



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 791**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/10** (2006.01)      **A61K 35/28** (2006.01)  
**A61K 35/34** (2006.01)      **A61P 21/00** (2006.01)  
**A61P 21/04** (2006.01)      **A61P 41/00** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)      **C12N 15/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05820072 .6**

96 Fecha de presentación : **22.12.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1840208**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.10.2007**

54

Título: **Procedimiento de inducción de diferenciación de una célula muscular esquelética.**

30

Prioridad: **24.12.2004 JP 2004-372656**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.07.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.07.2011**

73

Titular/es: **Kyoto University**  
**36-1, Yoshidahonmachi**  
**Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606-8501, JP**

72

Inventor/es: **Dezawa, Mari;**  
**Nabeshima, Yo-Ichi y**  
**Hoshino, Mikio**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 362 791 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

Procedimiento de inducción de diferenciación de una célula muscular esquelética

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de inducción de diferenciación de células estromales de médula ósea en células musculares esqueléticas.

**Antecedentes**

10 Para las enfermedades musculares, especialmente, las enfermedades degenerativas de los músculos esqueléticos, tales como distrofia muscular, no hay disponible, en la actualidad, ningún medio terapéutico efectivo. Si pueden prepararse células musculares esqueléticas a partir de células estromales de médula ósea del propio paciente, se hace posible un trasplante autólogo, que se considera que es un procedimiento terapéutico efectivo. Además, la utilización de células musculares esqueléticas generadas a partir de células estromales de médula ósea del propio paciente se espera que, no solo en aspectos terapéuticos, tales como la medicina de regeneración indicada anteriormente, sino también en aspectos de ingeniería, tales como órganos artificiales, tenga posibilidades de un desarrollo futuro. Debido a que las células musculares pueden ser preparadas fácilmente mediante un procedimiento a nivel de cultivo, el uso de las células se espera también en la preparación de órganos artificiales, de tipo híbrido, y similares.

15 Como un procedimiento de inducción de diferenciación de células estromales de médula ósea en células musculares esqueléticas, se conoce el procedimiento divulgado en la publicación de patente japonesa, no examinada, (KOKAI) No. 2003-144155. Este procedimiento comprende, como etapas esenciales, (a) la etapa de aislar células estromales de médula ósea de la médula ósea y cultivar las células; (2) la etapa de añadir un agente desmetilante (5-azacitidina); (3) la etapa de añadir un agente incrementador de cAMP o un análogo de cAMP (forskolina), y/o un factor estimulador de diferenciación celular (bFGF, PDGF-AA, heregulin); (4) la etapa de introducir un gen Notch y/o un gen relacionado con el señalamiento Notch en las células y cultivar las células; (5) la etapa de co-cultivar dichas células, con genes introducidos, con células sin genes introducidos; y (6) la etapa de añadir un agente incrementador de cAMP o un análogo de cAMP (forskolina).

25 Sin embargo, el procedimiento indicado anteriormente incluye seis etapas, y, de esta manera, tiene el problema de que las operaciones son muy complicadas. Si se realizan múltiples etapas con operaciones complicadas, se incrementan los factores indefinidos, lo cual puede conducir a un decrecimiento en la eficiencia de la inducción. Además, este procedimiento se propone básicamente como un procedimiento para inducir diferenciación en células nerviosas, y no está optimizado para inducir selectivamente la diferenciación en células musculares esqueléticas. Además, este procedimiento usa un sistema de mezclado que contiene elementos diferentes a miocitos, y, por lo tanto, el procedimiento tiene un problema desde un punto de vista de la seguridad para aplicaciones clínicas de células musculares esqueléticas inducidas.

30 El documento EP 1 479 767 A1 divulga dos procedimientos diferentes:

35 1. un procedimiento de inducción de células estromales de médula ósea para diferenciarlas en neuronas (dopaminérgicas o acetilcolinérgicas);

2. un procedimiento de inducción de células estromales de médula ósea para diferenciarlas en células musculares esqueléticas.

40 Con respecto al procedimiento de inducción de células estromales de médula ósea para diferenciarlas en células neuronales, el documento EP 1 479 767 A1 divulga que las células estromales de médula ósea (MSCs) son primero transfectadas con el gen notch, son cultivadas y, a continuación, son puestas en contacto con factores de diferenciación y forskolina (un agente incrementador de cAMP).

