

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 022**

51 Int. Cl.:
A61P 15/10 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01)
A61M 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08771042 .2**
96 Fecha de presentación: **13.06.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2162189**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.03.2010**

54 Título: **Procedimientos de restauración de la función erectil**

30 Prioridad:
13.06.2007 US 943762 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.06.2012

73 Titular/es:
**WAKE FOREST UNIVERSITY HEALTH SCIENCES
391 TECHNOLOGY WAY, SUITE 199
WINSTON-SALEM NC 27101, US**

72 Inventor/es:
**YOO, James y
ATALA, Anthony**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 382 022 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

Procedimientos de restauración de la función eréctil

Antecedentes de la invención

5 Más de 600.000 hombres norteamericanos de mediana edad experimentan cierto grado de disfunción eréctil (DE) o impotencia cada año, dando como resultado que aproximadamente de 20 a 30 millones de hombres norteamericanos tengan DE en algún momento durante sus vidas. Los médicos estiman que hasta el 85 % de los casos de DE están causados por problemas médicos o físicos tales como diabetes, hipertensión arterial, enfermedad vascular, cirugía en el área de la próstata y urogenital, lesión de la médula espinal, esclerosis múltiple, trastornos endocrinos o medicaciones. Por ejemplo, aproximadamente el 35-75 % de los hombres con diabetes mellitus están aquejados de DE, lo que representa aproximadamente el 30 % de los casos de DE en los Estados Unidos.

15 Los procedimientos usados en la actualidad para el tratamiento de la DE han incluido dispositivos externos, terapia sexual, implantación quirúrgica de prótesis internas, inyección de fármacos directamente en el pene, medicación oral (por ejemplo, sildenafil, fenotalamina, alprostadilo) y medicaciones aplicadas tópicamente. Ninguna de estas estrategias es totalmente eficaz y tienen diversos efectos secundarios incluyendo cefaleas, diarrea, sofocos, hipotensión, visión de los colores alterada, dolor o vergüenza. Además, el uso de dichos tratamientos induce erecciones temporales en el mismo momento de la administración, y por lo tanto sólo proporcionan un alivio temporal de la DE. Además, el uso de las medicaciones orales disponibles en la actualidad para la DE puede ser peligroso en hombres con enfermedades cardiovasculares, puesto que los fármacos pueden afectar a la presión arterial. De acuerdo con la Asociación Americana del Corazón, la DE en hombres con diabetes de tipo 2 puede ser un signo de aviso temprano de cardiopatía. Por lo tanto, muchos hombres aquejados de DE también pueden tener cardiopatías y no ser conscientes del peligro de tomar medicaciones orales.

Por consiguiente, existe la necesidad de procedimientos mejorados para mejorar la DE. En particular, existe la necesidad de un tratamiento a largo plazo de la DE con efectos secundarios mínimos.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona procedimientos y composiciones para mejorar la disfunción eréctil usando células progenitoras endoteliales. En particular, se desvelan procedimientos para mantener la presión intracavernosa y mejorar la disfunción eréctil inducida por diabetes mellitus.

30 Las células endoteliales disfuncionales son responsables de una disminución en la liberación de óxido nítrico, que conduce a una reducción del flujo de entrada arterial hacia tejidos corporales. La invención demuestra que las células progenitoras endoteliales (EPC) obtenidas de sangre periférica pueden usarse para obtener células endoteliales terapéuticas que, cuando se inyectan en cuerpos enfermos, dichas células pueden restaurar una función eréctil normal en un modelo diabético. Esta tecnología basada en células puede usarse como una modalidad de tratamiento para pacientes diabéticos con disfunción eréctil.

35 En un aspecto, la invención desvela procedimientos para mejorar la disfunción eréctil (DE) en un sujeto que lo necesite, que comprende aislar células endoteliales, inyectar las células endoteliales en tejido corporal y permitir que las células se integren en el tejido y aumenten la concentración tisular local de óxido nítrico, y mantener las células *in vivo* para mejorar la presión intracavernosa tras la estimulación. Las EPC pueden aislarse de sangre periférica o médula ósea. Las células pueden ser alogénicas. En algunas realizaciones preferidas, las células son autólogas. Las células progenitoras endoteliales pueden diferenciarse *ex vivo* para producir células endoteliales. Las células endoteliales pueden aislarse y multiplicarse en cultivo. Las células multiplicadas pueden inyectarse directamente en el cuerpo cavernoso. Pueden implantarse de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 millones de células por inyección. La concentración de células usada puede variar dependiendo del grado de DE presente en el sujeto. Las inyecciones pueden repetirse si es necesario.

45 El procedimiento puede usarse en un sujeto que tenga diabetes mellitus o diabetes de tipo 2. Para mantener el beneficio máximo de la terapia celular, al sujeto también se le puede aconsejar que controle los niveles de glucosa en sangre. Idealmente, los niveles de glucosa en sangre se mantienen dentro del intervalo normal para el sujeto.

50 En algunas realizaciones, pueden usarse células musculares lisas para restaurar la función del músculo liso. En otras realizaciones, pueden combinarse EPC y células musculares progenitoras (MPC) e inyectarse en el tejido corporal para mejorar la función tisular corporal. Las EPC y las MPC pueden aislarse ambas de sangre periférica. Las células pueden obtenerse a partir de células somáticas o células madre.

55 En otro aspecto de la invención, una población celular deseada para su inyección en un sujeto puede aislarse a partir de un fluido corporal, tal como sangre periférica, usando al menos una propiedad física de la población de células deseada o al menos un resto de afinidad específico de célula. Las propiedades físicas pueden incluir filtración por tamaño o separación de células activas mediante marcaje fluorescente o magnético. Los restos de afinidad útiles para atraer una población celular deseada pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos, ligandos

