercialmente, que utiliza el cambio de color en el reactivo debido a la hidrólisis del fosfato inorgánico procedente de p-nitro-fenil-fosfato (Sigma). El cambio de color resultante se midió en un espectrofotómetro, y los datos se expresaron como unidades internacionales de actividad ALP por litro, normalizados hasta 10^6 células. El significado estadístico se analizó usando el test t de student ($p < 0,05$).

Diferenciación in vivo de células mc13 en linajes miogénicos y osteogénicos

Miogénico

Las células mc13 (5×10^5 células) se inyectaron intramuscularmente en el músculo del cuarto trasero de la extremidad de ratones *mdx*. Los animales fueron sacrificados a los 15 días después de la inyección, y el músculo inyectado se congeló, se seccionó con el criostato y se analizó para distrofina (véase arriba) y expresión de LacZ. Para analizar la expresión de LacZ, las secciones musculares se fijaron con glutaraldehído al 1%, y luego se incubaron con sustrato de X-gal (0,4 mg/ml de 5-bromo-cloro-3-indolil- β -D-galactosido (Boehringer-Mannheim), $MgCl_2$ 1 mM, $K_4Fe(CN)_6$ 5 mM y $K_3Fe(CN)_6$ 5 mM en solución salina tamponada con fosfato) durante 1-3 horas. Las secciones se tiñeron por contraste con eosina previamente al análisis. En experimentos paralelos, las células mc13 (5×10^5 células) se inyectaron intravenosamente en la vena de la cola de ratones *mdx*. Los animales fueron sacrificados a los 7 días después de la inyección, y los cuartos traseros de las extremidades se aislaron y analizaron para la presencia de distrofina y β -galactosidasa, según se describió.

Osteogénico

Para construir el plásmido BMP-2 de adenovirus (adBMP-2), la secuencia codificadora de rhBMP-2 se escindió del plásmido BMP-2-125 (Genetics Institute, Cambridge, MA) y se subclonó en un vector adenovírico defectivo para replicación (genes E1 y E3 eliminados), que contenía el promotor HuCMV. En resumen, el plásmido BMP-2-125 se digirió con Sall, produciendo un fragmento de 1237 pares de bases que contenía el ADNc de rhBMP-2. El ADNc de rhBMP-2 se insertó luego en el sitio Sall del plásmido pAd.lox, que situó el gen bajo el control del promotor HuCMV. Se obtuvo un adenovirus recombinante mediante transfección conjunta de pAd.lox con ADN vírico psi-5 en células CRE-8. El plásmido adBMP-2 resultante se almacenó a $-80^\circ C$ hasta su uso posterior.

Las células mc13 se tripsinizaron y contaron usando un microcitómetro, previamente a la infección. Las células se lavaron varias veces usando HBSS (Gibco BRL). Se mezclaron previamente partículas de adenovirus equivalentes a 50 unidades de multiplicidad de infección, en HBSS y después se depositaron sobre las células. Las células se incubaron a $37^\circ C$ durante 4 horas, y luego se incubaron con un volumen igual de medio de cultivo. Se realizaron inyecciones de $0,5-1,0 \times 10^8$ células, usando una aguja de calibre 30 sobre una jeringa estanca al gas en el tríceps sural expuesto de ratones SCID (Jackson Laboratories). En los días 14-15, los animales se anestesiaron con metoxi-flurano y fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Los cuartos traseros de los miembros se analizaron mediante radiografía. Posteriormente, los tríceps surales se aislaron y se congelaron instantáneamente en 2-metil-butano tamponado con solución salina tamponada con fosfato, y se enfriaron previamente en nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se cortaron en secciones de 5-10 μm usando un criostato (Microm, HM 505 E, Fisher Scientific) y se almacenaron a $-20^\circ C$ para su análisis posterior.

Análisis RT-PCR

El ARN total se aisló usando el reactivo TRIzol (Life Technologies). Se realizó la transcripción inversa usando SuperScript® Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies), según las instrucciones del fabricante. En resumen, se hibridaron 100 ng de hexámeros aleatorios con $1 \mu g$ de ARN total a $70^\circ C$ durante 10 minutos, y luego se enfrió sobre hielo. Se realizó transcripción inversa con $2 \mu l$ 10X tampón de PCR, $2 \mu l$ de $MgCl_2$ 25 mM, $1 \mu l$ de mezcla de dNTP 10 mM, $2 \mu l$ de DTT 0,1 M y 200 U de transcriptasa inversa superscript II. La mezcla de reacción se incubó durante 50 minutos a $42^\circ C$.

Se realizó una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las secuencias elegidas como objetivo, en una mezcla de reacción de $50 \mu l$ que contenía $2 \mu l$ de producto de reacción de transcriptasa inversa, $100 \mu l$ (5U) de ADN polimerasa Taq (Life Technologies), y $MgCl_2$ 1,5 mM. Los cebadores de PCR CD34 se diseñaron usando el conjunto de programas Oligo y tenían las siguientes secuencias: CD34 UP: taa ctt gac ttc tgc tac ca (SEQ ID N°: 1); CD34 DOWN: gtg gtc tta ctg ctg tcc tg (SEQ ID N°: 2). Los otros cebadores se diseñaron según estudios previos (J. Rohwedel *et al.*, 1995, *Exp. Cell Res.* 220:92-100; D.D. Comelison *et al.*, 1997, *Dev. Biol.* 191: 270-283), y tenían las siguientes secuencias: C-MET UP: gaa tgt cgt cct aca cgg cc (SEQ ID N°:3); C-MET DOWN: cac tac aca

ES 2 288 946 T3

gtc agg aca ctg c (SEQ ID N°:4); MNF UP: tac ttc atc aaa gtc cct cgg tc (SEQ ID N°:5); MNF DOWN: gta ctg tgg aac
aga ggc taa ctt (SEQ ID N°: 6); BCL-2 UP: agc cct gtg cca cca tgt gtc (SEQ ID N°:7); BCL-2 DOWN: ggc agg ttt gtc
gac ctg act (SEQ ID N°:8); MYOGENIN UP: caa cca gga gga gcg cga tct cgg (SEQ ID N°:9); MYOGENIN DOWN:
agg cgc tgt ggg agt tgc att cac t (SEQ ID N°:10); MYOD UP: gct ctg atg gca tga tgg att aca gcg (SEQ ID N°:11); y
5 MYOD DOWN: atg ctg gac agg cag tgc agg c (SEQ ID N°:12).

Se usaron los siguientes parámetros de PCR: 1) 94°C durante 45 segundos; 2) 50°C durante 60 segundos (CD34)
o 60°C durante 60 segundos (para miogenina y c-met); y 3) 72°C durante 90 segundos para 40 ciclos. Los productos
se supervisaron mediante geles de agarosa-TBE-bromuro de etidio. Los tamaños de los productos de PCR esperados
10 son: 147 pb para CD34; 86 pb para miogenina; y 370 pb para c-met. Para excluir la posibilidad de contaminación de
ADN genómico, se realizaron dos reacciones de control: 1) transcripción inversa paralela en ausencia de transcriptasa
inversa, y 2) amplificación de β -actina usando un conjunto de cebadores que se extiende hacia el intrón (Clontech).

Prueba de defecto del cráneo

15 Se usaron ratones SCID hembra de 6-8 semanas de edad (Jackson Laboratories), en grupos testigo y experimen-
tales. Los animales se anestesiaron con metoxi-flurano y se colocaron en posición decúbito abdominal sobre la mesa
de operaciones. Usando una cuchilla del número 10, se diseccionó el cuero cabelludo para exponer el cráneo, y se
eliminó el periostio. Se creó un defecto circular en el cráneo de aproximadamente 5 mm de grosor total, usando un
trépano dental, con una penetración mínima de la duramadre. Se sembró una matriz de esponja de colágeno (Helistat®,
Colla-Tec, Inc.) con 0,5-1,0 x 10⁶ MDC, con o sin transducción de adBMP-2, y se colocó en el defecto del cráneo. Se
cerró el cuero cabelludo usando sutura de nylon 4-0, y se proporcionó agua y actividad a los animales. Después de 14
días, se sacrificó a los animales, y se observaron las muestras de cráneo y luego se analizaron al microscopio. Para la
tinción de von Kossa, se fijaron las muestras de cráneo en formaldehído al 4% y luego se empaparon en una solución
25 de AgNO₃ 0,1 M durante 15 minutos. Las muestras se expusieron a la luz durante al menos 15 minutos, se lavaron con
PBS, y luego se tiñeron con hematoxilina y eosina para su observación.

Hibridación de fluorescencia in situ usando sondas Y

30 Las criosecciones se fijaron durante 10 minutos en metanol/ácido acético glacial 3:1 (v:v) y se secaron al aire. Las
secciones se desnaturalizaron después en formamida al 70% en 2 X SSC (NaCl 0,3 M, NaCitrato 0,03 M), pH 7,0 a
70°C durante 2 minutos. Posteriormente, los portas se deshidrataron con una serie de lavados en etanol (70%, 80%
y 95%) durante 2 minutos a cada concentración. La sonda específica del cromosoma Y (Y. Fan *et al.*, 1996, Muscle
Nerve 19:853-860) se biotiniló usando un kit BioNick (Gibco BRL), según las instrucciones del fabricante. La sonda
35 biotinilada se purificó después usando una columna G-50 Quick Spin (Boehringer-Mannheim), y la sonda purificada
se liofilizó junto con 5 ng/ml de ADN de esperma de arenque tratado con ultrasonidos. Previamente a la hibridación,
la sonda se volvió a poner en suspensión en una solución que contenía formamida al 50%, 1 X SSC, y sulfato de
dextrano al 10%. Después de la desnaturalización a 75°C durante 10 minutos, la sonda se colocó sobre las secciones
desnaturalizadas y se dejó hibridar durante la noche a 37°C. Después de la hibridación, las secciones se aclararon con
40 una solución 2 X SSC a pH 7,0 a 72°C durante 5 minutos. Las secciones se aclararon a continuación en solución de
BMS (NaHOC₃ 0,1 M, NaCl 0,5 M, NP-40 al 0,5%, pH 8,0). La sonda hibridada se detectó con avidina marcada con
fluoresceína (ONCOR, Inc). Los núcleos se tiñeron por contraste con 10 ng/ml de bromuro de etidio en medio de
montaje Vectashield (Vector, Inc).

Análisis de marcadores de células mc13

Los marcadores bioquímicos expresados por células mc13, PP6 y fibroblastos se analizaron usando RT-PCR e
inmunohistoquímica. La Tabla 4 (debajo) muestra que las células mc13 expresaban Flk-1, un homólogo de ratón del
gen KDR humano, que se identificó recientemente como un marcador de células hematopoyéticas con características
50 análogas a células madre (B.L. Ziegler *et al.*, arriba), pero no expresaban CD34 o CD35. Sin embargo, otros aislados
clonales derivados de las MDC PP6 de la presente invención expresaban CD34, así como otros marcadores de células
PP6. Los expertos en la técnica podrán apreciar que los procedimientos aquí descritos se pueden usar para clonar la
población de células progenitoras derivadas de músculo PP6, y obtener aislados clonales que expresan marcadores
celulares característicos de las células progenitoras derivadas del músculo. Tales aislados clonales se pueden usar
55 según los métodos de la invención. Por ejemplo, los aislados clonales expresan marcadores de células progenitoras,
incluyendo desmina, CD34, y Bcl-2. Preferiblemente, los aislados clonales también expresan los marcadores celulares
Sca-1 y Flk-1, pero no expresan los marcadores celulares CD45 o c-Kit.