45 Con respecto al procedimiento de inducción de células estromales de médula ósea para diferenciarlas en células musculares esqueléticas, el documento EP 1 479 767 A1 enseña que las células estromales de médula ósea (MSCs) son desmetiladas, cultivadas, puestas en contacto con factores de diferenciación y un agente incrementador de cAMP, a continuación, las células son transfectadas con el gen notch, a continuación, las células transfectadas son cultivadas con células no transfectadas y, a continuación, una vez más, se añade un agente incrementador de cAMP.

En el documento EP 1 479 767 A1, se enseña que la etapa de desmetilación es esencial, ya que la desmetilación y la activación de uno o muy pocos genes mediante 5-azacitidina conduce a la conversión en mioblastos, los cuales son precursores de células musculares.

50 El documento de Dezawa et al. (The Journal of Clinical Investigation, Vol. 113, No: 12, páginas 1701-1710 (2004)) divulga un procedimiento de inducción de diferenciación de BMSCs a células neuronales.

El documento LI et al. (Immunity, Vol. 8, páginas 43-55 (1998)) divulga que el ligando Notch Jagged juega un papel en la medicación de las decisiones del destino celular en células madre, durante la hematopoyesis. Específicamente, el documento divulga que rJagged1 funciona como un ligando para Notch1, lo cual fue demostrado mediante la inhibición de diferenciación de células musculares en células C2C12 que expresan Notch1, cultivadas con fibroblastos que expresan proteína rJagged.

### **Divulgación de la invención**

#### **Objeto a conseguir por medio de la invención**

Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de inducción de diferenciación a partir de células estromales de médula ósea en células musculares esqueléticas. Más específicamente, el objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para inducir, más eficiente y convenientemente, la diferenciación de células estromales de médula ósea en células musculares esqueléticas, con buena reproducibilidad en comparación con el procedimiento divulgado en la publicación de patente japonesa, no examinada, No. 2003-144155.

#### **Medios para conseguir el objeto**

Los inventores de la presente invención condujeron varias investigaciones para conseguir el objeto indicado anteriormente. Como resultado, encontraron que, en la inducción de diferenciación de células estromales de médula ósea en células musculares esqueléticas, (2) la etapa de añadir un agente desmetilante (5-azacitidina), (5) la etapa de co-cultivar células con genes introducidos con células sin genes introducidos; y (6) la etapa de añadir un agente incrementador de cAMP o un análogo de cAMP (forskolina), etapas que son consideradas como esenciales en el procedimiento divulgado en la publicación de patente japonesa, no examinada, No. 2003-144155, fueron omitidas exitosamente, de manera que las operaciones del procedimiento total fueron simplificadas para incrementar marcadamente la eficiencia de inducción de diferenciación y crear eficientemente células musculares esqueléticas. La presente invención fue conseguida en base al descubrimiento indicado anteriormente.

De esta manera, la presente invención proporciona un procedimiento de inducción de diferenciación de células estromales de médula ósea en células musculares esqueléticas, que comprende las etapas siguientes:

(a) la etapa de añadir uno o más tipos de sustancias seleccionadas de entre el grupo que consiste en forskolina, como un agente incrementador de AMP cíclico (en adelante, abreviado también ocasionalmente, como "cAMP"), o como un análogo de cAMP, respectivamente, y un factor estimulador de diferenciación celular seleccionado de entre factor de crecimiento de fibroblasto (bFGF), factor de crecimiento AA derivado de plaquetas (PDGF-AA), neuregulina a un cultivo de células estromales de médula ósea, en el que dichas células estromales de médula ósea son células no tratadas con un agente desmetilante, y cultivar las células;

(b) la etapa de introducir un gen Notch en las células obtenidas en la etapa (a) indicada anteriormente, y cultivar las células para obtener un cultivo de mioblastos, en el que dicho cultivo no contiene un co-cultivo de las células con el gen introducido y células sin gen introducido; y

(c) la etapa de añadir un ligando Notch al cultivo de mioblastos obtenido en la etapa (b) anterior, y cultivar las células.

Según las realizaciones preferentes de la invención indicada anteriormente, se proporcionan el procedimiento indicado anteriormente, en el que se usa la proteína Jagged 1 como ligando Notch en la etapa (c); y el procedimiento indicado anteriormente, en el que la etapa (c) es realizada en un medio sin suero.