- 5 proteicos, ácidos nucleicos o péptidos. En una realización preferida, el resto de afinidad específico de célula incluye anticuerpos específicos de célula. En algunas realizaciones, las células progenitoras pueden aislarse usando los procedimientos de la invención. Por ejemplo, el resto de afinidad puede seleccionarse para que tenga una afinidad sustancial por un marcador de superficie de célula progenitora específico, tal como CD133, CD31, CD34, sca-1, factor de von Willebrand (vWF) o c-kit. Esto permite la purificación de grandes cantidades de células progenitoras periféricas para su multiplicación y/o diferenciación antes de la administración al sujeto. Pueden encontrarse detalles adicionales sobre técnicas de aislamiento de células en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 61/022.028 de propiedad común, en trámite junto con la presente, presentada el 18 de enero de 2008, titulada "Methods Of Isolating And Purifying Cells For Therapy".
- 10 En otro aspecto más de la invención la población de células a administrar al tejido corporal puede estar encapsulada. En una realización, la encapsulación puede ser en forma de microesferas, por ejemplo, cápsulas de alginato-poli-L-lisina, lo que permite que los nutrientes alcancen las células inmunoprotegidas, mientras que las proteínas de agentes de modulación de la angiogénesis secretadas a partir de las células difundían hacia los tejidos circundantes. Las microesferas protegen las células revestidas del entorno inmune del huésped. Además, como se
- 15 ha señalado anteriormente, las células también pueden modificarse por ingeniería genética para producir factores que aumenten adicionalmente la producción de óxido nítrico y/o modulen los niveles de glucosa en sangre. Pueden encontrarse detalles adicionales sobre técnicas de aislamiento de células en la Solicitud de Patente de Estados Unidos de N° de Serie 10/766.642 de propiedad común, en trámite junto con la presente, presentada el 28 de enero de 2004 (N° Pub. US2005-0002915) titulada "Enhancement Of Angiogenesis To Grafts Using Cells Engineered To Produce Growth Factors".
- 20

Descripción de los dibujos

- La Figura 1 es un esquema que muestra la fisiología de la función eréctil normal;
- la Figura 2 es un esquema que muestra el diseño de estudio global descrito en el Ejemplo, que demuestra que la terapia con células endoteliales derivadas de células progenitoras puede usarse para tratar la disfunción eréctil;
- 25 la Figura 3 es una gráfica de la glucosa en sangre con el tiempo que muestra la comparación entre el grupo con diabetes y el grupo con terapia celular;
- la Figura 4A es una gráfica de los resultados de cavernosometría que muestra la presión intracavernosa en ratas normales;
- 30 la Figura 4B es una gráfica de los resultados de cavernosometría que muestra la presión intracavernosa en ratas diabéticas;
- la Figura 4C es una gráfica de los resultados de cavernosometría que muestra la presión intracavernosa en ratas diabéticas 12 semanas después de la terapia celular con células progenitoras endoteliales;
- 35 la Figura 5 es una gráfica de la relación de la ICP (presión intracavernosa)/MAP (presión arterial media) con el tiempo que compara los resultados de presión intracavernosa del grupo con diabetes (DB), del grupo con diabetes con terapia celular con células endoteliales (CT), del grupo con diabetes con tratamiento con insulina (Insulina) y del grupo con diabetes con terapia celular con células progenitoras endoteliales y tratamiento con insulina (CT + Insulina), después de 4 semanas de inducción de diabetes;
- 40 la Figura 6 es una gráfica de la relación de la MAP (presión arterial media)/ICP (presión intracavernosa) frente a la neuroestimulación, que compara los resultados de cavernosometría del grupo con diabetes y normal 8 semanas después de la inducción de diabetes;
- la Figura 7 es una gráfica de la relación de la MAP (presión arterial media)/ICP (presión intracavernosa) con el tiempo que compara los resultados de cavernosometría del grupo con diabetes (DB) y del grupo con diabetes con terapia celular con células progenitoras endoteliales (DB+CT), después de 8 semanas de inducción de diabetes; y
- 45 la Figura 8 es una gráfica de la relación de la ICP (presión intracavernosa)/MAP (presión arterial media) que compara los resultados para ratas normales, ratas diabéticas (DM) y ratas diabéticas 12 semanas después de la terapia celular con células progenitoras endoteliales (DM+CT).

Descripción detallada

- 50 Para que la invención pueda entenderse más fácilmente, se definen primero ciertos términos:

Los términos "aislar" o "aislada", como se usan en la presente memoria, se refieren al procedimiento de fraccionar células o a células que se han fraccionado en subpoblaciones de las que pueden obtenerse elementos celulares. Esto también puede efectuarse usando técnicas convencionales para la separación de células usadas por expertos en la materia del cultivo celular.

Los términos "diferenciación" o "diferenciada", como se usan en la presente memoria, se refieren a la maduración de una célula progenitora o a una célula que es más madura que la célula progenitora de la que se obtuvo.

5 El término "sujeto", como se usa en la presente memoria, pretende incluir organismos vivos en los que se genera una respuesta inmune. Los sujetos preferidos son mamíferos. Los ejemplos de sujetos incluyen, pero sin limitación, seres humanos, monos, perros, gatos, ratones, ratas, vacas, caballos, cerdos, cabras y ovejas.

I. Disfunción eréctil (DE)

10 La DE es la incapacidad persistente para lograr o mantener una erección suficiente para el funcionamiento sexual. En un estado relajado, existe un equilibrio entre el flujo de sangre hacia dentro y hacia fuera de los cuerpos eréctiles. La función eréctil normal requiere un conjunto complejo de interacciones dinámicas neurales y vasculares. La erección del pene puede generarse por múltiples mecanismos (por ejemplo, psicogénicos centrales y reflexogénicos). Estos mecanismos interactúan durante la actividad sexual normal. Los estímulos psicogénicos incluyen estímulos auditivos, visuales, olfativos o imaginarios, y los estímulos reflexogénicos implican receptores sensoriales en el pene que causan acciones eferentes somáticas y parasimpáticas.

15 Tras la excitación, la actividad parasimpática desencadena una serie de acontecimientos que se inician con la liberación de óxido nítrico y terminan con niveles aumentados del mediador intracelular monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). Los aumentos en el GMPc causan la relajación del músculo liso trabecular y vascular del pene, lo que conduce a un flujo de sangre aumentado hacia los cuerpos cavernosos. El llenado rápido de los espacios cavernosos comprime vénulas, dando como resultado un flujo de salida venoso disminuido (por ejemplo, el mecanismo veno-oclusivo corporal). La combinación de un flujo de entrada aumentado y un flujo de salida disminuido aumenta rápidamente la presión intracavernosa, dando como resultado una rigidez progresiva del pene y una erección completa. Se muestra un esquema de la función eréctil normal en la Figura 1.

