



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11) Número de publicación: **2 364 563**

51) Int. Cl.:

**C12N 15/02** (2006.01)  
**A61K 9/08** (2006.01)  
**A61K 9/19** (2006.01)  
**A61K 31/7076** (2006.01)  
**A61K 35/12** (2006.01)  
**A61L 27/00** (2006.01)  
**A61P 9/04** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96) Número de solicitud europea: **05765792 .6**

96) Fecha de presentación : **12.07.2005**

97) Número de publicación de la solicitud: **1792985**

97) Fecha de publicación de la solicitud: **06.06.2007**

54) Título: **Promotor de la fusión celular y utilización del mismo.**

30) Prioridad: **27.07.2004 JP 2004-218243**

45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.09.2011**

45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.09.2011**

73) Titular/es: **KOWA COMPANY, Ltd.**  
**6-29, Nishiki 3-chome**  
**Naka-ku Nagoya-shi, Aichi-ken 460-8625, JP**  
**Masafumi Kitakaze**  
**Tetsuo Minamino y**  
**Akio Hirata**

72) Inventor/es: **Kitakaze, Masafumi;**  
**Minamino, Tetsuo y**  
**Hirata, Akio**

74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 364 563 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

Promotor de la fusión celular y utilización del mismo

Campo técnico

5 La presente invención proporciona un promotor de la fusión celular compuesto de ATP o un metabolito del mismo, y se refiere a un promotor de la fusión celular que incluye ATP o un metabolito del mismo como ingrediente activo, así como a un método para producir células (células fusionadas) que incluye fusionar células en presencia de ATP o un metabolito del mismo.

10 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica para la regeneración funcional o mejora con una célula madre para la disfunción o hipofunción debido a daño o degeneración de un tejido vivo u órgano, que incluye ATP o un metabolito del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable, al uso de ATP o un metabolito del mismo para producir la misma, y a un método terapéutico para usar la misma.

Antecedentes de la técnica

15 La medicina de regeneración ha atraído la atención como tratamiento médico con el fin de regenerar una célula, tejido u órgano perdido debido a una enfermedad o accidente; o de recuperar la función del mismo. La medicina de regeneración también incluye el trasplante celular usando células vivas, tal como trasplante de piel y trasplante de órganos, y particularmente en años recientes se ha desarrollado la tecnología de diferenciar células madre en células que tienen la función de cada tejido, regenerando de ese modo un órgano o tejido que no es capaz de regenerarse espontáneamente o de recuperar la función del mismo, y la medicina de generación que utiliza esta tecnología atrae la atención.

20 Las células madre son células progenitoras jóvenes, sin diferenciar, que tienen la capacidad autorregeneradora como fuente, que crecen en un tejido u órgano para reponer células que se aproximan a la muerte. Las células madre embrionarias (células ES) derivadas de embriones atraen la atención, pero no se pueden convertir en células autólogas sin la transferencia nuclear a células somáticas, provocando de este modo un rechazo inmunológico con el trasplante, y necesitando de recombinación genética, confirmación de la compatibilidad HLA, y uso simultáneo de un inmunosupresor. La atención se centra en la utilización de células madre somáticas (células madre de tejidos, células madre de órganos) como células autólogas sin riesgo de rechazo inmunológico. En consecuencia, también se ha aplicado para una patente un método para separar células madre mesenquimatosas procedentes de mamíferos (véase documento 1 de patente), un método para cultivar las mismas (véase documento 2 de patente), y nuevas células madre somáticas (véase documento 3 de patente).

30 Las células madre somáticas se diferencian en una dirección predeterminada de manera que se convierten en células de tejidos en los que se encuentran, y de este modo se considera difícil que las células madre somáticas regeneren tejidos a partir de los cuales no pueden ser recogidas, aunque no obstante se encontró que muchas células madre somáticas tienen la propiedad de la diferenciación celular, que es diferente de su diferenciación original. Tal propiedad se denomina la plasticidad de células madre somáticas. Por ejemplo, se supo que las células madre hematopoyéticas se pueden diferenciar no sólo en células sanguíneas, sino también en cualesquiera células tales como hepatocitos, células del músculo esquelético, neuronas, o similares. Se ha desarrollado un enfoque para la nueva medicina de regeneración que utiliza tal propiedad de las células madre somáticas.

35 Sin embargo, la regeneración de tejidos u órganos no se puede llevar a cabo simplemente administrando tales células madre en el organismo vivo. Para la diferenciación y crecimiento de las células, es muy importante la interacción de las células con su ambiente circundante, y es necesaria la tecnología de construir un entorno ambiental adecuado para las células madre administradas (tecnología biomédica de tejidos), de manera que todavía existen muchos problemas para un enfoque para la medicina de regeneración. Por ejemplo, también se ha aplicado a una patente (véase documento 4 de patente) un método para reparar tejidos introduciendo una composición de gel de polímero dependiente de la temperatura, que contiene fosfato de adenosina y similar, en los cartílagos y otros tejidos a fin de apoyar la proliferación celular para reparar y regenerar los tejidos.

40 Con respecto a la plasticidad de las células madre somáticas, existen dos teorías, una de las cuales propone que la plasticidad es atribuible a la transdiferenciación, y la otra de las cuales propone que la plasticidad es atribuible a la fusión celular. Por ejemplo, Alvarez-dolado et al. mostraron que las células derivadas de médula ósea (BMDC) se fusionan de forma natural *in vitro* con células precursoras neuronales, y dieron a conocer que, mediante el trasplante de médula ósea, las BMDC se fusionan *in vivo* con hepatocitos, células cerebrales de Purkinje y células miocárdicas para formar células multinucleares fusionadas (véase el documento 1 no de patente). Vassilopoulos et al. dieron a conocer que, con el trasplante de células madre hematopoyéticas de médula ósea en el hígado, las células madre hematopoyéticas se fusionan con hepatocitos para regenerar el hígado (véase el documento 2 no de patente). También se da a conocer que, después de que se transplantaron células madre hematopoyéticas en el corazón, las células madre no se reconocieron como transdiferenciadas en células miocárdicas en estudio genético con un ratón que tiene un gen informador como gen expresado específicamente en células miocárdicas (véase

documento 3 no de patente). El mecanismo de la plasticidad de células madre somáticas se examina desde cada punto de vista, pero todavía no está completamente elucidado.