Desde otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la inducción de diferenciación de células estromales de médula ósea en mioblastos, el cual comprende las etapas siguientes:

(a) la etapa de añadir uno o más tipos de sustancias seleccionadas de entre el grupo que consiste en forskolina como agente incrementador de AMP cíclico o como un análogo de cAMP, respectivamente, y un factor estimulador de diferenciación celular seleccionado de entre factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF), factor de crecimiento AA derivado de plaquetas (PDGF-AA) neuregulina a un cultivo de células estromales de médula ósea, en el que dichas células estromales de médula ósea son células no tratadas con un agente desmetilante, y cultivar las células; y

(b) la etapa de introducir un gen Notch en las células obtenidas en la etapa (a) indicada anteriormente, y cultivar las células, en la que dicho cultivo no contiene un co-cultivo de las células con los genes y células sin genes introducidos.

La presente invención proporciona también células musculares esqueléticas o mioblastos, obtenibles mediante los procedimientos indicados anteriormente, una composición farmacéutica para un tratamiento terapéutico de una enfermedad muscular, que comprende los mioblastos o las células musculares esqueléticas indicadas anteriormente, para la fabricación de la composición farmacéutica indicada anteriormente. Las células obtenidas según la presente invención pueden ser usadas además para un tratamiento terapéutico o una enfermedad muscular, que comprende la

administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de células musculares esqueléticas o mioblastos obtenibles mediante los procedimientos indicados anteriormente, a un paciente que necesita una administración de células musculares esqueléticas o mioblastos mediante una administración local o administración sistémica; y se proporciona el procedimiento indicado anteriormente, en el que las células musculares esqueléticas o mioblastos son células inducidas mediante diferenciación de células estromales de médula ósea, heterólogas o autólogas del paciente.

### **Mejor modo de realizar la invención**

El procedimiento de la presente invención es un procedimiento de inducción de diferenciación de células estromales de médula ósea en células musculares esqueléticas, que comprende las etapas:

(a) la etapa de añadir uno o más tipos de sustancias seleccionadas de entre el grupo que comprende forskolina como agente incrementador de cAMP o un análogo de cAMP, respectivamente, y un factor estimulador de diferenciación celular seleccionado de entre factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF), factor de crecimiento AA derivado de plaquetas (PDGF-AA) neuregulina a un cultivo de células estromales de médula ósea, en el que dichas células estromales de médula ósea son células no tratadas con un agentes desmetilante, y cultivar las células;

(b) la etapa de introducir un gen Notch en las células obtenidas en la etapa (a) indicada anteriormente, y cultivar las células para obtener un cultivo de mioblastos, con la condición de que dicho cultivo no contenga un co-cultivo de las células con genes introducidos y células sin genes introducidos; y (c) la etapa de añadir un ligando Notch al cultivo de mioblastos obtenido en la etapa (b) indicada anteriormente; y cultivar las células.

El procedimiento de la presente invención está caracterizado porque no incluye las etapas indicadas como etapas esenciales en el procedimiento publicado previamente para la inducción de diferenciación de células musculares esqueléticas (comprendiendo el procedimiento las seis etapas descritas en la publicación de patente indicada anteriormente, párrafo [0022] y similares): (2) la etapa de añadir un agente desmetilante (5-azacitidina), (5) la etapa de co-cultivar las células con el gen introducido y las células sin gen introducido; y (6) la etapa de añadir un agente incrementador de cAMP o un análogo de cAMP (forskolina). En particular, la no inclusión del co-cultivo de las células con el gen introducido y las células sin el gen introducido es una característica principal del procedimiento de la presente invención. Aunque el procedimiento de la presente invención puede ser usado para la preparación de células musculares esqueléticas de mamíferos, incluyendo el ser humano, un objeto preferente es un ser humano. Los detalles de cada etapa según la presente invención pueden entenderse mejor con referencia a la publicación de patente japonesa, no examinada, No. 2003-144155, indicada anteriormente.