20 Aunque la DE puede tener causas orgánicas o psicogénicas, la mayoría de los casos tienen al menos cierta causa orgánica, tal como causas vasculogénicas, neurogénicas y hormonales. Aproximadamente el 35-75 % de los hombres con diabetes mellitus están aquejados de DE, lo que representa aproximadamente el 30 % de los casos de DE en los Estados Unidos. La DE en hombres con diabetes tiene una etiología multifactorial y se ha asociado con disfunción de células endoteliales, neuropatía, enfermedad vascular, trastornos endocrinos, control y asociación de la diabetes. Los mecanismos específicos y las alteraciones asociadas incluyen, por ejemplo, hiperglucemia, que puede conducir a la glicosilación de fibras elásticas y a la ausencia de relajación de los cuerpos cavernosos, disfunción endotelial de las células endoteliales sinusoidales, que puede dar como resultado disminuciones en la liberación de óxido nítrico y una vasodilatación alterada, y enfermedad vascular periférica, que puede dar como resultado un flujo de entrada arterial y arteriolar reducido.

25 En un aspecto de la invención, se desvelan procedimientos de mejora de la DE usando terapia celular. Se muestra que las células progenitoras endoteliales (EPC) inyectadas en el tejido corporal tienen un efecto a largo plazo hacia la mejora de la DE. Los procedimientos de la invención pueden usarse para aumentar las concentraciones de óxido nítrico locales. Las EPC pueden obtenerse de sangre periférica, preferentemente del paciente a tratar. En otras realizaciones, pueden usarse células madre mesenquimatosas. En otras realizaciones más, puede inyectarse una combinación de tipos celulares diferentes en el tejido corporal. Por ejemplo, pueden usarse EPC y células musculares lisas como se describe a continuación. En otras realizaciones más, las células pueden combinarse con factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento transformante alfa y beta (TGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

30 Los procedimientos de la invención proporcionan una terapia a largo plazo para hombres con DE. Por ejemplo, se han visto mejoras hasta 12 semanas después de la terapia celular. En pacientes con diabetes, se ha demostrado que los procedimientos de terapia celular de la invención tienen efectos más prolongados si se controla la glucosa en sangre (por ejemplo, a través del uso de medicación tal como insulina, dieta y ejercicio).

35 La cantidad de células inyectadas variará basándose en el grado de enfermedad y el estado y el peso del sujeto a tratar. Por ejemplo, pueden inyectarse de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 10 millones de células por inyección en el cuerpo cavernoso. Las inyecciones pueden repetirse si es necesario.

50 II. Cultivo de células

Las células endoteliales pueden aislarse a partir de poblaciones celulares alogénicas obtenidas de la misma especie o autógenas obtenidas del propio tejido del sujeto. Las células también pueden ser xenogénicas, cuando las poblaciones celulares proceden de una especie de mamífero que es diferente del sujeto. Por ejemplo, las células de tejidos pueden proceder de mamíferos tales como monos, perros, gatos, ratones, ratas, vacas, caballos, cerdos, cabras y ovejas.

55 Las células aisladas son preferentemente células obtenidas de una muestra de sangre periférica o biopsia, a partir del propio tejido del sujeto. Puede obtenerse una biopsia usando una aguja de biopsia bajo un anestésico local, lo que hace que el procedimiento sea rápido y simple. La pequeña biopsia puede entonces diferenciarse y multiplicarse

en cultivo para obtener las células de tejido. También pueden usarse células de parientes u otros donantes de la misma especie con una inmunosupresión apropiada.

Se analizan procedimientos para el aislamiento y el cultivo de células en Freshney, Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique, 2ª Ed., A. R. Liss, Inc., Nueva York, 1987, Cáp. 9, págs. 107-126. Las células pueden aislarse usando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, el tejido puede cortarse en trozos, disgregarse mecánicamente y/o tratarse con enzimas digestivas y/o agentes quelantes que debilitan las conexiones entre las células vecinas, haciendo posible dispersar el tejido en una suspensión de células individuales sin rotura celular apreciable. Si es necesario, la disociación enzimática puede efectuarse triturando el tejido y tratando el tejido triturado con cualquiera de varias enzimas digestivas en solitario o en combinación. Éstas incluyen, pero sin limitación, tripsina, quimotripsina, colagenasa, elastasa y/o hialuronidasa, ADNasa, pronasa y dispasa. La rotura mecánica también puede efectuarse por varios procedimientos incluyendo, pero sin limitación, raspado de la superficie del tejido, el uso de trituradoras, mezcladoras, tamices, homogeneizadoras, celdas de presión o insonorizadores por nombrar sólo algunos.

Los tipos de células incluyen, pero sin limitación, células endoteliales tales como células endoteliales humanas, células progenitoras aisladas de la sangre periférica o de la médula ósea que pueden inducirse para que se diferencien en diferentes células, pueden usarse células madre, células madre comprometidas y/o células diferenciadas. En una realización preferida, las células progenitoras endoteliales se obtienen de forma autóloga de sangre periférica.

Además, dependiendo del tipo de tejido u órgano que se esté generando, pueden usarse tipos específicos de células madre comprometidas. Por ejemplo, pueden usarse células mioblásticas para construir diversas estructuras musculares. Pueden usarse otros tipos de células madre comprometidas para generar órganos o tejido de tipo órgano, tal como corazón, riñón, hígado, páncreas, bazo, vejiga, uréter y uretra. Otras células incluyen, pero sin limitación, células endoteliales, células musculares, células musculares lisas, fibroblastos, osteoblastos, mioblastos, neuroblastos, fibroblastos, glioblastos; células germinales, hepatocitos, condrocitos, queratinocitos, células musculares cardíacas, células de tejido conectivo, células epiteliales, células endoteliales, células secretoras de hormonas, células del sistema inmune, neuronas, células del corazón, riñón, hígado, páncreas, bazo, vejiga, uréter y uretra y similares. En algunas realizaciones es innecesario seleccionar previamente el tipo de célula madre que se va a usar, ya que pueden inducirse muchos tipos de células madre para que se diferencien en un patrón específico de órgano una vez administradas a un órgano dado. Por ejemplo, puede inducirse una célula madre administrada al hígado para que se convierta en una célula de hígado poniendo simplemente la célula madre dentro del entorno bioquímico del hígado.

Los ejemplos también incluyen células que se han modificado por ingeniería genética, células transformadas y células inmortalizadas. Un ejemplo de células modificadas por ingeniería genética útiles en la presente invención es una célula modificada por ingeniería genética que genera y secreta una o más moléculas deseadas. Cuando las células modificadas por ingeniería genética se implantan en un organismo, las moléculas producidas pueden producir un efecto local o un efecto sistémico, y pueden incluir las moléculas identificadas anteriormente como sustancias posibles.