5 Aunque el mecanismo de la plasticidad de las células madre somáticas no está elucidado, existe una posibilidad revelada de nuevas técnicas terapéuticas que utilizan la plasticidad de las células madre somáticas, en las que las células madre somáticas se fusionan con células de un órgano o tejido, reestructurando de ese modo un área dañada, sin provocar ningún rechazo inmunológico.

10 La insuficiencia cardíaca es un trastorno grave potencialmente mortal. En la insuficiencia cardíaca que resulta de la necrosis parcial del músculo cardíaco, incluso si se repone de la insuficiencia cardíaca, el músculo cardíaco, una vez necrotizado, no se puede reponer, y el paciente tiene riesgo de una recidiva. Particularmente, está creciendo el número de pacientes con miocardiopatía dilatada que tiene mal pronóstico, pero no se encuentra ningún método terapéutico establecido para ellos. El trasplante cardíaco es una terapia próspera, pero debido a la falta de donantes hay un límite al tratamiento.

15 Las células miocárdicas, poco después del nacimiento, se convierten en células miocárdicas adultas, que no tienen capacidad proliferante. El músculo cardíaco, cuando se necrotiza por infarto de miocardio o similar, para formar parcialmente tejido fibroso, no se reproducirá nuevamente. El músculo cardíaco que tiene tejido fibroso formado se hace más delgado, no pudiendo mantener la capacidad de bombeo del corazón, haciendo de este modo difícil el mantenimiento de la función cardíaca.

20 En años recientes, se intentó regenerar la función cardíaca transplantando directamente células en el corazón con deterioro de la función cardíaca. Como células usadas en el trasplante, se da a conocer el uso de las siguientes células: células miocárdicas embrionarias (véanse los documentos 4 y 5 no de patente), blastocitos del músculo esquelético, que son células progenitoras del músculo esquelético (véanse los documentos 6 y 7 no de patente), y células de médula ósea expuestas a un agente desmetilante, 5-azacitidina (véase documento 8 no de patente). En cualquiera de estos informes, se usan modelos de animales, y también se llevan a cabo aplicaciones clínicas. Por ejemplo, Hamano et al. transplantaron células autólogas de médula ósea en 5 pacientes con cardiopatía isquémica. Como resultado, dan a conocer que se reconoce una mejora de la cardiopatía isquémica en 3 de los 5 pacientes (véase el documento 9 no de patente). Strauer et al. inyectaron células autólogas de médula ósea mediante catéter en un sitio de infarto cardíaco de pacientes con infarto cardíaco agudo. Como resultado, dieron a conocer que, después de 3 meses, se observa la reducción del sitio de infarto y la mejora de la función cardíaca (véase el documento 10 no de patente).

30 Aunque el mecanismo para la mejora de la función cardíaca mediante el trasplante celular está sin revelar, se estima que la mejora es atribuible a la fusión celular a partir del examen genético mencionado anteriormente, que da a conocer que no hubo transdiferenciación reconocida en células miocárdicas (véase documento 3 no de patente). En las células miocárdicas y en las células del músculo esquelético, están presentes células multinucleares, y en las células del músculo esquelético hay un gran número de núcleos en la periferia de las células, y en las células miocárdicas hay 1 ó 2 a 3 núcleos en el centro de la célula.

35 La fusión celular es una técnica usada ampliamente en la producción de anticuerpos y similares, y, además de virus tales como el virus Sendai, se usan compuestos tales como polietilenglicol como compuestos para inducir la fusión celular. Sin embargo, tales técnicas de fusión celular están destinadas al uso *in vitro*, y estos promotores de la fusión celular, cuando se aplican a la medicina de regeneración *in vivo*, pueden provocar la fusión de células orgánicas distintas de las células objetivo, lo que hace sustancialmente muy difícil la aplicación a medicina clínica. En la reestructuración de un sitio dañado de un órgano o tejido mediante fusión celular con células madre, actualmente no se conoce ningún producto químico para promover la fusión celular del órgano o tejido con las células madre.

[Documento de patente 1] Solicitud de Patente Japonesa Abierta al Público (JP-A) n° 2003-052365

[Documento 2 de patente] JP-A n° 2003-052360

45 [Documento 3 de patente] JP-A n° 2004-024246

[Documento 4 de patente] JP-A n° 2004-501682

[Documento 1 no de patente] Alvarez-dolado, M., et al., Nature, 425, 968-973 (2003)

[Documento 2 no de patente] Vassilopoulos, G., et al., Nature, 422, 901-904 (2003)

[Documento 3 no de patente] Murry, C. E., et al., Nature, 428, 664-668 (2004)

50 [Documento 4 no de patente] Leor, J., et al., Circulation, 94, II332-II336 (1996)

[Documento 5 no de patente] Li, R. K., et al., Ann. Thorac. Surg., 62, 654-661 (1996)

[Documento 6 no de patente] Murry, C. E., et al., J. Clin. Invest., 98, 2512-2523 (1996)

[Documento 7 no de patente] Scorsin, M., et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 119, 1169-1175 (2000)

[Documento 8 no de patente] Tomita, S., et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 123, 1132-1140 (2002)

[Documento 9 no de patente] Hamano, K., et al., Jpn. Circ. J., 65, 845-847 (2001)

5 [Documento 10 no de patente] Strauer, B. E., et al., Circulation, 106, 1913-1918 (2002)

#### Descripción de la invención

#### Problemas a resolver por la invención

10 La presente invención proporciona un promotor de la regeneración para regenerar un tejido utilizando células madre somáticas. La presente invención también proporciona un promotor de la fusión celular, que se puede usar con seguridad en el organismo vivo.