Las células estromales de médula ósea usadas en el procedimiento de la presente invención significan células presentes en la médula ósea que son diferentes a las células del sistema hemopoyético, y pueden considerarse como potencialmente diferenciables en osteocitos, condrocitos, adipocitos y similares. Las células estromales de médula ósea son identificadas por una positividad (+) para Thy1 y 2, positividad (+) para integrina-  $\beta$ 1, y negatividad (-) para CD34. Un procedimiento de preparación de células estromales de médula ósea se explica específicamente, en detalle, en la publicación de patente japonesa, no examinada, No. 2003-144155, las personas con conocimientos en la materia pueden obtener fácilmente células estromales de médula ósea. Por ejemplo, puede prepararse un cultivo de células estromales de médula ósea extrayendo células estromales de médula ósea de la médula ósea, y cultivando las células en un medio basal estándar suplementado con suero. Por ejemplo, es deseable subcultivar células estromales de médula ósea durante 3 ó 4 generaciones, y, a continuación, preparar un cultivo ajustado a una densidad celular de, por ejemplo, aproximadamente 1.700 células/cm<sup>2</sup>. Como medio basal estándar, puede usarse medio mínimo esencial alfa de Eagle modificado y similares, y como suero, puede usarse suero fetal bovino, o en el caso de seres humanos, suero humano. Las células estromales de médula ósea usadas en el procedimiento de la presente invención no necesitan ser tratadas con el agente desmetilante empleado en el procedimiento descrito en la publicación de patente japonesa, no examinada, No. 2003-144155. Una de las características de la presente invención se basa en el descubrimiento de que la inducción de diferenciación de células musculares esqueléticas podía conseguirse eficientemente si se omite el tratamiento con el agente desmetilante, que, convencionalmente, se consideraba esencial.

Como el agente incrementador de cAMP o el análogo de cAMP puede usarse, por ejemplo, forskolina. Uno o más tipos de agentes incrementadores de cAMP o análogos de cAMP pueden ser usados apropiadamente. Aunque una concentración del agente incrementador de cAMP o el análogo de cAMP no está particularmente limitada, la concentración puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 nM a 100  $\mu$ M, preferentemente de aproximadamente 500 nM a 50  $\mu$ M. Como el factor estimulador de diferenciación, pueden usarse, por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF), factor de crecimiento AA derivado de plaquetas (PDGF-AA), neuregulina (nombre comercial: Heregulin), y similares, y pueden usarse dos o más tipos de estas sustancias en combinación. Aunque una concentración del factor estimulador de diferenciación celular no está particularmente limitada, la concentración puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 ng/ml a 100  $\mu$ g/ml, preferentemente de aproximadamente 0,5 ng/ml a 2  $\mu$ g/ml. También es preferente usar el factor estimulador de diferenciación celular en combinación con el agente incrementador de cAMP o el análogo de cAMP. Por ejemplo, forskolina (5  $\mu$ M), bFGF (10 ng/ml), PDGF-AA (5 ng/ml) y neuregulina (200 ng/ml) son añadidos al medio MEM de Eagle de modificación que

contiene 10 % de suero fetal bovino (FBS), y células estromales de médula ósea son cultivadas en el mismo. Pax7, como un marcador de células musculares estromales de médula ósea, viene a ser expresado en esta etapa, y al usar el marcador como un índice, pueden realizarse la adición de los agentes indicados anteriormente y el cultivo.

5 La introducción del gen Notch puede conseguirse, por ejemplo, mediante lipofección usando un vector de expresión para células mamíferas. Sin embargo, el procedimiento no está limitado al procedimiento anterior, y pueden emplearse unos medios de introducción de genes adecuados. Por ejemplo, puede introducirse el plásmido pCI-neo-NICD que contiene el ANDc de dominio citoplasmático de Notch (NICD) (plásmido descrito en la publicación de patente japonesa, no examinada, No. 2003-144155, Ejemplo 1). Después de la introducción de genes indicada anteriormente, las células con el gen introducido pueden ser seleccionadas preferentemente. Esta selección puede ser realizada, por ejemplo, en base a la resistencia a neomicina, añadiendo sulfato G418, y es completada, normalmente, en aproximadamente 10 a 10 14 días. Las células seleccionadas son cultivadas, idealmente, hasta que alcanzan una confluencia del 100%. Las células obtenidas según se ha descrito anteriormente, constituyen una población de mioblastos, y las células son transformadas de manera que los factores de transcripción como marcadores de musculares esqueléticos, tales como MyoD y miogenina, pueden ser detectados. Después de la introducción de genes o de la selección indicada 15 anteriormente, el procedimiento descrito en la publicación de patente japonesa indicada anteriormente No. 2003-144155 emplea la etapa de co-cultivo de las células con genes introducidos y las células sin genes introducidos. Mientras, el co-cultivo indicado anteriormente no es llevado a cabo en el procedimiento de la presente invención. Otra característica de la presente invención se basa en el descubrimiento de que una diferenciación eficiente en células musculares esqueléticas era inducida exitosamente si se omitía el co-cultivo indicado anteriormente, que se considera, 20 convencionalmente, como esencial. Por lo tanto, en el procedimiento de la presente invención, después de la introducción de genes indicada anteriormente o de la selección indicada anteriormente, la etapa (c) es realizada sin realizar el co-cultivo.