Las células pueden producir sustancias que inhiban o estimulen la inflamación; faciliten la cicatrización; resistan el rechazo inmune; proporcionen el reemplazo de hormonas; reemplacen a neurotransmisores; inhiban o destruyan células cancerosas; promuevan el crecimiento celular; inhiban o estimulen la formación de vasos sanguíneos; aumenten el tejido; y complementen o reemplacen el siguiente tejido, neuronas, piel, líquido sinovial, tendones, cartílago, ligamentos, hueso, músculo, órganos, duramadre, vasos sanguíneos, médula ósea y matriz extracelular. Pueden añadirse otros factores e inductores de la diferenciación al cultivo para promover tipos específicos de crecimiento celular.

Una vez que el tejido se ha reducido a una suspensión de células individuales, la suspensión puede fraccionarse en subpoblaciones de las que pueden obtenerse elementos celulares. Esto también puede efectuarse usando técnicas convencionales para la separación de células incluyendo, pero sin limitación, la clonación y selección de tipos celulares específicos, la destrucción selectiva de células no deseadas (selección negativa), la separación basada en la capacidad de aglutinación diferencial en la población mixta, procedimientos de congelación-descongelación, propiedades de adherencia diferencial de las células en la población mixta, filtración, centrifugación convencional y zonal, elutriación centrífuga (centrifugación contracorriente), separación por gravedad unitaria, distribución contracorriente, electroforesis y separación de células activadas por fluorescencia (véase, por ejemplo, Freshney, (1987) Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Techniques, 2ª Ed., A. R. Liss, Inc., Nueva York, Cap. 11 y 12, págs. 137-168). Por ejemplo, las células salivares pueden enriquecerse por separación de células activadas por fluorescencia. También puede usarse separación magnética.

También puede ser deseable el fraccionamiento de células, por ejemplo, cuando el donante tiene enfermedades tales como cáncer o tumor. Puede someterse a separación una población celular para separar las células cancerosas o tumorales de las células normales no cancerosas. Las células normales no cancerosas, aisladas por una o más técnicas de separación, pueden usarse después para la reconstrucción de tejidos.

Pueden añadirse factores de crecimiento y factores reguladores a los medios para aumentar, alterar o modular la proliferación y la maduración y diferenciación de las células en los cultivos de células aisladas. El crecimiento y la actividad de las células en cultivo puede verse afectado por diversos factores de crecimiento tales como hormona de crecimiento, somatomedinas, factores estimulantes de colonias, eritropoyetina, factor de crecimiento epidérmico, factor eritropoyético hepático (hepatopoyetina) y similares. Otros factores que regulan la proliferación y/o diferenciación incluyen prostaglandinas, interleucinas y chalonas de origen natural.

Las células diferenciadas pueden cultivarse *in vitro* para aumentar el número de células disponibles para su inyección. Las células diferenciadas que se han multiplicado también pueden someterse a una etapa de aislamiento adicional para obtener una o más poblaciones de células. Para prevenir una respuesta inmunológica después de la implantación de las células, el sujeto puede tratarse con agentes inmunosupresores tales como ciclosporina o FK506.

Las células diferenciadas pueden transfectarse con una secuencia de ácido nucleico. Las secuencias de ácido nucleico útiles pueden ser, por ejemplo, secuencias genéticas que reduzcan o eliminen una respuesta inmune en el huésped. Por ejemplo, la expresión de antígenos de superficie celular, tales como antígenos de histocompatibilidad de clase I y clase II, puede suprimirse. Además, la transfección también podría usarse para la administración de genes. Las células pueden transfectarse con genes específicos antes de la siembra sobre el sustituto biocompatible. Por lo tanto, las células cultivadas pueden modificarse por ingeniería genética para expresar productos génicos que producirían una proteína deseada que contribuya a mejorar un trastorno particular.

Las células cultivadas pueden modificarse por ingeniería genética para producir productos génicos beneficiosos para la implantación, por ejemplo, factores antiinflamatorios, por ejemplo, anti-GM-CSF, anti-TNF, anti-IL-1 y anti-IL-2. Como alternativa, las células endoteliales pueden modificarse por ingeniería genética para inactivar (*knock out*) la expresión de productos génicos nativos que promueven la inflamación, por ejemplo, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2 o inactivar la expresión del MHC para disminuir el riesgo de rechazo.

Pueden usarse procedimientos para modificar células por ingeniería genética, por ejemplo, con vectores retrovirales, vectores adenovirales, vectores virales adenoasociados, polietilenglicol u otros procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Estos incluyen el uso de vectores de expresión que transporten y expresen moléculas de ácido nucleico en las células. (Véase Geoddel; Gene Expression Technology: Procedimientos in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

El ADN vector se introduce en células procariontas o eucariotas mediante técnicas de transformación o transfección convencionales. Pueden encontrarse procedimientos adecuados para transformar o transfectar células huésped en Sambrook y col. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989), y otros libros de texto de laboratorio.

Las células de la invención pueden usarse en diversas aplicaciones. Por ejemplo, las células endoteliales pueden implantarse en un sujeto para reemplazar o aumentar el tejido existente. El sujeto puede controlarse después de la implantación de las células endoteliales, para la mejora del trastorno.

Las células pueden usarse *in vitro* para explorar una amplia diversidad de compuestos, para determinar la eficacia y la citotoxicidad de agentes farmacéuticos, agentes químicos, factores de crecimiento/reguladores. Los cultivos pueden mantenerse *in vitro* y exponerse al compuesto a ensayar. La actividad de un compuesto citotóxico puede medirse por su capacidad para dañar o destruir células en cultivo. Esto puede evaluarse fácilmente mediante técnicas de tinción vitales. El efecto de factores de crecimiento/reguladores puede evaluarse analizando el contenido celular después de la inyección, por ejemplo, mediante recuentos de células totales y recuentos de células diferenciales. Esto puede lograrse usando técnicas citológicas y/o histológicas convencionales, incluyendo el uso de técnicas inmunocitoquímicas que emplean anticuerpos que definen antígenos celulares específicos de tipo. Puede evaluarse el efecto de diversos fármacos sobre células normales cultivadas en el tejido artificial.