15 Aunque el mecanismo de la plasticidad de las células madre somáticas todavía no se ha elucidado suficientemente, la teoría de la plasticidad atribuible a la fusión celular se está haciendo dominante. En el proceso de diferenciación y crecimiento de células madres somáticas administradas, la fusión celular también tiene una ventaja por cuanto la fusión celular con células somáticas supervivientes hace innecesario construir ambientes circundantes adecuados para las células madre somáticas administradas, por ejemplo un anclaje para formar tejido. En consecuencia, si hubiese un promotor de la fusión celular utilizable con seguridad en el organismo vivo, el tejido vivo dañado sería regenerable usando diversas células madre somáticas. En particular, las células del músculo esquelético y las células miocárdicas aparecen originalmente como células multinucleadas, de manera que no hay ningún problema particular en la multinucleación de las células mediante fusión celular.

20 La presente invención proporciona un promotor de la fusión celular para regenerar tejido vivo dañado.

#### Medios para resolver los problemas

25 Se examinó la fijación de las células madre a un sitio dañado en medicina de regeneración usando células madre, y se puso atención en el hecho de que la fusión celular es adecuada como un método para fijar células madre a un sitio dañado sin construir ambientes circundantes adecuados para las células madre, esto es, sin construir un anclaje para fijar las células, y posteriormente se estudió ampliamente la fusión celular. Como resultado, se encontró que el ATP o un metabolito del mismo promueve la fusión celular, particularmente la fusión celular entre células somáticas y células madre.

30 Esto es, la presente invención proporciona un promotor de la fusión celular que incluye ATP o un metabolito del mismo, y se refiere a un promotor de la fusión celular que incluye ATP o un metabolito del mismo como ingrediente activo. La presente invención también se refiere a un método para producir células fusionadas en presencia de ATP o un metabolito del mismo.

35 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica para la regeneración funcional o mejora con una célula madre para la disfunción o hipofunción debida a daño o degeneración de un tejido u órgano vivo, que incluye ATP o un metabolito del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, la presente invención se refiere al uso de ATP o un metabolito del mismo para producir una composición farmacéutica para la regeneración funcional o mejora con una célula madre para la disfunción o hipofunción debida a daño o degeneración de un tejido u órgano vivo, que incluye ATP o un metabolito del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, la presente invención se refiere a un método para tratar una enfermedad basada en la disfunción o hipofunción debido a daño o degeneración de un tejido u órgano vivo, que incluye administrar una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que incluye ATP o un metabolito del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable a un paciente con la enfermedad.

40 En la presente invención, por primera vez se revela la acción de ATP en las células, y se ha revelado la acción promotora de ATP o un metabolito del mismo sobre la fusión celular. La fusión celular no es útil sólo para la producción de anticuerpos monoclonales, sino también es muy útil para la regeneración de un tejido u órgano vivo, y particularmente se espera la utilización de la fusión celular en la regeneración y crecimiento de células somáticas puesto que en años recientes se ha encontrado la plasticidad de células madre somáticas.

45 La presente invención proporciona un promotor de la fusión celular para la fusión celular *in vitro* o *in vivo*, y cualesquiera sustancias usadas como ingrediente activo de la presente invención son sustancias muy seguras producidas en el organismo vivo, contribuyendo así significativamente al campo médico de la utilización de la fusión celular y el campo de la fabricación de anticuerpos.

50 Muchas de las células musculares, tales como células miocárdicas, aparecen como células multinucleadas, y las

células fusionadas producidas por el método de la presente invención se pueden usar directamente como células en el organismo vivo, y de este modo la presente invención es extremadamente útil para medicina de regeneración, particularmente medicina de regeneración para células miocárdicas.

#### Breve descripción de los dibujos

- 5 La FIG. 1 es una fotografía a color de células miocárdicas y células de médula ósea cocultivadas, inmunoteñidas para fluorescencia, observadas bajo un microscopio de fluorescencia.
- La FIG. 2 es una gráfica de células miocárdicas y células de médula ósea cocultivadas, inmunoteñidas para fluorescencia, analizadas mediante citometría de flujo.
- 10 La FIG. 3 es una gráfica que muestra el resultado de grupos de células miocárdicas y células de médula ósea a los que se añadieron 0 mM, 1 mM, 2 mM o 3 mM de ATP en el momento del cocultivo de los mismos, según se analiza mediante la misma citometría de flujo como en la FIG. 2.
- La FIG. 4 es una gráfica que muestra la relación (%), basada en el resultado en la FIG. 3, del número de células fusionadas al número total de células en cada grupo al que se añadió ATP.

#### Mejor modo para llevar a cabo la invención

- 15 ATP o un metabolito del mismo, en la presente invención, incluye ATP (5'-trifosfato de adenosina) o sustancias reconocidas como metabolitos u homólogos del mismo en el organismo vivo, tales como ADP (5'-difosfato de adenosina), AMP (ácido adenílico), ácido 5'-inosínico, o similares. Se puede usar un ingrediente que incluye ATP o uno o más metabolitos del mismo, y habitualmente se usa fácil y preferiblemente ATP. ATP o un metabolito del mismo, en la presente invención, puede formar una sal, y la sal no está limitada particularmente en tanto que sea farmacéuticamente aceptable. La sal de ATP o un metabolito del mismo es preferiblemente una sal de metal alcalino, tal como la sal sódica o la sal potásica, o una sal de metal alcalino-térreo, tal como la sal de magnesio o sal de calcio.