A continuación, se realiza una inducción por fusión para inducir las células musculares esqueléticas maduras a partir de los mioblastos resultantes, según la etapa (c). Esta etapa puede ser realizada añadiendo un ligando Notch al cultivo de mioblastos y cultivando las células. Como ligando Notch, por ejemplo, puede usarse proteína Jagged 1 (Lindsell, C.E. et al., Cell, 80, pp.909-917, 1995). Aunque una concentración de proteína Jagged 1 no está limitada particularmente, la concentración puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 20 µg/ml, preferentemente de aproximadamente 5 µg/ml. Un tipo del medio no está particularmente limitado, y un medio basal ordinario, por ejemplo, medio MEM de Eagle de modificación y similares, puede ser usado. Aunque aproximadamente el 10% del suero, tal como FBS, puede ser añadido al medio, puede usarse, preferentemente, un medio libre de suero. Al usar, por ejemplo, un medio libre de suero, tal como medio TTS libre de suero (Yoshida, N. et al., J. Cell Sci., 111, pp.769-779, 1998), pueden prepararse células musculares esqueléticas adecuadas para una aplicación clínica. Como resultado de la inducción de fusión, indicada anteriormente, se inducen células musculares esqueléticas polinucleares que expresan marcadores maduros, tales como Myf6/MRF4, y positivas a la cadena pesada de miosina y miosina esquelética. Estas 30 células musculares esqueléticas muestran movimientos de constricción espontáneos durante el cultivo. En el procedimiento descrito en la publicación de patente japonesa, no examinada, No. 2003-144155, las células con genes introducidos y las células sin genes introducidos son co-cultivadas, y, a continuación, el agente incrementador de cAMP o el análogo de cAMP es añadido al cultivo para inducir diferenciación en células musculares esqueléticas maduras. Sin embargo, en el procedimiento de la presente invención, no es necesario añadir el agente incrementador de cAMP o el análogo de cAMP al cultivo. Una característica adicional de la presente invención se basa en el descubrimiento de que la diferenciación en células musculares esqueléticas suficientemente maduras funcionalmente fue inducida suficientemente si se omitía la adición del agente incrementador de cAMP o análogo de cAMP, que es considerada, 40 convencionalmente, como esencial.

A continuación, las células musculares esqueléticas pueden ser clonadas realizando una dilución limitadora del cultivo resultante de células musculares esqueléticas a una densidad de 1 célula por pocillo, y una población de células musculares esqueléticas polinucleares que tienen la capacidad de constricción puede ser conseguida de nuevo a partir de los clones vivos, que se obtienen, normalmente, en una relación de aproximadamente el 90%. La población de células resultante es una población, que consiste, de una manera sustancialmente pura, en células musculares, y que no contiene ningún otro elemento, y puede ser usada, particularmente, para un propósito de tratamiento terapéutico de 50 una enfermedad muscular y similares. Además, la población de células resultante contiene células madre musculares esqueléticas y pueden prepararse, de manera estable, células musculares a partir de las mismas, incluso después subcultivos realizados múltiples veces.