60

65

TABLA 4

Marcadores celulares expresados por *mdx* PP6, *mdx* mc13 y fibroblastos

	Células PP6		Células MC13		Fibroblastos	
	imm	RT-PCR	imm	RT-PCR	imm	RT-PCR
Desmin	+	na	+	na	-	na
CD34	+	+	-	-	-	-
Bcl-2	+	na	+/-	na	-	na
Flk-1	+	na	+	na	-	na
Sca-1	+	na	+	na	-	na
M-caderina	-/+	na	+	na	-	na
Miogenina	+/-	+	+/-	+	-	-
c-met	na	+	na	+	na	-
MNF	na	+	na	+	na	-
MyoD	-/+	+	na	+	na	-
c-Kit	-	na	-	na	na	na
CD45	-	na	-	na	na	na

Tabla 4

Las células se aislaron según se describió anteriormente y se examinaron mediante análisis inmunohistoquímico. “-” indica que 0% de las células mostraban expresión; “+” indica que >98% de las células mostraban expresión; “+/-” indica que 40-80% de las células mostraban expresión; “-/+” indica que 5-30% de las células mostraban expresión; “na” indica que los datos no están disponibles.

Localización *in vivo* de células CD34⁺ y Bcl-2⁺

Para identificar la localización de las células CD34⁺ y Bcl-2⁺ *in vivo*, se tiñeron secciones de tejido muscular del tríceps sural de ratones normales, usando anticuerpos anti-CD34 y anti-Bcl-2. Las células positivas para CD34 constituían una población pequeña de células derivadas de músculos (Figura 12A), que también eran positivas para desmina (Figura 12B). La tinción conjunta de células desmina⁺, CD34⁺ con anticuerpos anticógeno tipo IV las localizó en la lámina basal (Figuras 12B y 12D). Según se indica mediante las cabezas de flecha en las Figuras 12A-D, pequeños vasos sanguíneos también eran positivos para CD34 y colágeno tipo IV, pero no se localizan conjuntamente con la tinción nuclear. La expresión de CD34 por células vasculares endoteliales se ha mostrado en estudios previos (L. Fina *et al.*, arriba). Las células Bcl-2⁺, desmina⁺ se identificaron de forma similar (Figuras 12E-12H) y se localizaron en la lámina basal (Figuras 12F y 12H). Las secciones se tiñeron también para M-caderina para identificar la localización de las células satélite (Figura 12I). Las células satélite se identificaron en localizaciones similares a las células CD34⁺, desmina⁺ o Bcl-2⁺, desmina⁺ (flecha, Figura 12I). Sin embargo, múltiples intentos para localizar conjuntamente CD34 o Bcl-2 con M-caderina fueron infructuosos, sugiriendo que las células que expresan M-caderina no expresan conjuntamente Bcl-2 o CD34. Esto está de acuerdo con las células PP6 que expresan elevadas concentraciones de CD34 y Bcl-2, pero expresan concentraciones mínimas de M-caderina, según se describe aquí.

Diferenciación *in vitro* de células progenitoras musculares clonales en linaje osteogénico

Se valoraron células mc13 para el potencial de diferenciación osteogénica mediante estimulación con rhBMP-2. Las células se cultivaron en placa sobre placas de cultivo de 6 pocillos y se dejaron crecer hasta su confluencia en presencia o ausencia de 200 ng/ml de rhBMP-2. En 3-4 días, las células mc13 expuestas a rhBMP-2 mostraban cambios

morfogénicos notables, comparadas con células sin rhBMP-2. En ausencia de rhBMP-2, las células mc13 empezaban a fusionarse en miotubos multinucleados (Figura 13A). Cuando se exponían a 200 ng/ml de rhBMP-2, sin embargo, las células se mantenían mononucleadas y no se fusionaban (Figura 13B). Cuando la densidad celular alcanzaba >90% de confluencia, el cultivo sin tratar se fusionaba para formar múltiples miotubos (Figura 13C), mientras que las células tratadas se transformaron en circulares e hipertróficas (Figura 13D). Usando inmunohistoquímica, estas células hipertróficas se analizaron para la expresión de osteocalcina. La osteocalcina es una proteína de la matriz que se deposita sobre el hueso, expresada específicamente por osteoblastos. En contraste con el grupo sin tratar, las células hipertróficas tratadas con rhBMP-2 mostraban expresión significativa de osteocalcina (Figura 13E), sugiriendo por tanto que las células mc13 eran capaces de diferenciarse en osteoblastos, después de la exposición a rhBMP-2.

Las células mc13 se analizaron a continuación para la expresión de desmina, después de la estimulación con rhBMP-2. Las células mc13 aisladas recientemente mostraban tinción de desmina uniforme (Figuras 14A y 14B). En 6 días de exposición a rhBMP-2, sólo 30-40% de las células mc13 mostraban tinción con desmina. En ausencia de estimulación con rhBMP-2, aproximadamente 90-100% de células mc13 mostraba tinción con desmina (Figura 14C). Este resultado sugiere que la estimulación de células mc13 con rhBMP-2 produce la pérdida de potencial miogénico para estas células.

Además, las células mc13 se analizaron para la expresión de fosfatasa alcalina después de la estimulación con rhBMP-2. La fosfatasa alcalina se ha usado como marcador bioquímico para diferenciación osteoblástica (T. Katagiri *et al.*, 1994, *J. Cell Biol.*, **127**:1755-1766). Según se muestra en la Figura 14D, la expresión de fosfatasa alcalina de las células mc13 se incrementaba más de 600 veces en respuesta a rhBMP-2. Las células PP1-4, usadas como testigo, no mostraban actividad de fosfatasa alcalina incrementada en respuesta a rhBMP-2 (Figura 14D). Tomados conjuntamente, estos datos demuestran que las células de un aislado clonal PP6, p.ej., células mc13, pueden perder sus marcadores miogénicos y diferenciarse a través del linaje osteogénico, en respuesta a la exposición a rhBMP-2 *in vitro*.

Diferenciación in vivo de células mc13 en linajes miogénico y osteogénico

Para determinar si las células mc13 eran capaces de diferenciarse a través del linaje miogénico *in vivo*, las células se inyectaban en el tejido muscular del cuarto trasero de la extremidad de ratones *mdx*. Los animales eran sacrificados 15 días después de la inyección, y sus cuartos traseros se recogían para análisis histológico e inmunohistoquímico. Varias miofibras mostraban tinción de lacZ y distrofina en la región que rodeaba al sitio de la inyección (Figuras 15A y 15B), indicando que las células mc13 se pueden diferenciar a través del linaje miogénico *in vivo* y mejorar la regeneración del músculo y restablecer la distrofina en el músculo distrófico.

En un experimento paralelo, las células mc13 se inyectaban intravenosamente en la vena de la cola de ratones *mdx*. Los animales eran sacrificados 7 días después de la inyección, y los músculos de los cuartos traseros de las extremidades se recogían para el análisis histológico e inmunohistoquímico. Varias células musculares del cuarto trasero de las extremidades mostraban tinción de LacZ y distrofina (Figuras 15C-15D; véase también ***), sugiriendo que las células mc13 se pueden suministrar sistémicamente hacia el tejido elegido como objetivo para restituir la expresión de distrofina.

Para ensayar las características pluripotentes de las células mc13 *in vivo*, las células se transdujeron con un vector adenovirico que codificaba rhBMP-2 (adBMP-2). Las células mc13 con adBMP-2 se inyectaron a continuación en los cuartos traseros de las extremidades de ratones SCID. Los animales fueron sacrificados a los 14 días después de la inyección, y los cuartos traseros de las extremidades se extrajeron para su análisis histoquímico e inmunológico. Las pruebas de inmunoabsorción enzimática (ELISA) de células mc13 transducidas con adBMP-2 mostraban que las células infectadas eran capaces de producir rhBMP-2. El análisis radiográfico de los cuartos traseros de las extremidades de ratones SCID a los que se había inyectado, revelaba una formación ósea ectópica robusta en el transcurso de 14 días desde la inyección (Figura 15E). El análisis histológico usando tinción de LacZ del hueso ectópico mostraba que las células mc13 positivas para LacZ estaban localizadas uniformemente en la matriz mineralizada de las lagunas, una localización típica en la que se encuentran los osteoblastos y osteocitos (Figura 15F).

Para confirmar adicionalmente el papel de mc13 en la formación de hueso ectópico, las secciones de músculo se tiñeron también para la presencia de distrofina. Según se muestra en la Figura 15G, el hueso ectópico contenía también células muy positivas para distrofina, sugiriendo que las células mc13 están participando íntimamente en la formación del hueso. Como testigo, se realizaron experimentos similares con fibroblastos. Se demostró que los fibroblastos soportaban la formación de hueso ectópico robusta, pero las células inyectadas se encontraron uniformemente en el exterior del hueso, y no se podía encontrar ninguna en la matriz mineralizada. Esto sugiere que los fibroblastos son capaces de suministrar rhBMP-2 para formar hueso ectópico, pero son incapaces de diferenciarse en osteoblastos. En este caso, las células que participan en la mineralización del hueso ectópico se derivan lo más probablemente del tejido hospedador. Por tanto, estos resultados demuestran que las células mc13 se pueden diferenciar en osteoblastos, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Incremento de la cicatrización ósea mediante células derivadas de músculo, modificadas mediante ingeniería genética

Se crearon defectos craneales (aproximadamente 5 mm) en ratones SCID hembra esqueléticamente maduros (6-8 semanas de edad) usando un trépano dental, según se describió anteriormente. Experimentos previos han demostrado

que los defectos craneales de 5 mm son “no cicatrizantes” (P.H. Krebsbach *et al.*, 1998, Transplantation **66**:1272-1278). El defecto craneal se rellenó con una matriz de esponja de colágeno sembrada con células mc13 transducidas o no transducidas con adBMP-2. Estos ratones fueron sacrificados a los 14 días, y se analizó la cicatrización del defecto craneal. Según se muestra en la Figura 16A, el grupo testigo tratado con células mc13 sin rhBMP-2, no mostraba ninguna evidencia de cicatrización del defecto. Como contraste, el grupo experimental tratado con células mc13 transducidas para expresar rhBMP-2, mostraba un cierre casi total del defecto craneal a las dos semanas (Figura 16B). La tinción de Von Kossa, que destaca el hueso mineralizado, mostraba una formación de hueso robusta en el grupo tratado con células mc13 transducidas para expresar rhBMP-2 (Figura 16D), pero se observaba una formación de hueso mínima en el grupo testigo (Figura 16C).

El área de hueso nuevo en el grupo experimental se analizaba mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con una sonda específica del cromosoma Y, para identificar las células transplantadas. Según se muestra en la figura 16E, se identificaron células positivas para el cromosoma Y en el hueso recién formado, indicando la participación activa de las células transplantadas en la formación de hueso, bajo la influencia de rhBMP-2. También se identificaron células negativas para el cromosoma Y en el cráneo recién formado, indicando por tanto asimismo la participación activa de células derivadas del hospedador. Estos resultados demuestran que las células mc13 pueden intervenir en la cicatrización de un defecto óseo “no cicatrizante”, después de estimulación con rhBMP-2, e indican que las MDC de la presente invención se pueden usar en el tratamiento de defectos, lesiones o traumatismos óseos.