- 25 El promotor de la fusión celular de la presente invención incluye como ingrediente activo el ATP mencionado anteriormente, o un metabolito del mismo, y se puede usar, si es necesario, como una composición que promueve la fusión celular, que comprende ATP y un metabolito del mismo y un vehículo aceptable en el tratamiento de fusión celular. El promotor de la fusión celular y/o la composición promotora de la fusión celular de la presente invención se pueden usar añadiéndolos a un medio en el que las células se van a fusionar, o administrándolos al organismo vivo.

- 30 El método para producir células fusionadas en presencia de ATP o un metabolito del mismo en la presente invención se puede llevar a cabo añadiendo o administrando ATP o un metabolito del mismo en la presente invención, o el promotor de la fusión celular o la composición promotora de la fusión celular, en condiciones habituales de fusión celular. La cantidad añadida o administrada no está limitada particularmente en tal intervalo, para no provocar efectos secundarios sobre las células. En la presente invención, el propio ATP o su metabolito es una sustancia capaz de estar presente en condiciones habituales en el organismo vivo. La sustancia se puede usar así en una gran cantidad con menos toxicidad, y se usa habitualmente añadiéndola a un medio de fusión celular a una concentración de preferiblemente 0,01 mM a 100 mM, 0,01 mM a 10 mM, 0,1 mM a 10 mM, o 0,1 mM a 3 mM, más preferiblemente 1 mM a 3 mM.

- 40 Las células usadas en la fusión celular de la presente invención pueden incluir diversas células tales como células microbianas, células vegetales y células de animales, preferiblemente células de animales, más preferiblemente células de mamíferos. La fusión celular de la presente invención también incluye la fusión celular entre células inmunitarias y células cancerosas, preferiblemente la fusión celular entre células somáticas y células madre.

- 45 Se describe el uso de células madre, ya sean células madre embrionarias o células madre somáticas, pero, desde el punto de vista del uso de células autólogas, preferiblemente se usan células madre somáticas. Las células madre somáticas pueden ser cualquiera de células madre mesenquimatosas, células madre hematopoyéticas y células madre neuronales, pero por razones de disponibilidad son preferibles las células de médula ósea. Las células madre objetivo se pueden seleccionar purificando y separando células de médula ósea antes del uso.

- 50 En la fusión celular de la presente invención, las células a fusionar no están particularmente limitadas, y pueden ser células fuera del organismo vivo o células dentro del organismo vivo, y las células derivadas de diversos tejidos u órganos vivos incluyen, por ejemplo, aquellas de tejidos u órganos tales como nervios, músculo (liso, estriado, cardíaco), hueso, cartílago, hígado, riñón, páncreas, epitelio respiratorio, célula hematopoyética, bazo, piel, pelo, diente, córnea, estómago e intestino, por ejemplo hepatocito, osteocito, célula de la sangre, célula inmunitaria, neurocito, célula del músculo esquelético y célula miocárdica. La célula formada mediante la fusión celular de la presente invención es una célula binucleada, y de este modo la célula de la fusión es preferiblemente una célula capaz de sobrevivir como una célula binucleada y mostrar la función objetivo. Tales células incluyen célula

inmunitaria, célula del músculo esquelético y célula miocárdica.

En el caso de células inmunitarias, por ejemplo, se pueden fusionar *in vivo* o *in vitro* células inmunitarias específicas mediante el método de la presente invención, después son inducidas a diferenciarse, y se anclan a un sitio en el organismo vivo.

5 Las células del músculo esquelético se someten a fusión celular en la presente invención en un sitio con un número reducido de células de músculo esquelético, regenerando de ese modo los músculos esqueléticos menguados, y sirviendo de forma útil para el tratamiento de enfermedades tales como distrofia muscular. Las células miocárdicas se pueden someter a fusión celular en la presente invención en un sitio con deterioro de la función cardíaca debido a infarto cardíaco, regenerando o mejorando de ese modo la función cardíaca.

10 Mediante la fusión celular de la presente invención, también se puede utilizar la plasticidad de las células madre. Por ejemplo, una célula miocárdica se puede fusionar con una célula madre hematopoyética para regenerar una célula miocárdica binucleada.

15 La fusión celular de la presente invención permite una regeneración fácil y rápida *in vitro* o *in vivo* de células fusionadas que tienen funciones corporales, reparando o mejorando de ese modo la disfunción o hipofunción en diversos tejidos u órganos. Particularmente, las células del músculo esquelético y las células miocárdicas son originalmente células multinucleadas, de este modo haciendo fácil la fusión celular y facilitando la fusión celular de la presente invención sin establecer ninguna condición particular para la fusión celular. Las células binucleares formadas son similares a las células multinucleadas originales, y pueden retener la función del mismo tipo.

20 Como método de fusión celular *in vitro* en la presente invención, es conveniente y preferible un método de mezclamiento y de cultivo de dos tipos de células a fusionar entre sí. Cuando se realiza *in vivo*, el método de la invención se puede llevar a cabo transplantando células a fusionar, por ejemplo células madre somáticas, tales como células de médula ósea, en un sitio en el que se produce disfunción o hipofunción debido a daño o degeneración de un tejido u órgano vivo, seguido de la adición o administración de la adición o administración a aquél de la composición inventada que contiene un ingrediente activo compuesto de ATP o un metabolito del mismo.