Las células musculares esqueléticas obtenidas mediante el procedimiento de la presente invención pueden ser usadas, por ejemplo, para una administración local o sistémica a un paciente con una enfermedad muscular, tal como distrofia muscular; suplementación muscular para lesión o pérdida muscular en accidente de tráfico, quemadura térmica y similar; reconstrucción muscular en un paciente de atrofia muscular por desuso debida a una enfermedad cerebrovascular, lesión de médula espinal o enfermedad neurodegenerativa; tratamiento terapéutico de atrofia muscular que acompaña a lesiones nerviosas, tales como parálisis del plexo braquial, y similares. Sin embargo, los usos de las células musculares esqueléticas obtenidas mediante la presente invención no se limitan a los usos 55

específicos ejemplificados anteriormente. Por ejemplo, pueden prepararse células musculares esqueléticas según el procedimiento de la presente invención usando células estromales de médula ósea extraídas de un paciente, y pueden ser autotrasplantadas a una lesión del paciente. Además, puede realizarse una trasplante heterólogo, en una manera similar, con la condición de compatibilidad HLA. Las células musculares esqueléticas obtenidas mediante el procedimiento de la presente invención constituyen una población de células musculares esqueléticas sustancialmente pura que contiene células madre, y cuando las células son trasplantadas, las células madre pueden tomarse in vivo y pueden regenerar células musculares esqueléticas en respuesta a lesiones musculares repetidas, lo cual es una gran ventaja para aplicaciones clínicas.

### **Ejemplos**

La presente invención se explicará, más específicamente, con referencia a los ejemplos siguientes. Sin embargo, el alcance de la presente invención no está limitado a los ejemplos siguientes.

#### **Ejemplo 1**

Según el procedimiento descrito en la publicación de patente japonesa, no examinada, No. 2003-144155, las células estromales fueron extraídas de las médulas óseas de ratas adultas inducidas con células musculares (ratas Wistar) y seres humanos, y fueron cultivadas. Como medio, se usó medio esencial mínimo (MEM) de Eagle de modificación (M4526, Sigma) que contenía 15% de suero fetal bovino (14-501F, lote #61-1012, Biowhittaker). Después de subcultivar las células durante cuatro generaciones, las células que alcanzaron una confluencia del 80 al 90% fueron inoculadas a una densidad de 1.800 a 1.900 células/cm<sup>2</sup>, y a partir del día siguiente, el medio fue cambiado a un medio suplementado con 5 µM de forskolina (344273, Calbiochem), 10 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblasto básico (100-18B, Peprotech EC, Ltd.), 5 ng/ml de factor de crecimiento AA derivado de fibroblasto (396, HB, Peprotech EC Ltd.) y 200 ng/ml de Heregulin (396-HB, R&D Systems), y el cultivo fue continuado durante 3 días. A continuación, se introdujo el gen del dominio intracelular Notch en las células, según el procedimiento de la publicación de patente japonesa, no examinada, No. 2003-144155, Ejemplo 1.

Al día siguiente después de la introducción, se añadió sulfato G418 (83-5027, Gibco BRL) a una concentración de 200 ng/ml para seleccionar las células introducidas durante 10 días. Después de una recuperación del número de células que alcanzaban una confluencia sustancialmente del 100%, se añadieron 5 µg/ml de proteína Jagged 1 (Jagged de rata recombinante 1/Fc quimera, 3599, GT TECHNE) al medio MEM Eagle de modificación que contenía 10% de FBS, y las células fueron cultivadas durante 5 días para realizar una inducción por fusión. Durante el cultivo, las células se fusionaron y aparecieron localmente células musculares esqueléticas polinucleares, que incrementaron con el paso del tiempo, y, de esta manera, se formaron células musculares esqueléticas polinucleares positivas a cadena pesada de miosina y miosina esquelética, cuyos movimientos espontáneos de constricción eran observables microscópicamente bajo las condiciones de cultivo. En estas células, se confirmó la expresión de marcadores maduros, tales como Myf6/MRF4. La eficiencia de inducción en las células musculares esqueléticas era de aproximadamente el 40% en el 14-avo día de la inducción por fusión. Cuando la diferenciación en células musculares esqueléticas fue inducida como un control, según el procedimiento usando el tratamiento de desmetilación, co-cultivo y adición subsiguiente de forskolina, descrito en la publicación de patente japonesa, no examinada, No. 2003-144155, la relación de inducción en células musculares esqueléticas fue del 20,8 ±3,5%.