Ejemplo 10

Tratamiento de MDSC no autólogas (alógenas) de defectos óseos

Métodos

Los ratones normales (C57BL/6J), o *mdx* (ratones C57BL/10ScSn *mdx/mdx*) usados en los experimentos descritos en este Ejemplo se adquirieron de los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME), y se usaron como donadores y hospedadores, respectivamente.

Para la preparación de cultivos de células madre derivadas de músculo (MDSC) y células satélite (scs), se extirparon los músculos de los cuartos traseros de las extremidades de ratones normales recién nacidos (3-5 días de edad), y las células musculares se disociaron enzimáticamente mediante adición de colagenasa tipo XI al 0,2% durante 1 hora a 37°C. Se añadieron 2,4 unidades/ml de dispasa durante 45 minutos y tripsina al 0,1% durante 30 minutos. El extracto de células musculares se cultivó a continuación en placa sobre matraces recubiertos con colágeno en medio de proliferación (DMEM que contenía suero equino al 10%, suero bovino fetal al 10%, extracto de embrión de pollo al 0,5% y penicilina/estreptomicina al 1%). Las scs de las preplacas tempranas se unían al sustrato del matraz en 1-4 días, mientras que las MDSC tardaban 5-7 días (p.ej., PP5-6), según se describió.

0,35-0,74 x 10⁶ células tanto de la preplaca tardía (LP), (PP5 o PP6) y de la preplaca temprana (EP), (PP1-2), se inyectaban en cada músculo del cuarto trasero de la extremidad de ratones *mdx*, mediante inyección en un punto único. Los músculos inyectados se extirparon a los 10 y 30 días después del trasplante, respectivamente, y se congelaron en nitrógeno líquido. Se prepararon las criosecciones del músculo inyectado para análisis inmunohistoquímico. Para análisis inmunohistoquímico sobre las secciones transversales de músculo, se realizó tinción de distrofina. La tinción se observó usando microscopía de fluorescencia (Nikon Optiphot), y se contó el número de células positivas para distrofina (distrofina+).

Se observó un gran injerto con un número inmenso de miofibras distrofina+ en el músculo al que se inyectaron MDSC[LP] alrededor de diez días después de la inyección (Figs. 17C y 17D). Comparado con el músculo al que se habían inyectado MDSC[EP] (Figs. 17A y 17B), el injerto MDSC[LP] contenía muchas más miofibras pequeñas, sugiriendo por tanto que las células MDSC[LP] inyectadas poseen una elevada capacidad proliferativa elevada *in vivo*. En ambos músculos, se inyectaba el mismo número de células musculares. El número de miofibras distrofina+ en el músculo al que se inyectaban MDSC[LP] era aproximadamente 5 veces superior que el del músculo al que se inyectaban MDSC[EP] (scs), (2.798+/- 1.114, n=4 en mdsc frente a 430 +/- 148, n=6 en EP; Promedio +/- SD).

Además, un gran número de miofibras distrofina+ estaba presente en el injerto a los 30 días después de la inyección de MDSC[LP] (Figs. 17E y 17F). Según se describió anteriormente, la mayoría de las miofibras distrofina+ que se habían formado alrededor de 10 días después de la inyección sobrevivían 20 días más tarde, el día 30. Se descubrió que las MDSC de la placa tardía (p.ej., PP5-6) originaban más células satélite en el músculo hospedador que las células de la placa temprana (p.ej., PP1-2), lo que podría contribuir al elevado número de miofibras distrofina+ en el músculo al que se había inyectado la placa tardía. Las células madre derivadas del músculo mejoraban significativamente la eficiencia del trasplante de células en músculo distrófico. Además de la elevada capacidad de autorrenovación confirmada en células de la placa tardía, las células MDSC evitan el rechazo autoinmunitario, que es probablemente un factor responsable de la elevada tasa de supervivencia de las células de la placa tardía en músculo hospedador no autólogo.

Ejemplo 11

Aumento del disco vertebral

5 Se prepararon conejos hembra para cirugía en posición lateral bajo anestesia de halotano. Se realizó una incisión periespinal en la región del nivel espinal T4-L2, para exponer los discos. Se inyectó a los discos 10 μ l de una suspensión de células progenitoras derivadas del músculo, que llevaban el marcador LacZ, en HBSS (1-1,5 X 10⁶ células), usando una microjeringa de Hamilton. En el día 10 después de la inyección, el disco se extirpó, se preparó para análisis histoquímico, se tiñó para β -galactosidasa para determinar la localización y viabilidad de las células que llevaban el
10 marcador Lac-Z, se examinó al microscopio y se fotografió. Los resultados de estos experimentos demuestran que las composiciones de MDC se pueden usar como materiales de aumento del disco. (Figs. 20A y 20B) para el tratamiento de síntomas congénitos, degenerativos o traumáticos de los discos, lesiones, o enfermedades que incluyen el dolor de espalda y las deficiencias de los discos y la columna vertebral.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de una composición que comprende (i) células progenitoras derivadas de músculo (MDC) aisladas, que expresan desmina, que tienen una supervivencia a largo plazo elevada *in situ*, o una de sus poblaciones clonales, y (ii) un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para uso en el aumento o abultamiento del tejido muscular esofágico o tejido muscular gastroesofágico en un mamífero, en la que la composición está presente en una cantidad suficiente para aumentar o abultar el tejido muscular esofágico o gastroesofágico.

10 2. Uso de una composición que comprende (i) células progenitoras derivadas de músculo (MDC) aisladas, que expresan desmina, que tienen una supervivencia a largo plazo elevada *in situ*, o una de sus poblaciones clonales, y (ii) un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para uso en el aumento o abultamiento del tejido muscular del esfínter en un mamífero, en el que la composición está presente en una cantidad suficiente para aumentar o abultar el tejido muscular del esfínter.

15 3. Uso de una composición que comprende (i) células progenitoras derivadas de músculo (MDC) aisladas, que expresan desmina, que tienen una supervivencia a largo plazo elevada *in situ*, o una de sus poblaciones clonales, y (ii) un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para uso en el aumento o abultamiento de un tejido seleccionado de tejido muscular vesical, ureteral o uretral en un mamífero, en el que la composición está presente en una cantidad suficiente para aumentar o abultar el tejido vesical, ureteral o uretral.

20 4. Uso de una composición que comprende (i) células progenitoras derivadas de músculo (MDC) aisladas, que expresan desmina, que tienen una supervivencia a largo plazo elevada *in situ*, o una de sus poblaciones clonales, y (ii) un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para uso en el aumento o abultamiento de un defecto cosmético o estético de un tejido blando en un mamífero, en el que la composición está presente en una cantidad suficiente para aumentar o abultar el defecto cosmético o estético.

25 5. Uso según la reivindicación 4, en el que el defecto cosmético o estético se selecciona del grupo formado por arrugas, depresiones cutáneas de origen no traumático, ritides, marcas de estiramiento, cicatrices deprimidas, cicatrización de acné vulgar, hipoplasia del labio, depresiones faciales, lesiones dermatológicas y depresiones faciales alrededor de los ojos.

30 6. Uso de una composición que comprende (i) células progenitoras derivadas de músculo (MDC) aisladas, que expresan desmina, que tienen una supervivencia a largo plazo elevada *in situ*, o una de sus poblaciones clonales, y (ii) un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para uso en el aumento o abultamiento de un tejido que comprende uno o más de una depresión cutánea, herida, fisura u orificio en un mamífero, en el que la composición está presente en una cantidad suficiente para aumentar o abultar la depresión cutánea, herida, fisura u orificio.

35 7. Uso según la reivindicación 6, en el que la depresión cutánea, herida, fisura u orificio se selecciona de lesiones, divertículos, quistes, fístulas, aneurismas y heridas por lesión, traumatismo, cirugía o enfermedad.

40 8. Uso de una composición que comprende (i) células progenitoras derivadas de músculo (MDC) aisladas, que expresan desmina, que tienen una supervivencia a largo plazo elevada *in situ*, o una de sus poblaciones clonales, y (ii) un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para uso en el aumento o abultamiento de tejido muscular en un mamífero, en el que la composición está presente en una cantidad suficiente para aumentar o abultar el tejido muscular; estando seleccionado dicho tejido de (a) tejido digestivo seleccionado del grupo formado por tejido estomacal, intestinal, lingual, esofágico, pilórico y anal; (b) tejido reproductivo seleccionado del grupo formado por tejido uterino, vaginal, clitorídeo, de las trompas de falopio, cervical, penil y del conducto deferente; (c) tejido urológico seleccionado del grupo formado por tejido renal, vesical, uretral, ureteral y del esfínter; o (d) tejido respiratorio seleccionado del grupo formado por tejido traqueal y pulmonar.

45 9. Uso según la reivindicación 8, en el que el aumento o abultamiento trata una debilidad o disfunción que es (a) derivada de una lesión relacionada con los deportes; o (b) seleccionada del grupo formado por reflujo vesico-ureteral, incontinencia urinaria, incontinencia fecal y reflujo gastroesofágico.

50 10. Uso de una composición que comprende (i) células progenitoras derivadas de músculo (MDC) aisladas, que expresan desmina, que tienen una supervivencia a largo plazo elevada *in situ*, o una de sus poblaciones clonales, y (ii) un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para uso en el aumento o abultamiento de (a) tejido blando no muscular, o (b) tejido blando no muscular ni óseo en un mamífero, en el que la composición está presente en una cantidad suficiente para aumentar o abultar (a) el tejido blando no muscular, o (b) el tejido blando no muscular ni óseo.

55 11. Uso según la reivindicación 10, en el que el aumento o abultamiento produce la reparación de un defecto seleccionado del grupo formado por lesiones, fisuras, divertículos, quistes, fístulas, aneurismas, heridas por lesión, traumatismo, cirugía y enfermedad en el tejido blando no muscular, o en el tejido blando no muscular ni óseo.

ES 2 288 946 T3

12. Uso según la reivindicación 10, en el que el tejido blando no muscular ni óseo es a) tejido digestivo seleccionado del grupo formado por tejido oral, estomacal, intestinal, esofágico, pilórico, pancreático, hepático, de la vesícula biliar y anal; (b) tejido reproductivo seleccionado del grupo formado por tejido uterino, vaginal, clitorídeo, de las trompas de falopio, bulbar, cervical, penil, escrotal, testicular y del conducto deferente; (c) tejido urológico seleccionado del grupo formado por tejido renal, vesical, uretral, ureteral y del esfínter; (d) tejido respiratorio seleccionado del grupo formado por tejido traqueal y pulmonar; (e) tejido neural seleccionado del grupo formado por tejido nervioso, de la médula espinal, de los discos vertebrales y cerebral; y (f) tejido epitelial seleccionado del grupo formado por tejido epitelial y luminal.
13. Uso de una composición que comprende (i) células progenitoras derivadas de músculo (MDC) aisladas, que expresan desmina, que tienen una supervivencia a largo plazo elevada *in situ*, o una de sus poblaciones clonales, y (ii) un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para uso en el restablecimiento o mejora de la contractilidad del músculo liso, en el que el músculo liso es músculo liso gastrointestinal, seleccionado del grupo formado por músculo liso esofágico, músculo liso estomacal, músculo liso pilórico y músculo liso intestinal; y en el que además la composición está presente en una cantidad suficiente para restablecer o mejorar la contractilidad del músculo liso.
14. Uso según la reivindicación 13, en el que el restablecimiento o mejora del músculo liso gastrointestinal produce una mejora o corrección de la gastroparesis.
15. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 o 13, en el que la MDC contenida en la composición del medicamento contiene ADN heterólogo que codifica una o más biomoléculas activas, y en el que las biomoléculas se expresan por las células, ayudando así al tratamiento del tejido, en el que la biomolécula activa se selecciona del grupo formado por uno o más factores de crecimiento, factores de diferenciación celular, factores de señalización celular y factores de muerte celular programada.
16. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 o 13, en el que el vehículo comprende un material absorbente o adherente.
17. Uso según la reivindicación 16, en el que el vehículo es un material de esponja de colágeno.
18. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que la composición adicionalmente mejora o trata la debilidad o disfunción en el tejido.
19. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 o 13, en el que el medicamento es susceptible de inyectarse en el tejido o de administrarse endoscópicamente.
20. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 o 13, en el que la composición comprende MDC que son autólogas respecto del tejido.
21. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 o 13, en el que la composición comprende MDC que son alogénicas respecto del tejido.
22. Uso según las reivindicaciones 20 o 21, en el que la composición comprende MDC obtenidas de una fuente humana.