Ejemplos

Ejemplo 1: Materiales

A menos que se indique otra cosa, todos los productos químicos se adquirieron en Sigma (St. Louis, MO). Los tampones de ECL y 125I-Sodio se adquirieron en PerkinElmer NEN (Boston, MA). La collagenasa de tipo II (1 mg/ml) se adquirió en Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania). El medio endotelial (EBM-2) se adquirió en Cambrex Bio Science (Walkersville, MD). Los reactivos y cebadores de PCR, el medio M199, el suero fetal bovino (FBS) y la penicilina se adquirieron en Life Technologies (Gaithersburg, MD). El factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) se obtuvo por cortesía de Judith Abraham, (Scios Nova, CA). Los anticuerpos monoclonales anti-CD31 humano marcados con FITC se adquirieron en Santa Cruz (Santa Cruz, CA). El policlonal de conejo anti-factor de von Willebrand (vWF), los anticuerpos anti-actina de músculo liso y los anticuerpos anti-IgG de conejo marcados con FITC se adquirieron en DAKO (Glostrup, Dinamarca). Los anticuerpos monoclonal anti-CD31 humano, policlonal de cabra anti-VE Cadherina (VE-Cad), de cabra anti-vWF y policlonal de conejo anti-Flk-1 se adquirieron en Santa Cruz (Santa Cruz, CA). La lectina de *Ulex europeaus* I marcada con FITC y biotina se adquirió en Sigma (St. Louis, MO). Los anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón marcado con biotina y de ratón anti-IgG de cabra marcado con biotina se

adquirieron en Santa Cruz (Santa Cruz, CA). Los anticuerpos anti-CD105 se adquirieron en BD Pharmingen (San Diego, CA). La avidina conjugada con FITC se adquirió en Vector Laboratories (Burlingame, CA).

Ejemplo 2: Inyección de células progenitoras endoteliales para mejorar la disfunción eréctil

5 Este estudio demuestra que las EPC obtenidas de sangre periférica pueden usarse para conseguir células endoteliales maduras. Las células endoteliales inyectadas en cuerpos enfermos son capaces de restaurar la función eréctil normal en un modelo de rata diabética. Esta tecnología basada en células puede ser una modalidad de tratamiento viable para pacientes diabéticos con disfunción eréctil.

10 Se creó un modelo de diabetes por inyección intraperitoneal de estreptozotocina (50 mg/kg). Los animales con un nivel de glucosa en sangre superior a 300 mg/dl se consideraron diabéticos y se usaron para este estudio. Se aislaron EPC a partir de sangre periférica de ratas donantes. Las células se cultivaron, se multiplicaron y se indujeron hacia un linaje de células endoteliales. Las células se caracterizaron usando marcadores específicos de célula (CD31, CD34, vWF, CD133). Las células endoteliales multiplicadas en cultivo se marcaron con colorante rojo fluorescente (PKH26) y se inyectaron directamente en los cuerpos disfuncionales, y se realizó un seguimiento de los animales durante hasta 12 semanas. Se evaluó la función eréctil por la presión intracavernosa y los tejidos corporales se recuperaron para análisis histo- e inmunohistoquímicos. La Figura 2 muestra un esquema del diseño de estudio global.

(i) Inducción de diabetes, tratamiento y anestesia.

20 Se criaron y se desarrollaron 84 ratas Lewis macho que pesaban aproximadamente 200-250 g en la Wake Forest University. Los animales tenían libre acceso a agua y alimento y cuidados especiales para animales diabéticos. Todos los procedimientos experimentales se revisaron y autorizaron por el Wake Forest University Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) y se realizaron de conformidad con el Animal Welfare Act y la guía para el Care and Use of Laboratory Animals. Los animales se alojaron en las instalaciones para animales de la Wake Forest University con un ciclo de 12 horas de luz.

25 Se indujo diabetes mediante 50 mg/kg de estreptozotocina (STZ) intraperitoneal disuelta en solución tampón estéril de fosfato sódico 0,2 M y ácido cítrico 0,1 M.

30 Antes de la inyección, se midió la glucosa en sangre de la cola para obtener los valores basales. Después de la inyección, se midió la glucosa en sangre de la cola durante tres días consecutivos para confirmar la hiperglucemia. Si las ratas no se volvían diabéticas después de la primera inyección de STZ, esas ratas recibían una segunda inyección de STZ la semana siguiente. Los animales con un nivel de glucosa en sangre de 300 mg/dl o más se consideraron diabéticos y se usaron para los experimentos posteriores. Los niveles de glucosa en sangre y el peso corporal se controlaron cada semana durante 8-11 semanas usando un kit de ensayo de glucosa, y estas ratas diabéticas se dividieron en cuatro grupos:

- 35 GRUPO I: Ratas Lewis diabéticas (n = 20).
- GRUPO II: Ratas Lewis diabéticas con terapia celular (n = 20).
- GRUPO III: Ratas Lewis diabéticas con tratamiento con insulina (n = 20).
- GRUPO IV: Ratas Lewis diabéticas con tratamiento con insulina y terapia celular (n = 20).

40 Además, se usaron 10 ratas Lewis de la misma edad como control normal. Todos los animales recibieron el tratamiento establecido para cada grupo durante otras 12 semanas. La Figura 3 es la curva de normalización diabética que muestra una gráfica de la glucosa en sangre con el tiempo para el grupo con diabetes y el grupo con diabetes con terapia celular.

(ii) Aislamiento de EPC

45 Se aislaron células mononucleares a partir de 10 ml de sangre periférica de ratas Lewis donantes singénicas mediante centrifugación en gradiente de densidad con histopaque 1077 (Sigma). Inmediatamente después del aislamiento, las células mononucleares se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos revestidas con fibronectina humana (Sigma) a una concentración de 5×10^6 células en cada uno, se mantuvieron en medio basal endotelial (EBM, CellSystems) complementado con EGM SingleQuots, que contenía suero bovino fetal al 2 %, VEGF-1 humano, factor de crecimiento de fibroblastos humano (FGF-2), factor de crecimiento epidérmico humano (EGF), factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1) y ácido ascórbico, y se incubaron durante dos días a 37 °C, CO₂ al 5 % con una humedad >95 %.

50 Después de dos días, las células no adherentes se recogieron y se cultivaron a una concentración de 1×10^6 células sobre placas de 24 pocillos revestidas con fibronectina, y se incubaron durante 3 días adicionales para permitir la formación de colonias endoteliales.

La amplia mayoría de estas células multiplicadas *ex vivo* eran de linaje endotelial y, como tales, constituían la fracción enriquecida en EPC multiplicada *ex vivo*.

Las células se aislaron, se cultivaron, se diferenciaron y se multiplicaron hasta que se obtuvo un número de células suficiente para su implantación (8 semanas). Las células implantadas estaban en pase 7, 8 y 9.