25 En un sitio con gran torrente sanguíneo, tal como en el corazón, se puede usar como tal una célula madre somática contenida en la sangre, tal como célula madre hematopoyética. En este caso, la presente composición que contiene un ingrediente activo compuesto de ATP o un metabolito del mismo se puede añadir o administrar al sitio en el que se produce disfunción o hipofunción debido a daño o degeneración de un tejido u órgano vivo.

30 En este caso, la cantidad de ATP o un metabolito del mismo usada en la presente invención se regula preferiblemente de manera que la concentración de ATP o un metabolito del mismo es 0,01 mM a 100 mM, 0,01 mM a 10 mM, 0,1 mM a 10 mM, o 0,1 mM a 3 mM, o 1 mM a 3 mM, en el sitio en el que se produce disfunción o hipofunción debido a daño o degeneración de un tejido u órgano vivo.

35 El tejido u órgano vivo en la presente invención incluye músculo, sistema inmunitario, hígado, corazón, hueso, cartílago, articulación, y similar, preferiblemente corazón y músculo, en los que aparecen células multinucleares. El daño o degeneración en la presente invención incluye cualquier tipo de deformación, tal como defecto, daño, desnaturalización, deformidad, y similar, en las células que deberían de aparecer originalmente. Cuando las funciones de las células normales circundantes se alteran por daño o degeneración, estas células degeneradas se eliminan preferiblemente antes de la fusión celular de la presente invención.

40 La disfunción o hipofunción de la presente invención engloba cada disfunción o hipofunción en la que toda o una parte de la función original de un tejido u órgano vivo se detiene como un todo o disminuye cuantitativamente. La aplicación del método de la presente invención al caso en el que disminuye una parte de tal función engloba no sólo la terapia sino también la profilaxis.

45 El "vehículo farmacéuticamente aceptable" en la composición farmacéutica de la presente invención incluye un vehículo, un diluyente, una carga, un agente disgregante, un estabilizante, un conservante, un agente tamponante, un emulsionante, una sustancia aromática, un agente colorante, un edulcorante, una sustancia viscosa, una sustancia saborizante, un agente solubilizante, y otros aditivos. Al usar al menos uno de tales vehículos, las composiciones farmacéuticas se pueden preparar en forma de comprimidos, pastillas, polvos, gránulos, inyecciones, líquidos, cápsulas, trociscos, líquidos, suspensiones o emulsiones. Estas preparaciones farmacéuticas se pueden administrar oral o parenteralmente, y es preferible la administración parenteral.

50 La composición farmacéutica de la presente invención se administra preferiblemente mediante un método de inyección directa en un tejido u órgano mediante inyección intravenosa, inyección por catéter, o un método quirúrgico.

La cantidad de la composición farmacéutica de la invención administrada varía dependiendo de la edad, sexo, peso y síntoma del paciente, efecto terapéutico, método de administración, tiempo de tratamiento, y el tipo del ingrediente

activo contenido en la composición farmacéutica, pero habitualmente está en el intervalo de 1 mg a 5000 mg, preferiblemente 10 mg a 1000 mg, por adulto para cada administración. Sin embargo, la cantidad de la composición farmacéutica administrada varía dependiendo de diversas condiciones, y de este modo una cantidad menor que la cantidad anterior puede ser suficiente en algunos casos, o en otros casos puede ser necesaria una cantidad mayor que el intervalo anterior. Particularmente, la inyección se puede producir disolviendo o suspendiendo el ingrediente activo a una concentración de 0,1 µg/ml a 10 mg/ml en un vehículo no tóxico farmacéuticamente aceptable, tal como disolución salina fisiológica o agua destilada comercial para inyección.

La inyección producida de esta manera se puede administrar una o varias veces por día a un paciente que necesite de tratamiento, en una cantidad de 50 µg a 100 mg, preferiblemente 200 µg a 50 mg, por kg de cada administración. Dependiendo del caso, la inyección también se puede preparar como un diluyente no acuoso (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol o aceite vegetal, tal como aceite de oliva, o un alcohol tal como etanol), una suspensión o una emulsión. La presentación aséptica de tal inyección se puede llevar a cabo mediante esterilización a través de filtración con un filtro que retenga las bacterias, obteniendo la inyección con un agente esterilizante, o mediante irradiación. La inyección se puede producir en una forma para ser reconstituida en el momento del uso. Esto es, una composición sólida estéril se puede preparar mediante un método de liofilización, y se puede disolver en agua destilada estéril para inyección o en otro disolvente antes del uso.

La enfermedad a la que se espera que sea aplicable la medicina de regeneración en la presente invención incluye trastornos del sistema nervioso tales como enfermedad de Parkinson, daño medular y enfermedad de Alzheimer, enfermedad cardiovascular tal como infarto cardíaco y miocardiopatía dilatada, enfermedades cutáneas tales como lesión por quemadura, defecto cutáneo traumático y úlcera de presión, enfermedades óseas tales como defecto óseo traumático, defecto de cartilago traumático, osteoporosis y enfermedad periodontal, y cataratas, y la presente invención se aplica particularmente de forma preferible a cardiopatías isquémicas o no isquémicas con función ventricular izquierda disminuida, tales como infarto cardíaco y miocardiopatía dilatada.

En lo sucesivo, la operación de la invención se describe con más detalle, que se expone para la comprensión de la invención y no está destinada a limitar el alcance técnico de la invención.

Se retiró el corazón de una rata Wistar-Kyoto de 1 a 2 días, y se aislaron células miocárdicas del mismo y se cultivaron. Las células mononucleares de médula ósea separadas de la médula ósea de un ratón transgénico que expresa EGFP (proteína fluorescente verde potenciada) se introdujeron en las células miocárdicas, seguido del cocultivo de las mismas.