50

55

60

65



FIG. 1A

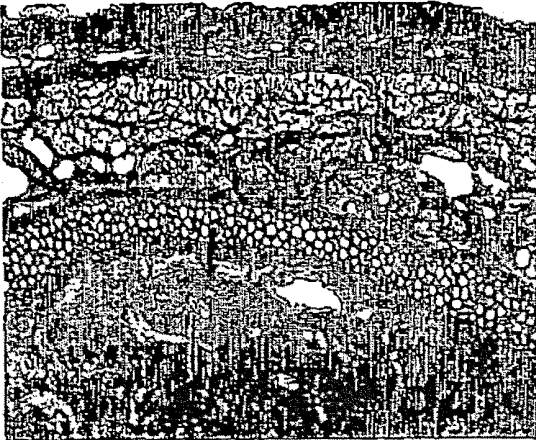


FIG. 1D



FIG. 1B

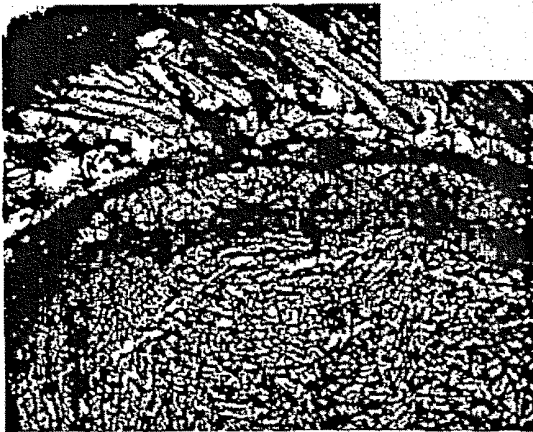


FIG. 1E



FIG. 1C

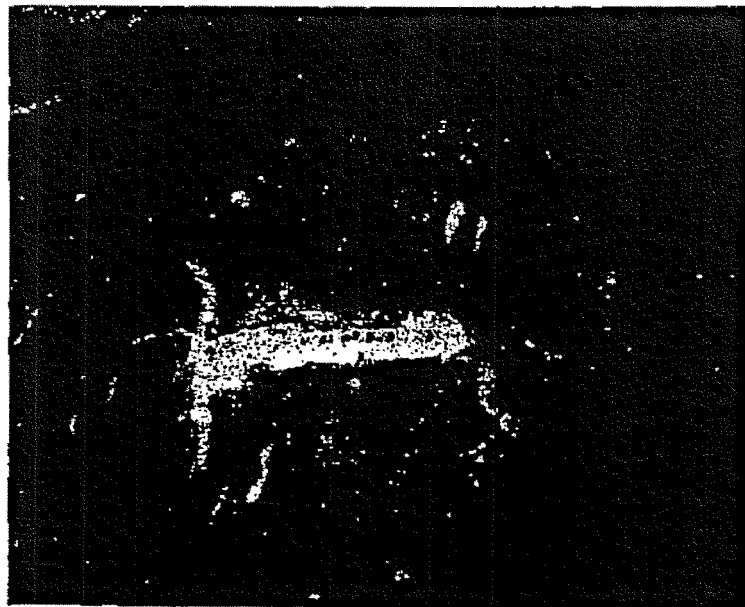


FIG. 1F



X 100

FIG. 2A



X 40

FIG. 2B



FIG. 3A

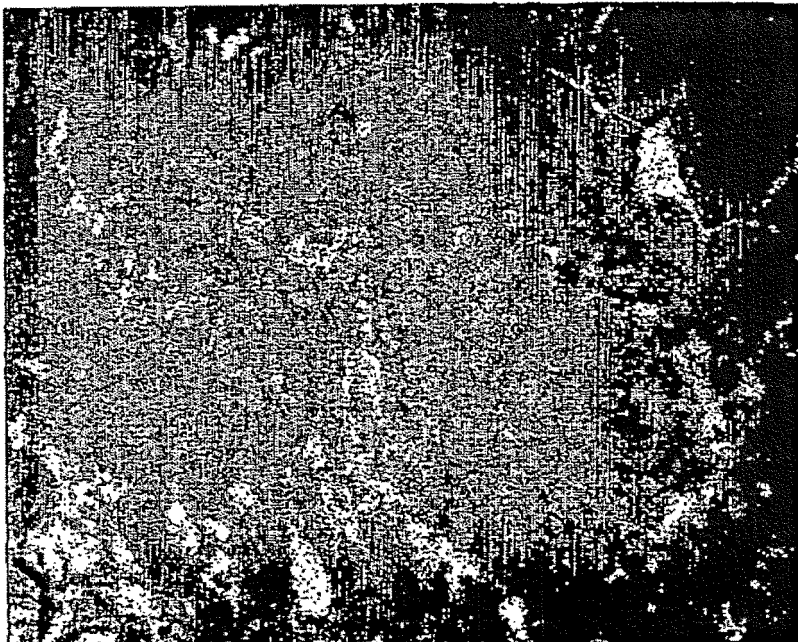


FIG. 3B

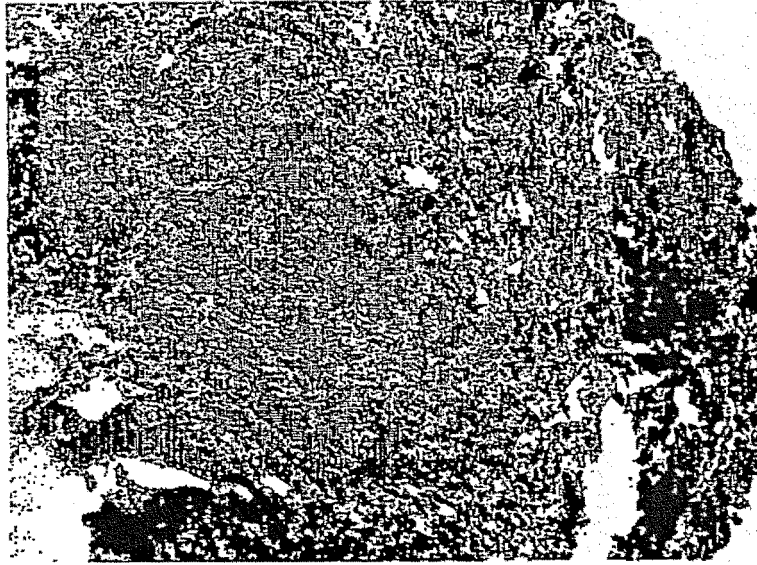


FIG. 4A