(iii) Examen in vitro

5 La caracterización celular se realizó con el examen de la expresión de los marcadores de superficie celular CD31, CD34, vWF y CD133 a una dilución de 1:20. El inmunomarcaje se realizó usando el kit de detección de avidina-biotina (Vectastain elite ABC, Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA) y por inmunofluorescencia a una dilución de 1:200 para el segundo anticuerpo.

(iv) Marcaje con PKH26

10 Las EC se marcaron con rojo PKH26 de fluorescencia roja usando un kit de engarce celular (PKH26, Sigma, Saint Louis, MI) de acuerdo con las directrices de los fabricantes. En resumen, se añadieron células en PBS a una solución de colorante 10 μ M y se mezclaron suavemente. Después de un periodo de incubación de 5 min a 25 °C se añadió FBS para detener la reacción de tinción. La solución de tinción se eliminó por lavados repetitivos con PBS. Después de la conformación de la fluorescencia por microscopía, las células se pusieron en hielo hasta su inyección.

(v) Transplante de EPC

15 Las ratas se anestesiaron usando una unidad de anestesia (VetEquip, Inc. Pleasanton, CA) con el 1-2 % de isoflurano inhalado (Abbott) mezclado con 3 l/min de O₂. Las ratas se pusieron en posición supina sobre una mesa quirúrgica termorregulada. La pared abdominal ventral y el perineo se afeitaron con una afeitadora eléctrica y se limpiaron con betadine. Usando una técnica estéril, se realizó una incisión en la línea media en el perineo. El cuerpo cavernoso se disecó mediante disección roma y se dejó expuesto. Usando una aguja de calibre 30 unida a una
20 jeringa de microlitros, se inyectaron $1-2 \times 10^6$ células diluidas en 20 μ l de EGM-2 en el cuerpo cavernoso. Las ratas del grupo de control diabético (Grupo I) recibieron solamente 0,2 ml de EGM-2 como vehículo.

(vi) Tratamiento con insulina

25 Las ratas diabéticas de los grupos III y IV recibieron tratamiento con inyección de 5-10 UI de insulina (Eli Lilly, Indianapolis, IN, Estados Unidos) subcutánea todos los días, con el fin de mantener los niveles de glucosa en sangre en un intervalo normal.

(vii) Resultados

Presión intracavernosa en ratas normales y diabéticas

30 Para la técnica quirúrgica para evaluar la presión intracavernosa, a las 4, 8 y 12 semanas después del tratamiento se anestesiaron 5 ratas de cada grupo con una inyección i.p. (35 mg/kg) de pentobarbital sódico. La anestesia se mantuvo durante el transcurso del protocolo experimental (2-3 h), según fue necesario, mediante inyección posterior de pentobarbital (5-10 mg/kg) cada 45-60 min según fue necesario. El cuello, la pared abdominal ventral y el perineo se afeitaron con una afeitadora eléctrica y se limpiaron con betadine.

35 La arteria carótida se expuso a través de una incisión en el cuello en la línea media anterior y se canuló con un catéter de polietileno 19 fr relleno con solución salina fisiológica y conectado a un transductor de presión para controlar de forma continua la presión arterial media (MAP).

40 El transductor de presión se calibró en cmH₂O antes de cada experimento. Se realizó una incisión en la línea media inferior a través del abdomen inferior, y se identificaron la vejiga y la próstata. El plexo hipogástrico inferior (es decir, el plexo pélvico o los ganglios pélvicos principales), los nervios pélvicos y el nervio cavernoso se identificaron posterolaterales a la próstata a ambos lados, y se pusieron electrodos bipolares de alambre de acero inoxidable
45 alrededor de estas estructuras para su estimulación eléctrica. La determinación de una "erección" en rata es a través de la medición de la presión cavernosa. En seres humanos y animales, la presión es inicialmente muy baja (aprox. 5-10 mmHg), y durante la erección aumenta hasta el 60-90 % de la presión arterial sistémica (dependiendo de la especie y del emplazamiento de la aguja).

45 Después el pene se despojó de la piel; se expusieron ambos cruras (cuerpos cavernosos) eliminando parte del músculo isquiocavernoso que los recubre. Para controlar la ICP, una cánula de 20 G se llenó con 250 U/ml de solución de heparina, se conectó a un tubo de polietileno-50 (Intramedic, Becton Dickinson, CA, Estados Unidos) y se insertó en el cuerpo cavernoso derecho. El transductor de presión se calibró en cmH₂O antes de cada experimento.

50 Ambas líneas de presión se conectaron a un transductor de presión y, después, mediante un amplificador de transductor (ETH 401) a una tarjeta de adquisición de datos con visualización a tiempo real y registro de la ICP (PowerLab. Chart 5, ADInstruments).

El nervio cavernoso se electroestimuló directamente como se ha descrito previamente con un electrodo de gancho bipolar de acero inoxidable delicado unido a la pinza multiarticulada. Cada sonda tenía un diámetro de 0,2 mm; los

dos polos estaban separados por 1 mm. Se administraron impulsos rectangulares monofásicos mediante un generador de señales (hecho a medida y con un amplificador de corriente constante integral) (Grass, Astro Med, Inc. W. Warwick, RI, Estados Unidos). Los parámetros de estimulación eran: 20 Hz, anchura de impulso 0,22 ms y duración 1 min; se usó una corriente creciente de 1, 2, 4 y 6 mA. El intervalo de estímulo era de 10 min. Estos parámetros se registraron en un polígrafo y la adquisición de datos y el cálculo de los parámetros derivados se realizaron usando un sistema informático de *software* (Véanse las Figuras 4A-C parte superior: presión arterial media (MAP), parte inferior: presión intracavernosa (ICP)).

La Figura 5 es una gráfica de la relación de la ICP (presión intracavernosa)/MAP (presión arterial media) frente al tiempo que compara la presión intracavernosa con el tiempo de los cuatro grupos: grupo con diabetes (DB), grupo con diabetes con terapia celular con células endoteliales (CT), grupo con diabetes con tratamiento con insulina (Insulina) y grupo con diabetes con terapia celular con células progenitoras endoteliales y tratamiento con insulina (CT + Insulina) 4 semanas después de la inducción de diabetes.

La Figura 6 es una gráfica de la relación de la MAP (presión arterial media)/ICP (presión intracavernosa) frente a la neuroestimulación que compara los resultados de cavernosometría del grupo con diabetes y normal 8 semanas después de la inducción de diabetes.