Una semana después del cocultivo, las células se fijaron con paraformaldehído, y después se inmunotñieron para fluorescencia con MF20 (rojo) como anticuerpo primario específico de las células miocárdicas, y con anticuerpo anti-Ig de ratón conjugado con R-PE como anticuerpo secundario, y se observaron bajo un microscopio de fluorescencia. En la FIG. 1 se muestra la fotografía a color resultante. En la FIG. 1, (A) es una fotografía en la que se usó un filtro de PE, (B) es una fotografía en la que se usó un filtro de FITC, y (C) es una fotografía en la que se usó un filtro doble de PE/FITC. Las células miocárdicas son positivas a MF20, y se muestran en rojo; y las células de médula ósea son positivas a EGFP, y de este modo se muestran en verde. Como se muestra en las células señaladas con flechas en (C) en la FIG. 1, se reconocieron células fusionadas positivas tanto a MF20 como a EGFP.

Para determinar cuantitativamente el número de estas células fusionadas, se usó citometría de flujo. Las células se fijaron con paraformaldehído de la misma manera que antes, después se inmunotñieron para fluorescencia en un estado suspendido con anticuerpo primario MF20, con un anticuerpo anti-ratón conjugado con biotina como anticuerpo secundario, y con un conjugado de estreptavidina/PerCP-cye5.5 como anticuerpo terciario, y se analizaron mediante citometría de flujo. Para cada análisis, se analizaron 50.000 células. El resultado se muestra en la gráfica a color en la FIG. 2. En la FIG. 2, (A) muestra células en la ventana R1, (B) muestra células en la ventana R2, (C) muestra células en la ventana R3, y (D) muestra células en la ventana R4. Se confirmó que las células en la ventana R4 en FIG. 2 (D) son células fusionadas positivas tanto a MF20 como a EGFP.

Después, de acuerdo con una manera similar a la descrita anteriormente, se añadió ATP a una concentración de 0 mM (control), 1 mM, 2 mM y 3 mM, respectivamente, al sistema de cocultivo de célula miocárdica/célula de médula ósea, y se examinó en número de células fusionadas. Cada grupo a la concentración predeterminada de ATP se tiñó de la misma manera que en la FIG. 2, y se analizó mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran en las gráficas en la FIG. 3.

A partir de estos resultados, se calculó la relación de células fusionadas (células en la ventana R4) al número total de células. El resultado se muestra en la gráfica en la FIG. 4. En la FIG. 4, la relación (%) del número de células fusionadas al número total de células se muestra en el eje de ordenadas, y la concentración de ATP (0 mM, 1 mM, 2 mM y 3 mM) se muestra en el eje de abscisa. El asterisco (\*) en la FIG. 4 indica significancia ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo de control. Como resultado, se confirmó que sólo se formaron alrededor de 0,1% de células fusionadas en el grupo de control en ausencia de ATP, mientras que se formaron alrededor de 0,5% de células fusionadas, que son alrededor de 5 veces la cantidad en el grupo de control, en el grupo al que se añadió 1 ó 2 mM de ATP. En el

grupo al que se añadió 1 ó 2 mM de ATP, la relación del número de células fusionadas aumentó significativamente en comparación con el grupo de control.

En lo sucesivo, la presente invención se describe con más detalle mediante referencia a los Ejemplos, pero la presente invención no está limitada por los Ejemplos.

#### 5 Ejemplo 1

Según el método de Minamino et al. (Minamino T., Gaussin V., DeMayo F. J., et al., *Circ. Res.* 2001; 88:587-592), se retiró el corazón de una rata Wistar-Kyoto de 1 a 2 días, y se aislaron las células miocárdicas. Las células miocárdicas resultantes se colocaron en placas a una densidad de  $10^5$  células/cm<sup>2</sup> sobre cada pocillo de una placa de 6 pocillos, y se cultivaron en un medio DMEM que contiene 10% de FCS y penicilina-estreptomina.

10 De forma separada, se recogió la médula ósea del fémur y de la tibia de una rata transgénica que expresa EGFP (proteína fluorescente verde potenciada) de 8 semanas (Nippon SLC), y, según el método de Terada et al. (Naohiro Terada, Takashi Hamazaki, Masahiro Oka, et al., *Nature* 2002; 416:542-545), sólo se separó su componente de células mononucleares mediante el método de Percoll. Las células mononucleares de médula resultantes se resuspendieron en un medio DMEM que contiene 10% de FCS y penicilina-estreptomina. Esta suspensión se  
15 colocó en la placa de 6 pocillos anterior en el segundo día del cultivo de las células miocárdicas, de tal manera que se añadieron a cada pocillo  $10^6$  células mononucleares de médula, seguido del cocultivo de las células.

Una semana después del cocultivo, las células se aislaron individualmente con 0,08 de tripsina, se extendieron sobre, y se unieron con, un portaobjetos con cámara de Lab-Tek de 2 pocillos, se fijaron con paraformaldehído al 4%, se trataron con Triton X-100 al 0,1%, se inmunotifieron para fluorescencia con anticuerpo primario específico  
20 para células miocárdicas MF20 (rojo) y con anticuerpo anti-Ig de ratón conjugado con R-PE (BIOSOURCE) como anticuerpo secundario, y se observaron bajo un microscopio de fluorescencia. El resultado se muestra en la FIG. 1. Como se muestra en las células señaladas con flechas en la FIG. 1 (C), se reconocieron células fusionadas positivas tanto a MF20 como a EGFP.