FIG. 4B



FIG. 5C



FIG. 5B



FIG. 5A



FIG. 5F



FIG. 5E



FIG. 5D



FIG. 5I



FIG. 5H

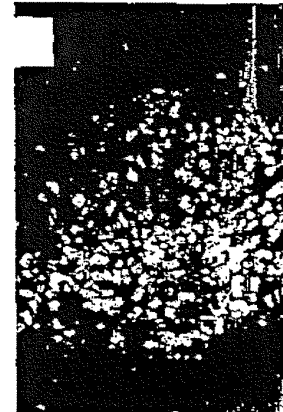


FIG. 5G

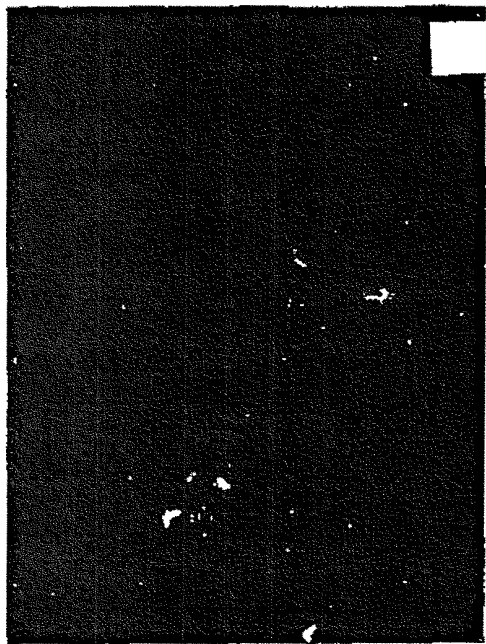


FIG. 6B

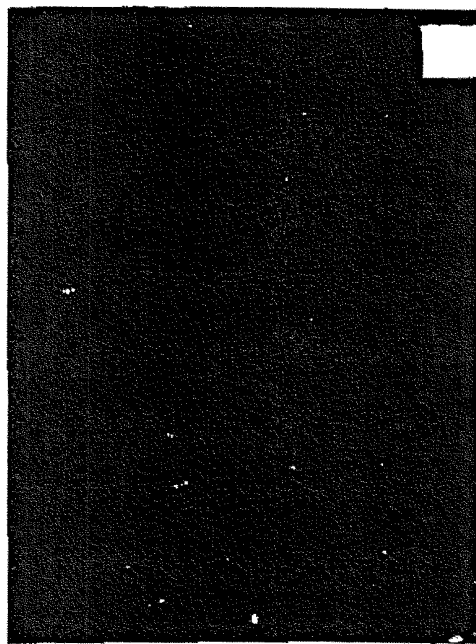


FIG. 6D

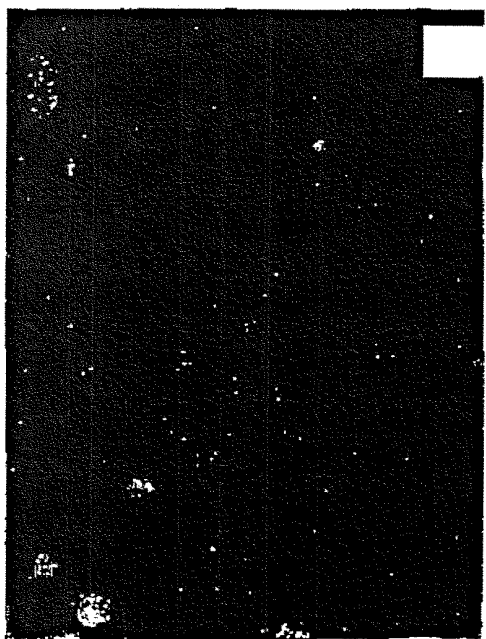


FIG. 6A

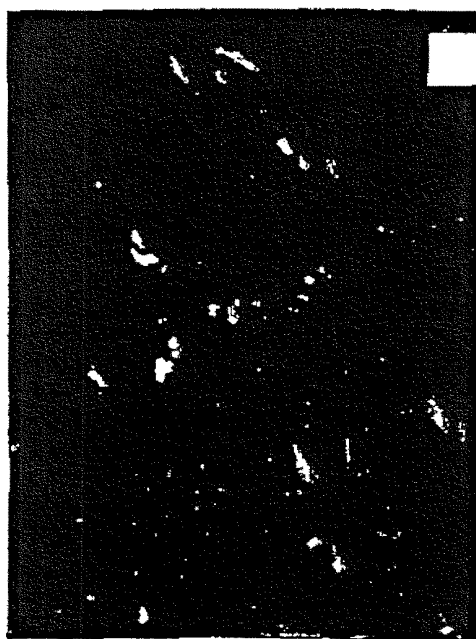


FIG. 6C



FIG. 7A