La Figura 7 muestra una gráfica de la MAP/ICP con el tiempo que compara los resultados de cavernosometría del grupo con diabetes (DB) y del grupo con diabetes con terapia celular con células progenitoras endoteliales (DB+CT), después de 8 semanas de inducción de diabetes. La MAP/ICP en el grupo con terapia celular tenía una mejora continua hasta las 12 semanas después de la inyección, indicando el efecto a largo plazo de la terapia.

Al final del estudio (12 semanas después de la inyección de EPC), la relación de la ICP/MAP con diferentes cantidades de neuroestimulación se comparó para los grupos normal, con diabetes (DM) y con diabetes con terapia celular (DM+CT), como se muestra en la Figura 8 (los resultados se presentan en valores medios \pm etm. * $p < 0,05$ frente al grupo normal). Después de 12 semanas después de la terapia celular, el DM+CT se parecía mucho a los resultados del grupo normal. Los resultados indican los efectos a largo plazo de la terapia celular con progenitoras endoteliales.

Histología e inmunofluorescencia

Después de la cavernosometría, el pene se escindió en su base y el glande del pene y el tejido conectivo que rodea el eje se extirparon para estudios histológicos. Las muestras de tejido recuperadas se pusieron en Tissue-Tek® O.C.T. Compuesto 4583 (Sakura®) y se congelaron en nitrógeno líquido. Los bloques congelados se seccionaron en cortes de 6 μ m usando un criostato (Modelo CM 1850, Leica Microsystems, Bannockburn, IL). Los cortes se fijaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina (HyE).

Las células marcadas con PKH26 se identificaron mediante microscopía de fluorescencia usando una longitud de onda de excitación de 550 nm. Se tomaron imágenes digitales (Microscopio Zeiss Axio Imager M1, Carl Zeiss, Thornwood, NY) a aumentos variables. Las células implantadas marcadas con PKH26 podían detectarse en el tejido de los cuerpos después de 4, 8 y 12 semanas, indicando la supervivencia a largo plazo de las células.

Se aislaron, cultivaron y multiplicaron con éxito células endoteliales derivadas de EPC.

Los fenotipos de células endoteliales progenitoras y diferenciadas se confirmaron usando inmunohistoquímica con anticuerpos específicos de célula. Los animales inyectados con células mostraron una mejora sustancial en la presión intracavernosa y su función eréctil se restauró hasta niveles normales. Histológicamente, las células implantadas que se marcaron con el indicador de colorante fluorescente PKH26 sobrevivieron y se integraron en el tejido corporal dentro de la región inyectada.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de un medicamento para el tratamiento de la disfunción eréctil, que comprende:
- 5 aislar células progenitoras endoteliales a partir de una muestra;
 diferenciar las células progenitoras *ex vivo* para producir células endoteliales;
 multiplicar las células endoteliales; y
 preparar de 0,1 a 10 millones de las células endoteliales multiplicadas como una composición inyectable adecuada para su implantación en el tejido corporal de un sujeto.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra es una muestra autóloga, preferentemente de sangre periférica o de médula ósea.
- 10 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de aislar células progenitoras comprende además separar las células progenitoras basándose en que exhiban al menos un marcador seleccionado del grupo de CD133, CD31, CD34, sca-1, factor de von Willebrand y c-kit.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la etapa de aislar células progenitoras comprende además separar las células progenitoras con un resto de afinidad para uno o más de los marcadores y, preferentemente, el
- 15 resto de afinidad se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, ligandos proteicos, ácidos nucleicos y péptidos.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
- 20 aislar células progenitoras musculares de la muestra;
 diferenciar las células progenitoras musculares *ex vivo* para producir células musculares;
 multiplicar las células musculares; y
 preparar las células musculares multiplicadas y las células endoteliales multiplicadas como una composición inyectable adecuada para su implantación en tejido corporal del sujeto.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende además aislar células musculares lisas de la muestra y la población inyectable comprende además las células musculares lisas aisladas.
- 25 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de preparar las células endoteliales multiplicadas comprende además encapsular las células endoteliales multiplicadas antes de su formulación como una composición inyectable.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que las células endoteliales multiplicadas están encapsuladas en microesferas de alginato-poli-L-lisina.
- 30 9. Una composición para su uso en el tratamiento de la disfunción eréctil, que comprende:
- de 0,1 a 10 millones de células endoteliales capaces de su implantación, derivadas de células progenitoras endoteliales aisladas diferenciadas *ex vivo* para producir células endoteliales; adicionalmente **caracterizada porque** las células endoteliales se multiplican *ex vivo* y se formulan como una composición inyectable adecuada para su implantación en el tejido corporal de un sujeto.
- 35 10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que las células endoteliales proceden de células progenitoras endoteliales aisladas de sangre periférica o de médula ósea.
11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que las células progenitoras endoteliales aisladas se aíslan de una muestra obtenida previamente del sujeto.
- 40 12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la composición inyectable comprende además células musculares lisas derivadas de células progenitoras musculares aisladas.
13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que las células endoteliales están encapsuladas.
14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que las células endoteliales están encapsuladas en microesferas de alginato-poli-L-lisina.

Figura 1

Función eréctil normal

♣ La erección del pene es la dilatación del pene con sangre.