Después, se determinó cuantitativamente mediante citometría de flujo el número de las células fusionadas. Después  
25 de 1 semana de cocultivo, las células se trataron con tripsina y se fijaron con paraformaldehído de la misma manera que antes, se inmunotifieron para fluorescencia en un estado suspendido con anticuerpo primario MF20 (marcado con PerCP-cye5.5 y capturado como positivo a FL-3), con anticuerpo anti-Ig de ratón conjugado con biotina (BD Pharmingen) como anticuerpo secundario, y con conjugado de estreptavidina/PerCP-cye5.5 (BD Pharmingen) como anticuerpo terciario, y se analizaron mediante citometría de flujo. El resultado se muestra en la FIG. 2. Para cada  
30 análisis se analizaron 50.000 células. Las células de médula ósea fueron positivas a EGFP, y de este modo se capturaron como positivas a FL-1, y se confirmó que las células en la ventana R4 en la FIG. 2 (D) son células fusionadas positivas tanto a MF20 como a EGFP.

#### Ejemplo 2

35 Se añadió ATP a una concentración de 0 mM (control), 1 mM, 2 mM y 3 mM, respectivamente, a cada pocillo en el sistema de cocultivo de células miocárdicas/células de médula ósea mostrado en el Ejemplo 1, y se examinó el número de células fusionadas de la misma manera que en el Ejemplo 1. En el 3<sup>er</sup> día y en el 5<sup>o</sup> día de cocultivo, se recogieron células flotantes, y el medio se cambió con uno reciente que contiene ATP a la concentración predeterminada.

40 El número de las células fusionadas se determinó cuantitativamente mediante citometría de flujo. Después de 1 semana de cocultivo, las células se trataron con tripsina y se fijaron con paraformaldehído de la misma manera que en el Ejemplo 1, se inmunotifieron para fluorescencia en un estado suspendido con anticuerpo primario MF20 (marcado con PerCP-cye5.5 y capturado como positivo a FL-3), con anticuerpo anti-Ig de ratón conjugado con biotina (BD Pharmingen) como anticuerpo secundario, y con conjugado de estreptavidina/PerCP-cye5.5 (BD Pharmingen) como anticuerpo terciario, y se analizaron mediante citometría de flujo. El resultado se muestra en la  
45 FIG. 3. Para cada análisis se analizaron 50.000 células. Las células de médula ósea fueron positivas a EGFP, y de este modo se capturaron como positivas a FL-1, y se confirmó que las células en la ventana R4 en la FIG. 3 (D) son células fusionadas positivas tanto a MF20 como a EGFP. Se confirmó que el número de las células fusionadas en el grupo al que se añadió 1 mM o 2 mM de ATP era mayor que en el grupo de control.

50 El porcentaje (%) de las células fusionadas en las células totales en cada uno de los grupos analizados se muestra en una gráfica. Los resultados se muestran en la FIG. 4. En el grupo al que se añadió 1 ó 2 mM de ATP, la relación del número de células fusionadas aumentó significativamente en comparación con el grupo de control.

#### Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona una composición que tiene una acción promotora sobre la fusión celular, y es útil en el campo industrial que utiliza la fusión celular, por ejemplo el campo de fabricación de anticuerpos y el campo

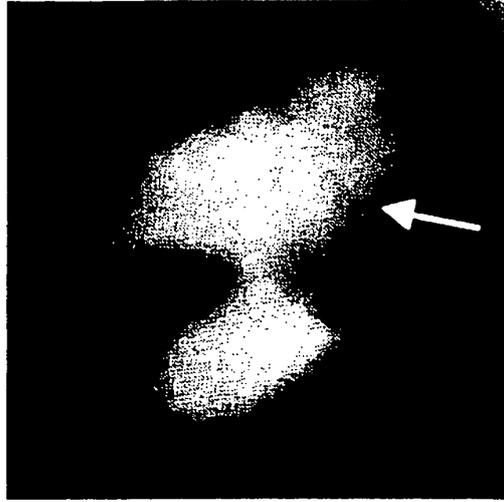
farmacéutico, y es aplicable industrialmente.

**REIVINDICACIONES**

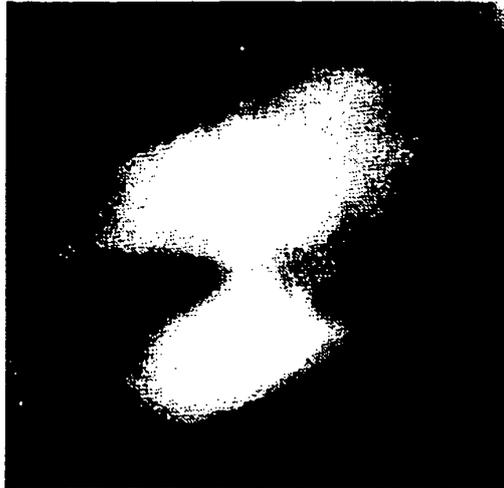
1. Un método in vitro para producir células fusionadas, que comprende fusionar una célula madre somática y una célula somática en presencia de ATP o un metabolito del mismo.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la célula madre somática es una célula de médula ósea.
- 5 3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la célula somática a fusionar es una célula miocárdica.
4. Uso de ATP o un metabolito del mismo para producir una composición farmacéutica para la regeneración funcional o mejora de la disfunción o hipofunción debido a daño o degeneración de un tejido u órgano vivo fusionando una célula madre somática y una célula somática en presencia de ATP o un metabolito del mismo, y en  
10 el que la composición farmacéutica comprende ATP o un metabolito del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
5. El uso según la reivindicación 4, en el que la célula madre somática es una célula de médula ósea.
6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, en el que la célula madre somática es una célula autóloga.
7. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el órgano vivo es un corazón.
- 15 8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que la disfunción o hipofunción debido a daño o degeneración de un tejido u órgano vivo es insuficiencia cardíaca.
9. El uso según la reivindicación 8, en el que la insuficiencia cardíaca es atribuible a infarto cardíaco.
10. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en el que la composición farmacéutica es un fármaco líquido para inyección vascular.
- 20 11. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, en el que la composición farmacéutica es una preparación liofilizada.