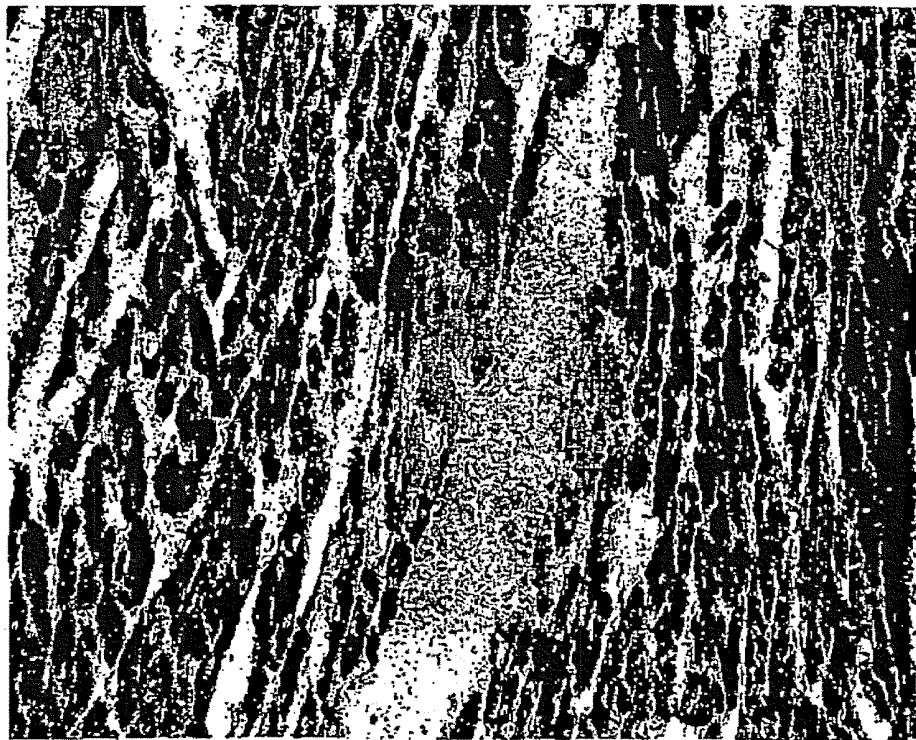


FIG. 7B

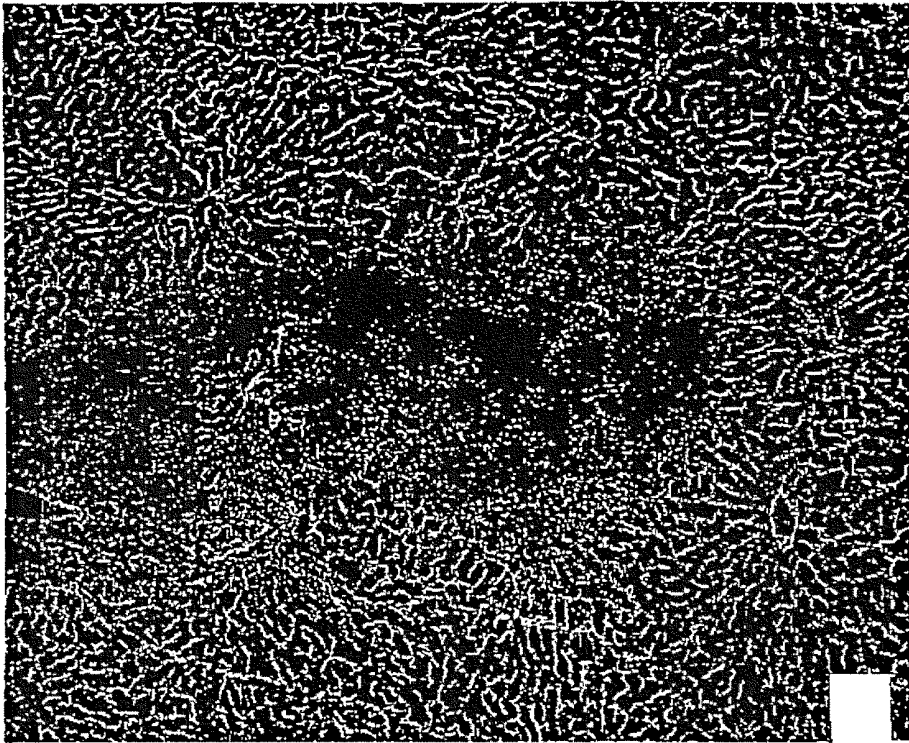


FIG. 8A

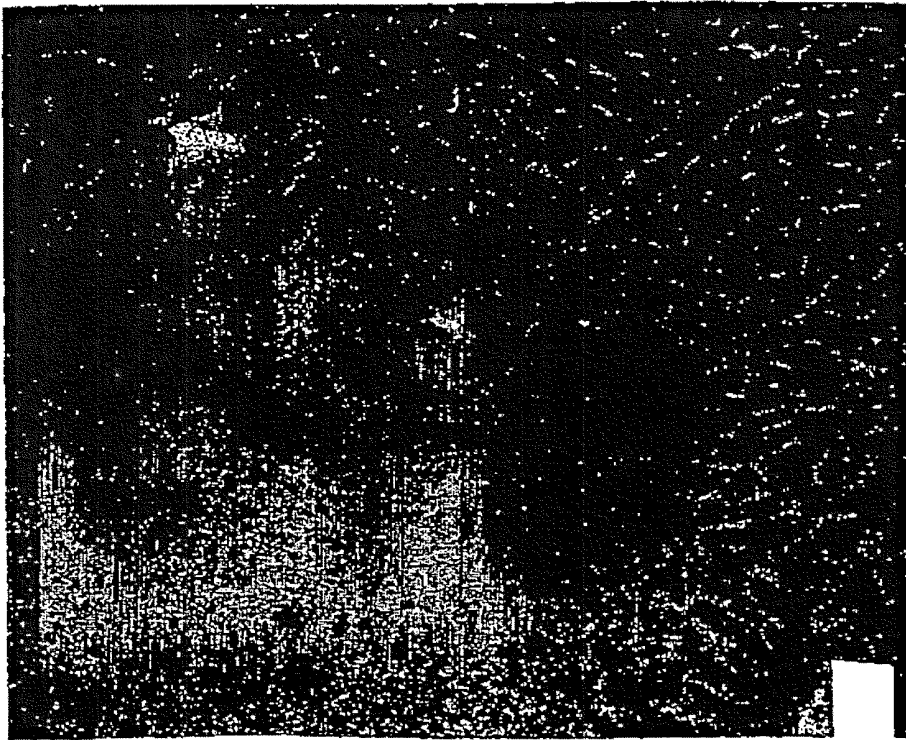


FIG. 8B

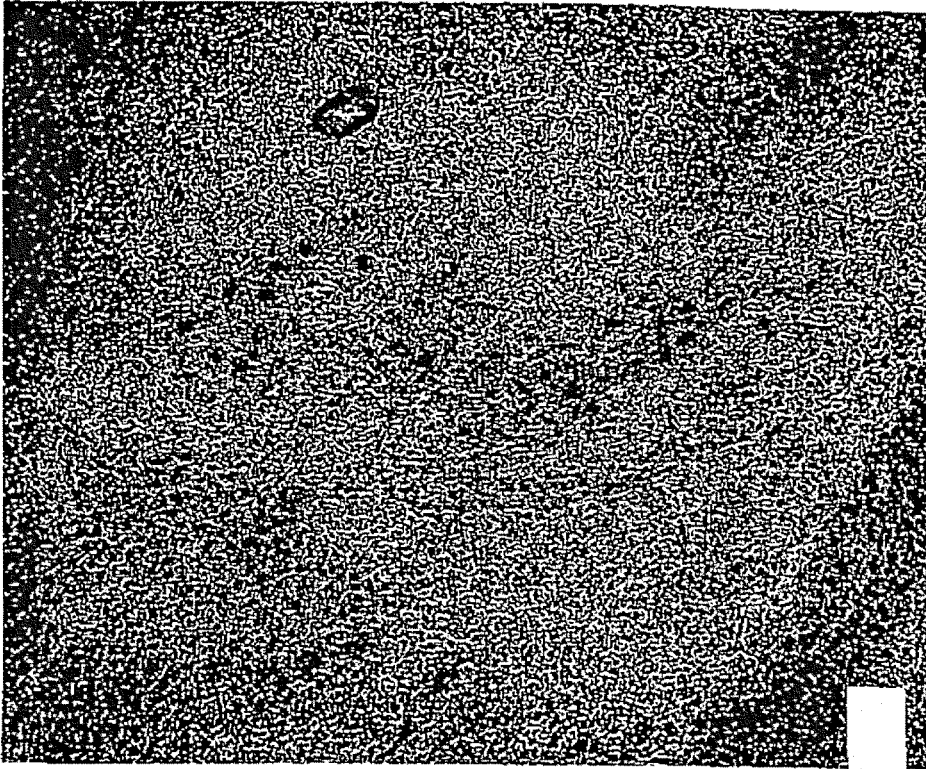


FIG. 9A

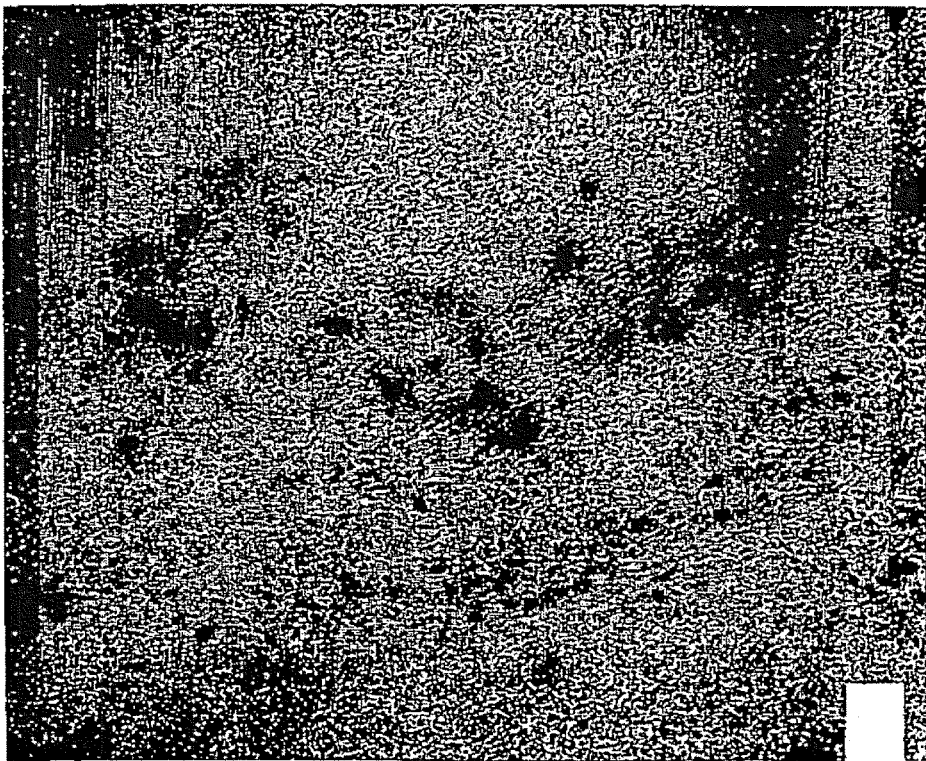


FIG. 9B



FIG. 10A

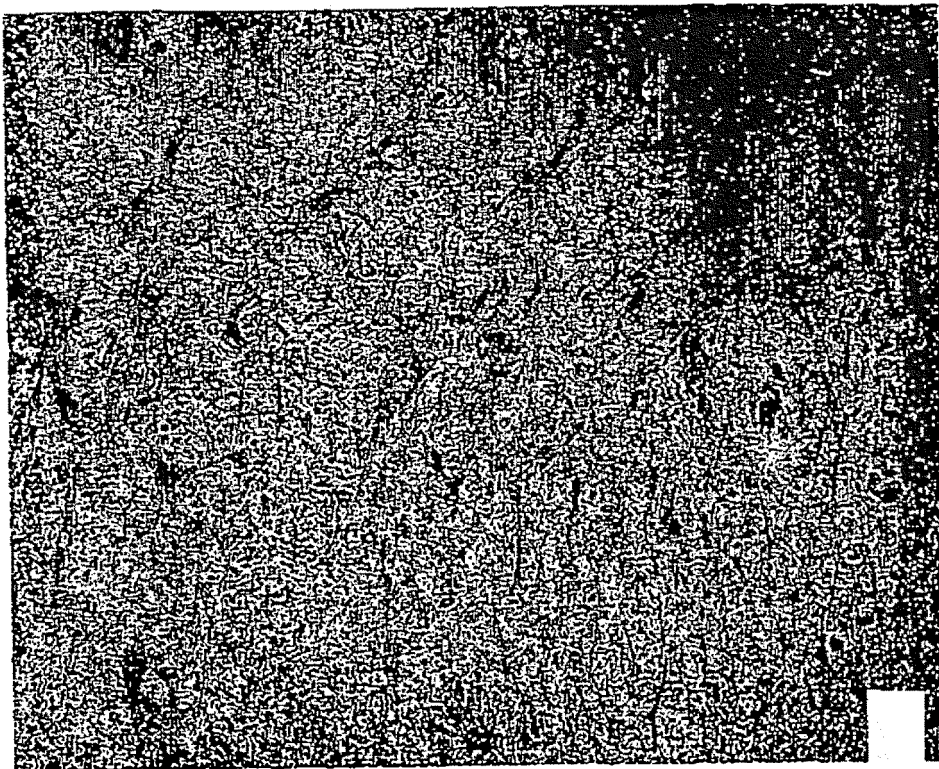
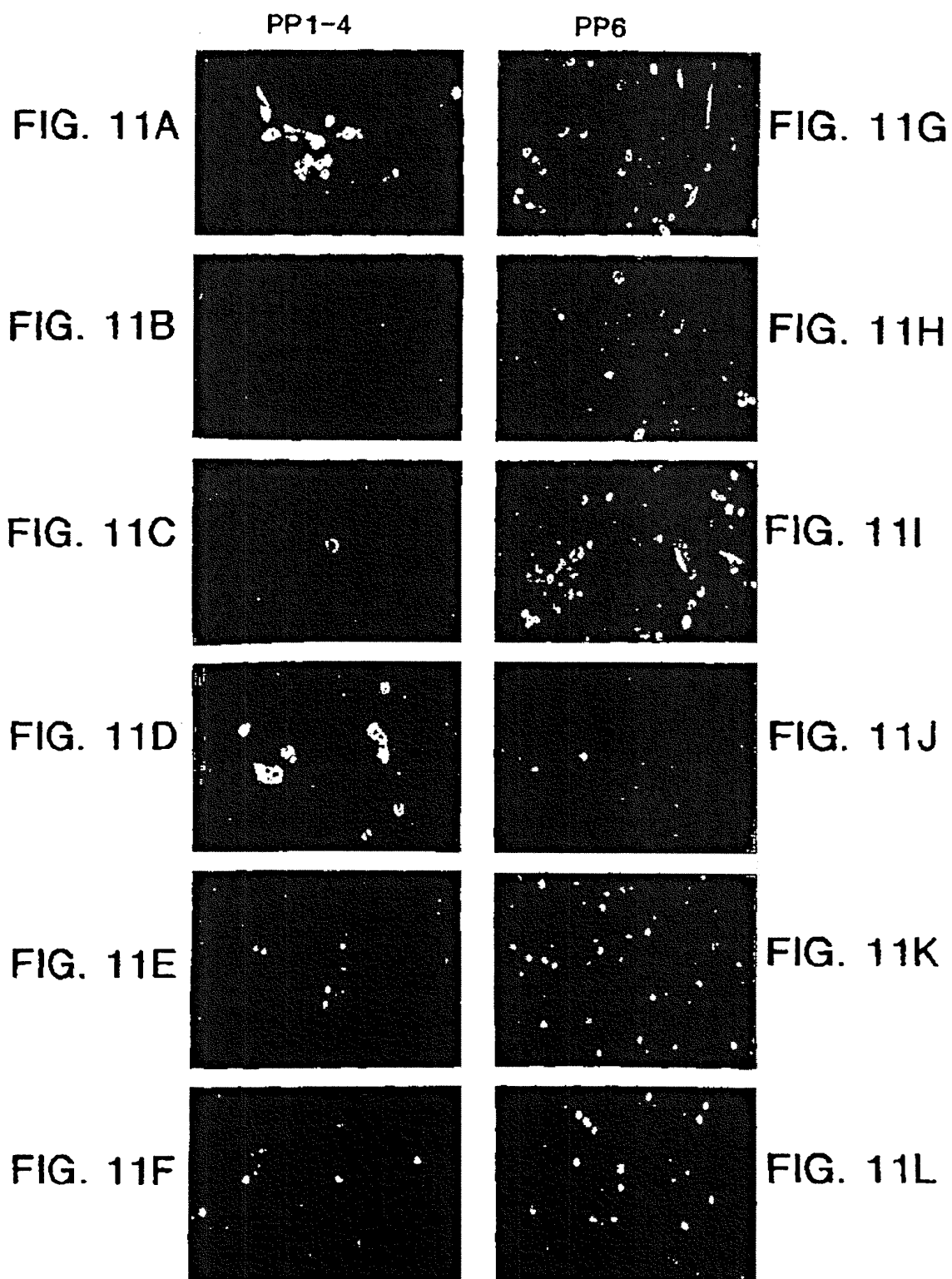