#### **Ejemplo 2**

La diferenciación en células musculares esqueléticas fue inducida en la misma manera que en el Ejemplo 1 indicado anteriormente, con la condición de que un medio libre de suero fue usado para la inducción por fusión. Como el medio libre de suero, DMEM que contenía 10 µg/ml de insulina, 5 µg/ml de transferrina, 10 nmol de selenita de sodio, 1 mg/ml de BSA y 60 µg/ml de kanamicina (este medio es denominado "medio ITS libre de suero") suplementado con proteína Jagged 1 (Jagged de rata recombinante 1/Fc quimera, 3599, GT TECHNE) a una concentración final de 5 µg/ml. Como resultado, el número de células musculares esqueléticas polinucleares era de 16 por 35 mm de placa de cultivo en el primer día del cultivo, y 664 en el 5º día del cultivo. Mientras, cuando las células fueron cultivadas en un medio que consistía solamente en el medio libre de suero, indicado anteriormente, (sin la adición de proteína Jagged 1) como un control, el número era de 13 en el 1er día del cultivo, y de 487 en el 5º día del cultivo. A partir de estos resultados, se demostró que la diferenciación en células musculares maduras fue inducida también exitosamente mediante la adición de proteína Jagged 1 al medio libre de suero.

#### **Aplicabilidad industrial**

El procedimiento de la presente invención se simplifica en el número total de etapas en comparación con el procedimiento para inducir diferenciación de las células musculares esqueléticas descrito en la publicación de patente japonesa, no examinada, No 2003-144155, y las células musculares esqueléticas pueden ser preparadas, convencional y eficientemente, mediante el procedimiento de la presente invención. Según el procedimiento de la presente invención, la diferenciación en mioblastos, que sirven como células precursoras de células musculares

5 esqueléticas, puede ser inducida mediante la etapa (b), y, a continuación, puede inducirse, etapa a etapa, la diferenciación de los mioblastos en células musculares esqueléticas maduras. Por lo tanto, la etapa de diferenciación, proliferación de células, y similares pueden ser controladas. Además, el procedimiento de la presente invención no usa un sistema mixto que contiene células diferentes de mioblastos o células musculares esqueléticas, y es capaz de preparar eficientemente una población sustancialmente pura de células musculares esqueléticas. Por lo tanto, las células musculares esqueléticas obtenidas pueden ser usadas como un medicamento seguro para el tratamiento de enfermedades musculares.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de inducción de diferenciación de células estromales de médula ósea en células musculares esqueléticas, que comprende las etapas de
  - 5 (a) la etapa de añadir uno o más tipos de sustancias seleccionadas de entre el grupo que consiste en forskolina como un agente incrementador de AMP cíclico o un análogo de cAMP, respectivamente, y un factor estimulador de diferenciación celular seleccionado de entre factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF), factor de crecimiento AA derivado de plaquetas (PDG-AA), neuregulina a un cultivo de células estromales de médula ósea, en el que dichas células estromales de médula ósea no son tratadas con agente desmetilante, y cultivar las células;
  - 10 (b) la etapa de introducir un gen Notch en las células obtenidas en la etapa (a), y cultivar las células para obtener un cultivo de mioblastos, con la condición de que dicho cultivo no contenga un co-cultivo de las células con el gen introducido y células sin el gen introducido; y
  - (c) la etapa de añadir un ligando Notch al cultivo de mioblastos obtenido en la etapa (b), y cultivar las células.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el ligando Notch es proteína Jagged 1.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la etapa (c) es realizada en un medio libre de suero.
- 15 4. Procedimiento para la inducción de diferenciación de células estromales de médula ósea en mioblastos, que comprende las etapas de:
  - 20 (a) la etapa de añadir uno o más tipos de sustancias seleccionadas de entre el grupo que consiste en forskolina como un agente incrementador de AMP cíclico o como análogo de cAMP, respectivamente, y un factor estimulador de diferenciación celular seleccionado de entre factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF), factor de crecimiento AA derivado de plaquetas (PDG-AA), neuregulina a un cultivo de células estromales de médula ósea, en el que dichas células estromales de médula ósea no son tratadas con un agente desmetilante, y cultivar las células; y
  - (b) la etapa de introducir un gen Notch en las células obtenidas en la etapa (a), y cultivar las células, con la condición de que dicho cultivo no contenga un co-cultivo de las células introducidas con el gen y células no introducidas.