FIG. 1

(C)



(B)



(A)

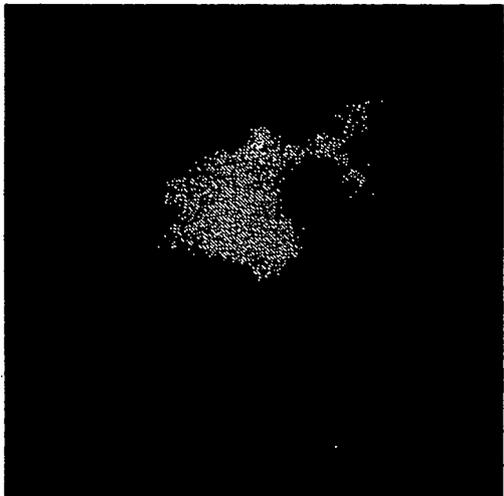


FIG. 2

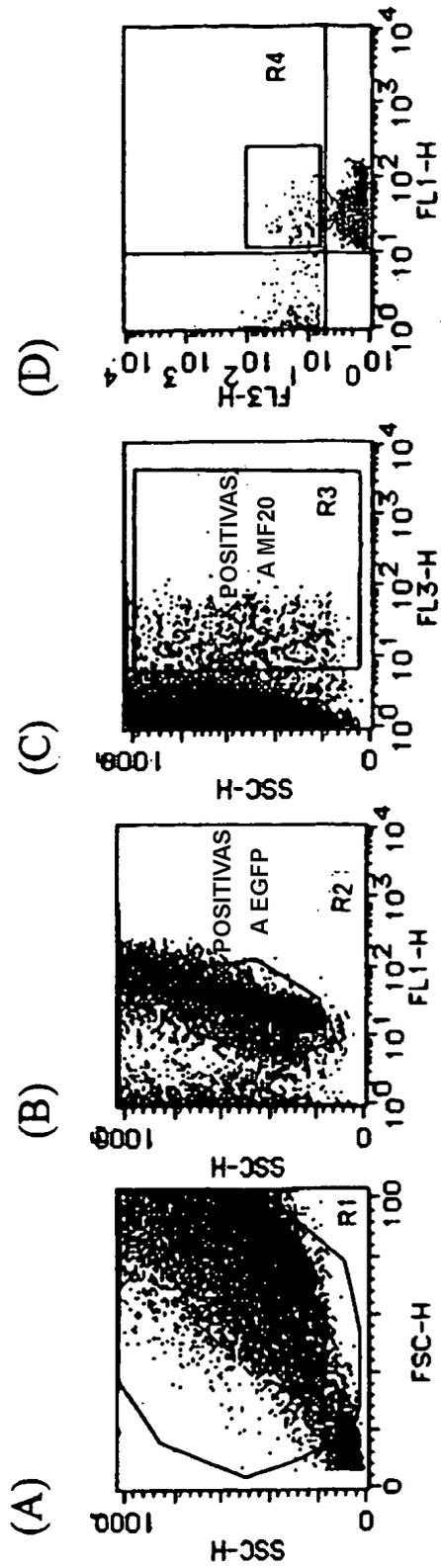
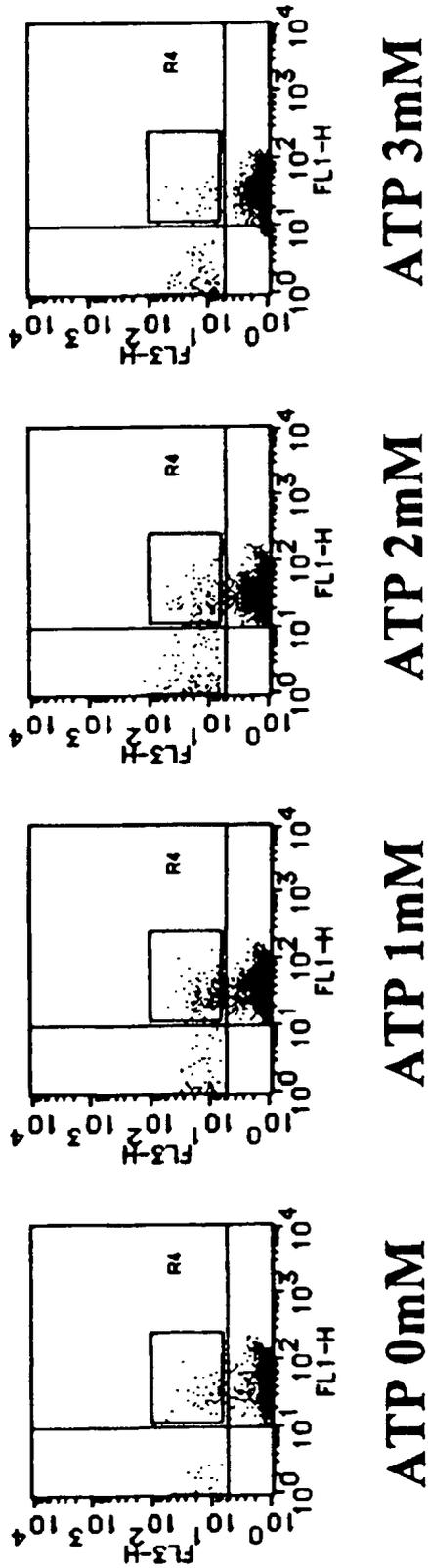


FIG. 3



**FIG. 4**

NÚMERO DE CÉLULAS FUSIONADAS/NÚMERO DE CÉLULAS TOTALES (%)