FIG. 10B



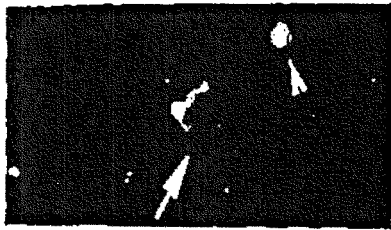


FIG. 12A

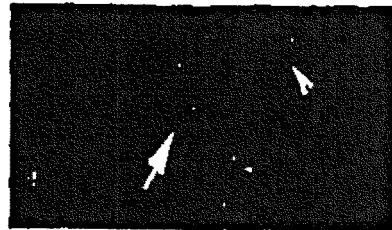


FIG. 12B

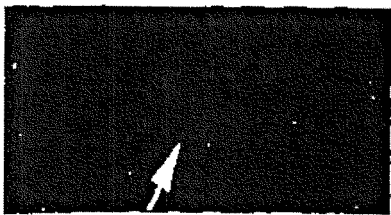


FIG. 12C

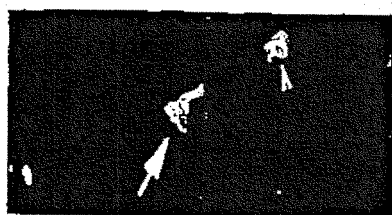


FIG. 12D

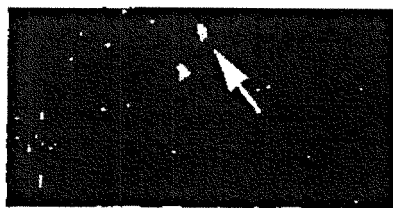


FIG. 12E

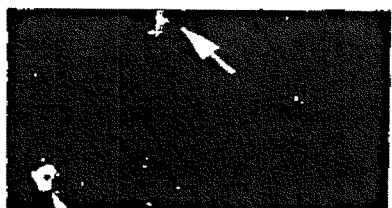


FIG. 12F

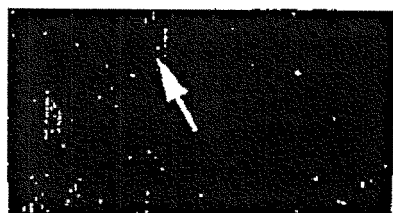


FIG. 12G

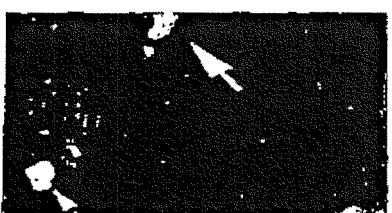


FIG. 12H



FIG. 12I



FIG. 13A



FIG. 13B



FIG. 13C

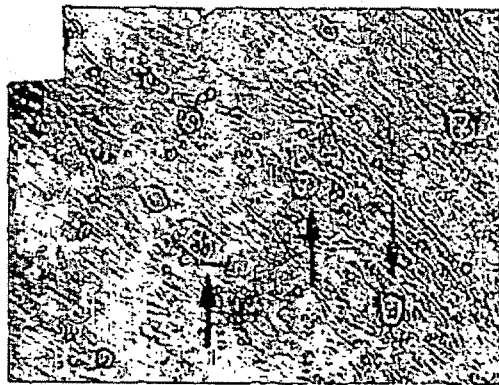


FIG. 13D

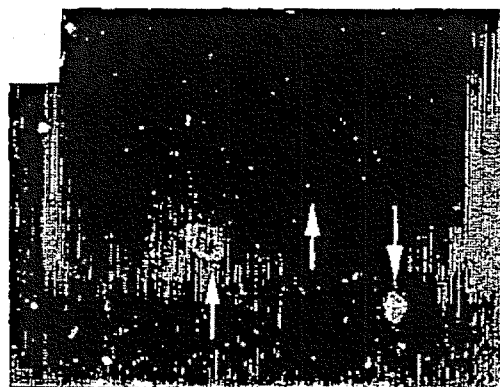


FIG. 13E

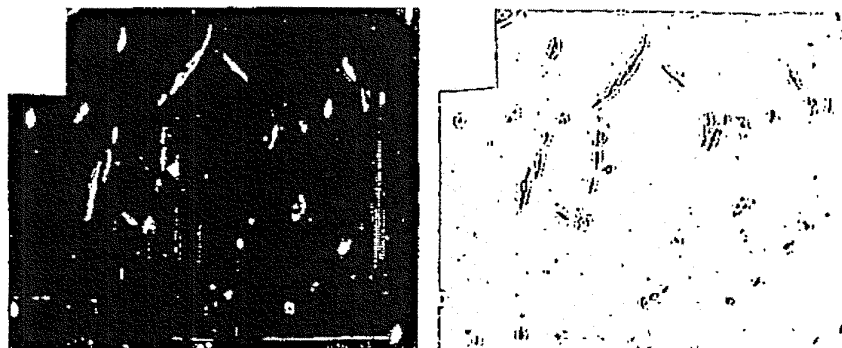


FIG. 14A

FIG. 14B

FIG. 14C

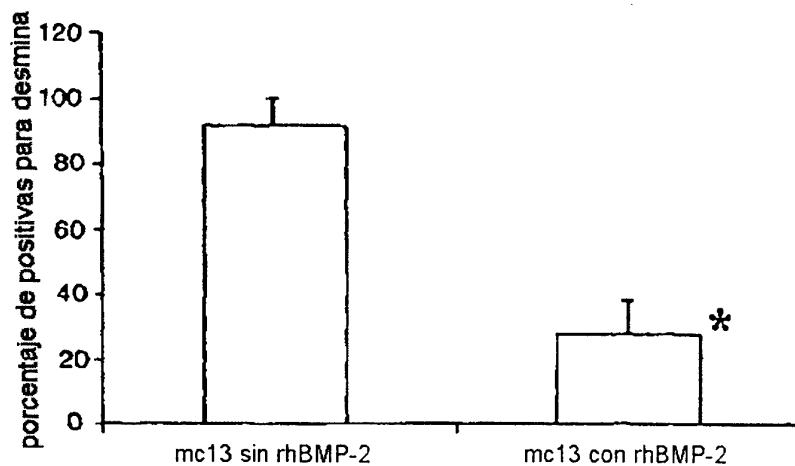


FIG. 14D

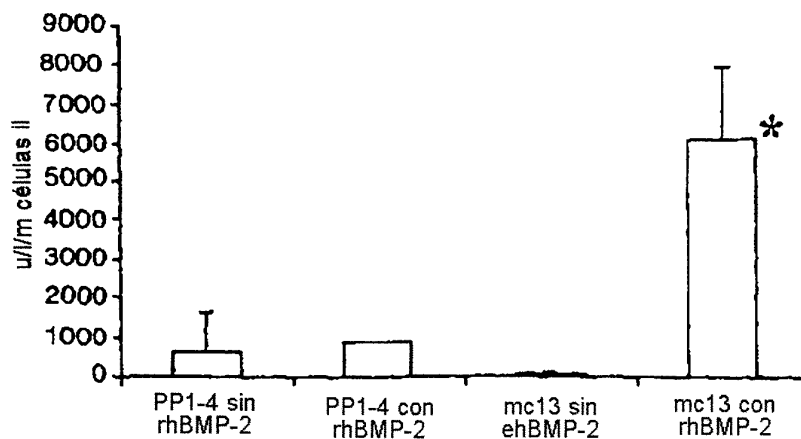




FIG. 15A

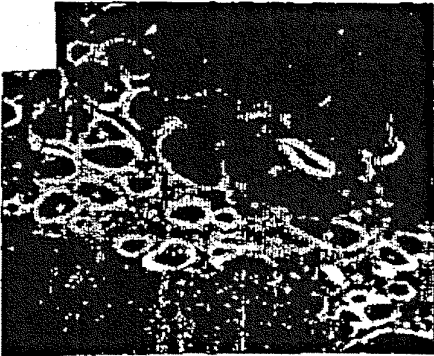


FIG. 15B



FIG. 15C

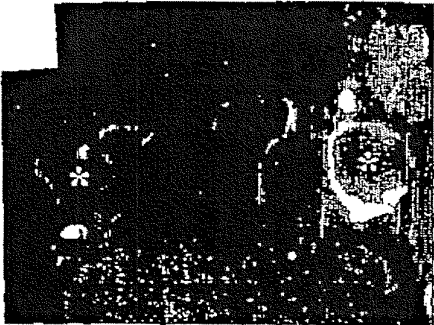


FIG. 15D

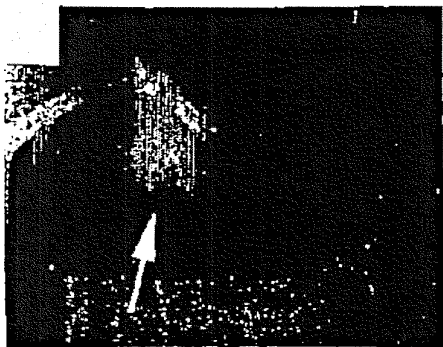


FIG. 15E

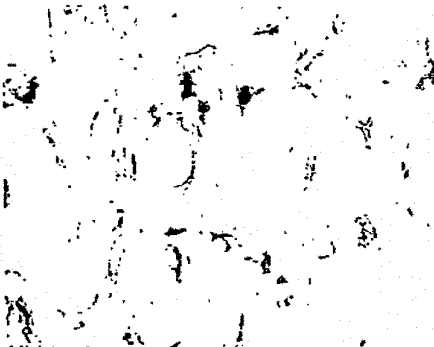


FIG. 15F

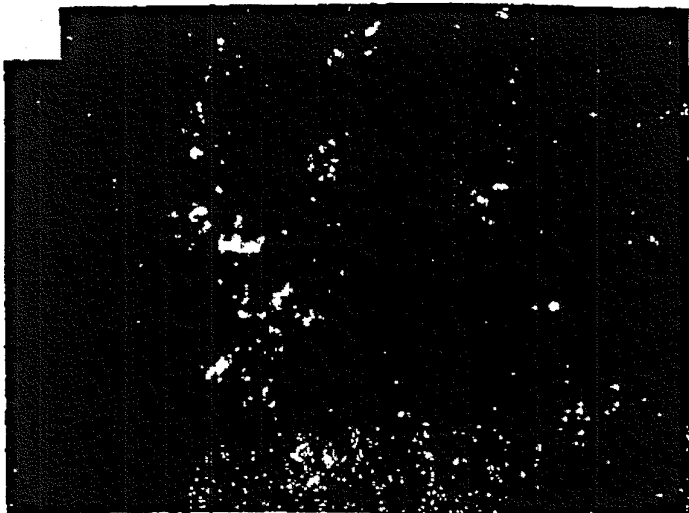


FIG. 15G



FIG. 16A



FIG. 16B

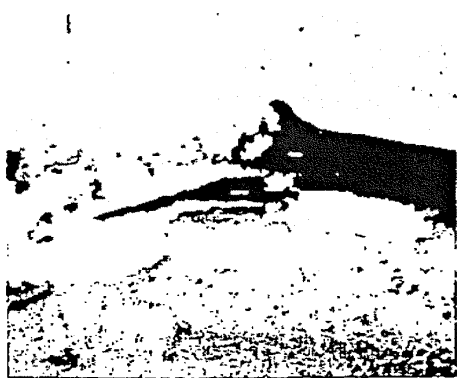


FIG. 16C



FIG. 16D

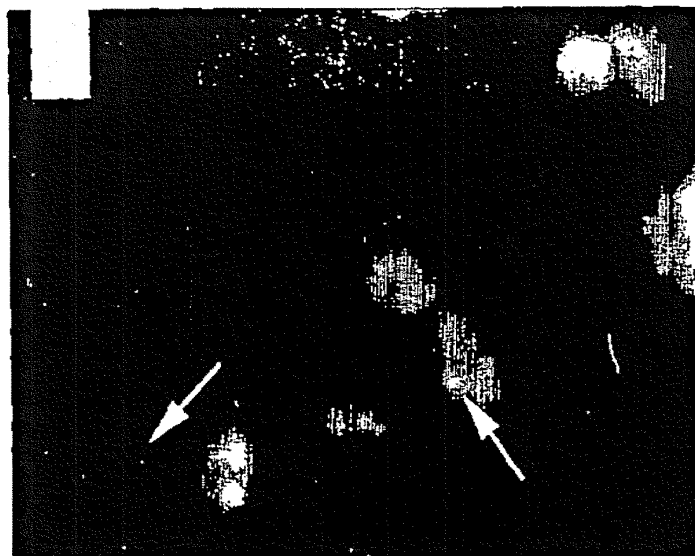


FIG. 16E



FIG. 17A

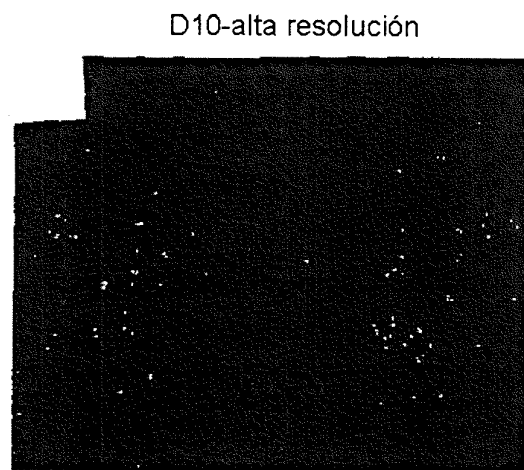


FIG. 17B

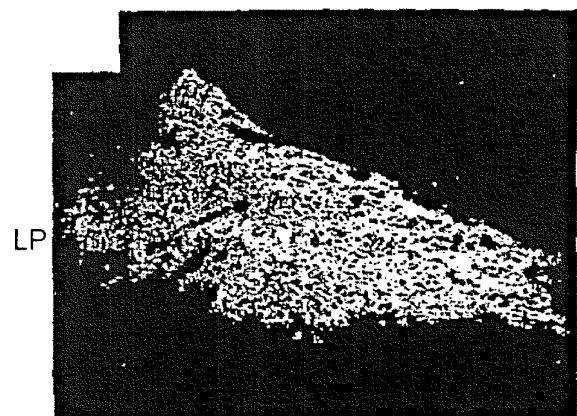


FIG. 17C

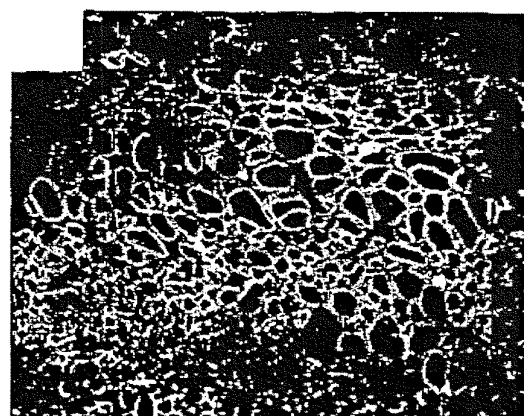


FIG. 17D

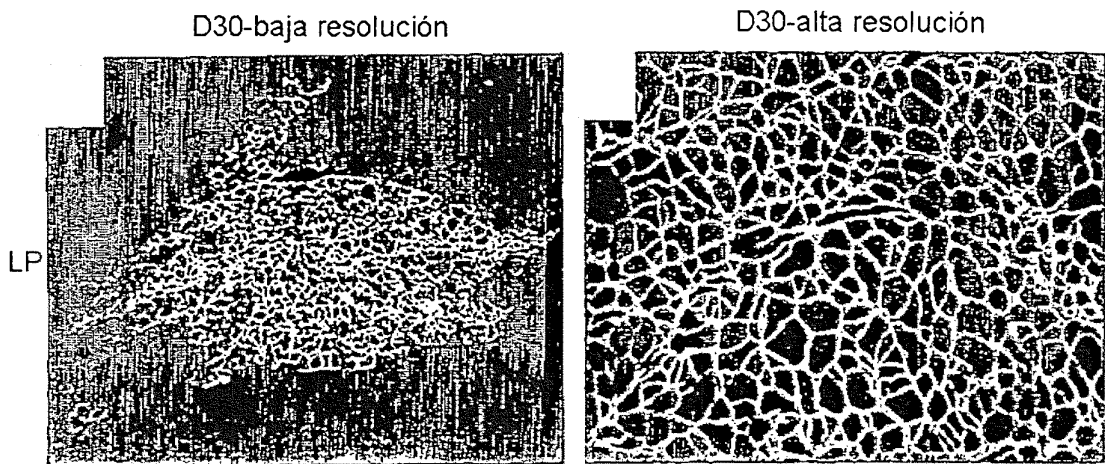
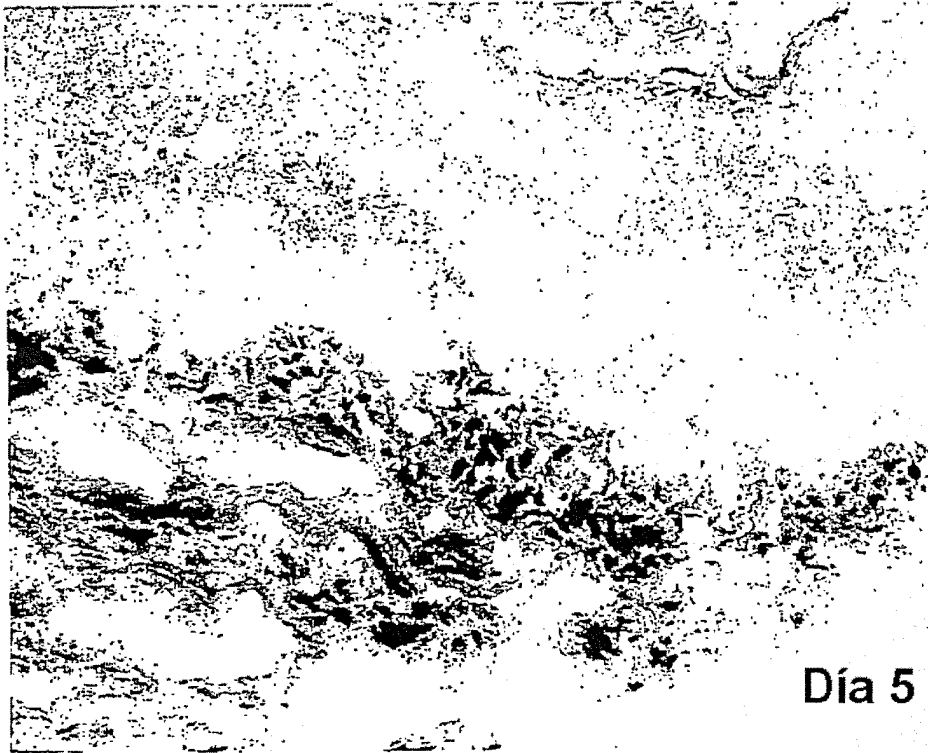


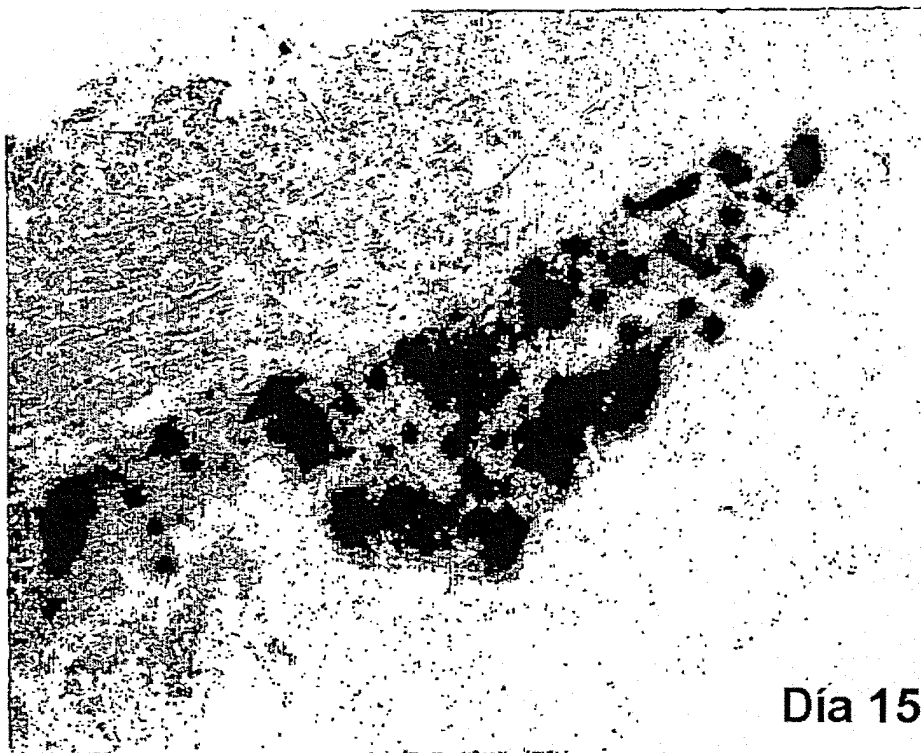
FIG. 17E

FIG. 17F



Día 5

FIG. 18A



Día 15

FIG. 18B

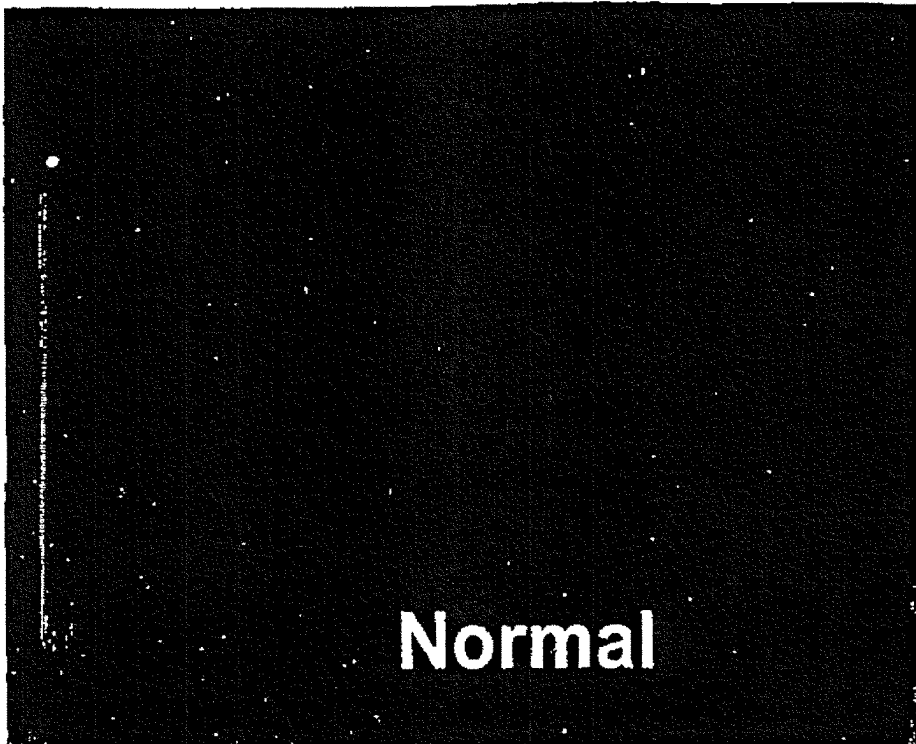


FIG. 19A



FIG. 19B



FIG. 20A

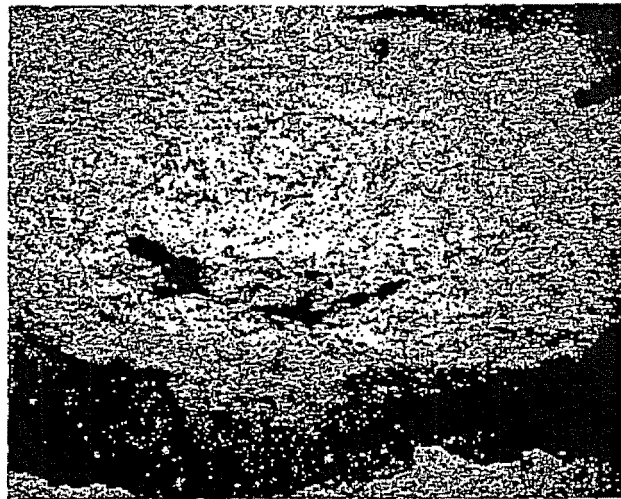


FIG. 20B

ES 2 288 946 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> University of Pittsburgh
200 Gardner Steel Conference Center
Thackeray & O'Hara Streets
Pittsburgh, PA 15260
- 10 <120> AUMENTO Y ABULTAMIENTO DE TEJIDO BLANDO Y HUESO UTILIZANDO CÉLULAS PROGENI-
TORAS DERIVADAS DE MÚSCULO, SUS COMPOSICIONES Y TRATAMIENTOS
- <130> 2710007PC2
- 15 <140> POR ASIGNAR
<141> 2001-04-12
- <150> US09/549.937
- 20 <151> 200-04-14
- <160> 12
- 25 <170> PatenIn versión 2.1
- <210> 1
<211> 20
- 30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
- 35 <223> Descripción de secuencia artificial: CD34 UP
SECUENCIA OLIGONUCLEÓTIDA
- <400> 1
- 40 taacttgact tctgtacca 20
- <210> 2
- 45 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: CD34 DOWN
SECUENCIA OLIGONUCLEÓTIDA
- 55 <400> 2
- gtggtcttac tgctgcctg 20
- 60 <210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 65

ES 2 288 946 T3

	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: C-MET UP SECUENCIA OLIGONUCLEÓTIDA	
5	<400> 3	
	gaatgctgctc ctacacggcc	20
10	<210> 4 <211> 22 <212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: C-MET DOWN SECUENCIA OLIGONUCLEÓTIDA	
20	<400> 4	
25	cactacacag tcaggacact gc	22
	<210> 5 <211> 23 <212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Descripción de secuencia artificial: MNF UP SECUENCIA OLIGONUCLEÓTIDA	
40	<400> 5	
	tacttcatca aagtcctcg gtc	23
45	<210> 6 <211> 24 <212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: MNF DOWN SECUENCIA OLIGONUCLEÓTIDA	
55	<400> 6	
	gtactctgga acagaggcta actt	24
60	<210> 7 <211> 21 <212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 288 946 T3

	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: BCL-2 UP SECUENCIA OLIGONUCLEÓTIDA	
5	<400> 7	
	agccctgtgc caccatgtg c	21
10	<210> 8 <211> 21 <212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: BCL-2 DOWN SECUENCIA OLIGONUCLEÓTIDA	
20	<400> 8	
25	ggcaggtttg tcgacctac t	21
	<210> 9 <211> 24 <212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: MYOGENIN UP SECUENCIA OLIGONUCLEÓTIDA	
35	<400> 9	
40	caaccaggag gagcgcatc tccg	24
	<210> 10 <211> 25 <212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: MYOGEN DOWN SECUENCIA OLIGONUCLEÓTIDA	
50	<400> 10	
55	aggcgctgtg ggagttgcat tcaact	25
	<210> 11 <211> 27 <212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	

ES 2 288 946 T3

	<223> Descripción de secuencia artificial: MYOD UP SECUENCIA OLIGONUCLEÓTIDA	
5	<400> 11 gctctgatgg catgatggat tacagcg	27
10	<210> 12 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: MYOD DOWN SECUENCIA OLIGONUCLEÓTIDA	
20	<400> 12 atgctggaca ggcagtcgag gc	22
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		