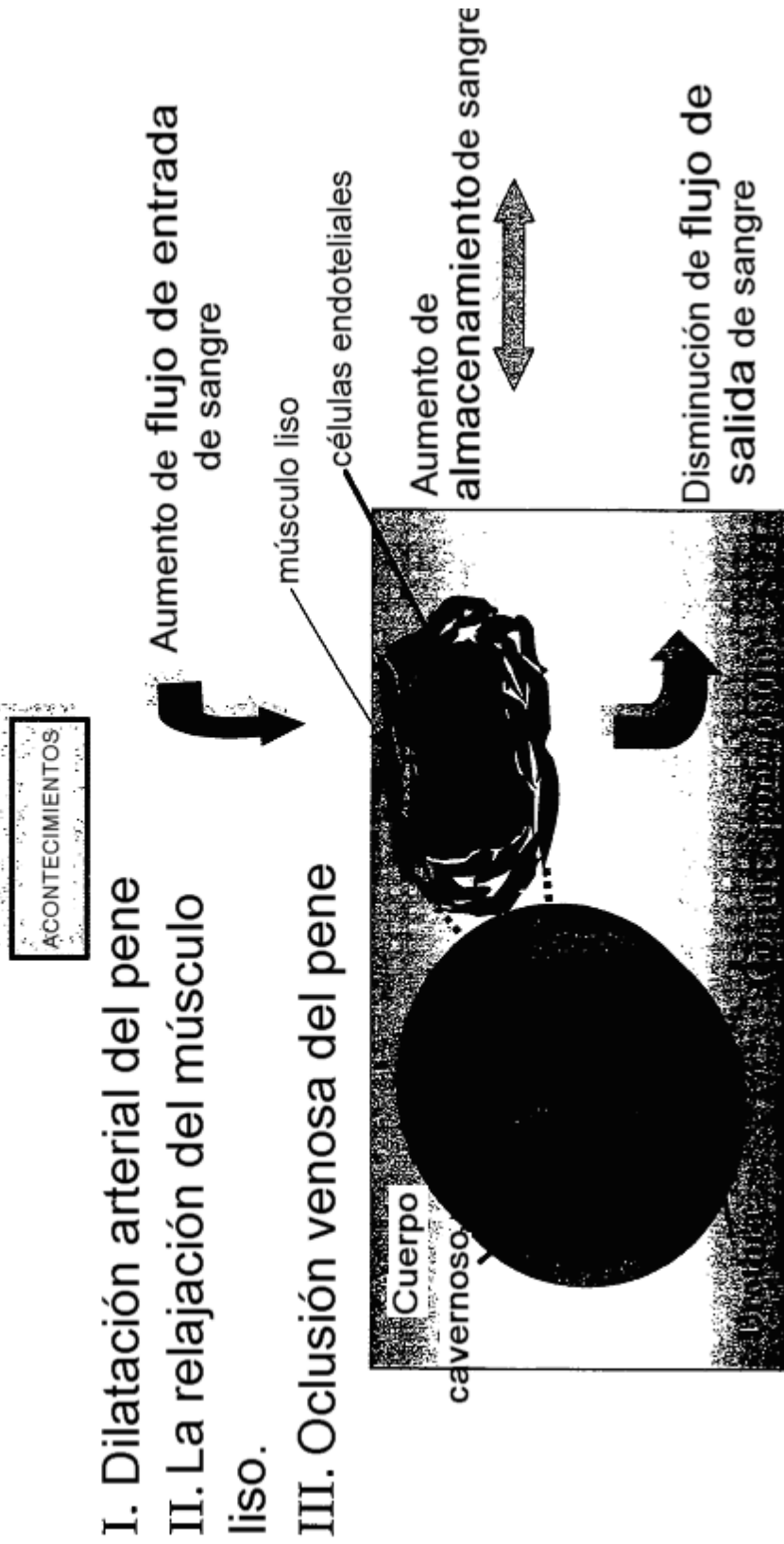


Figura 2

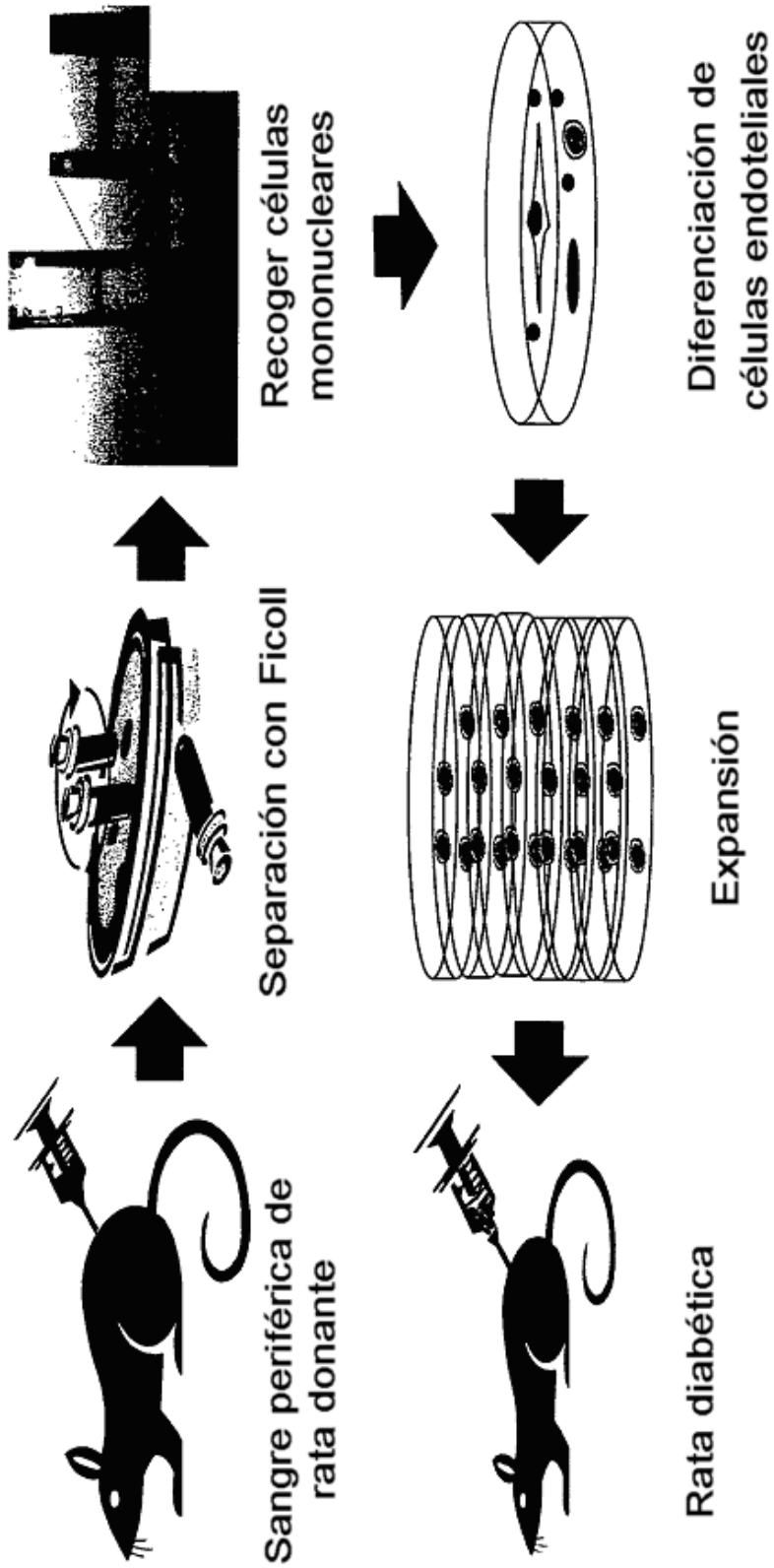


Figura 3

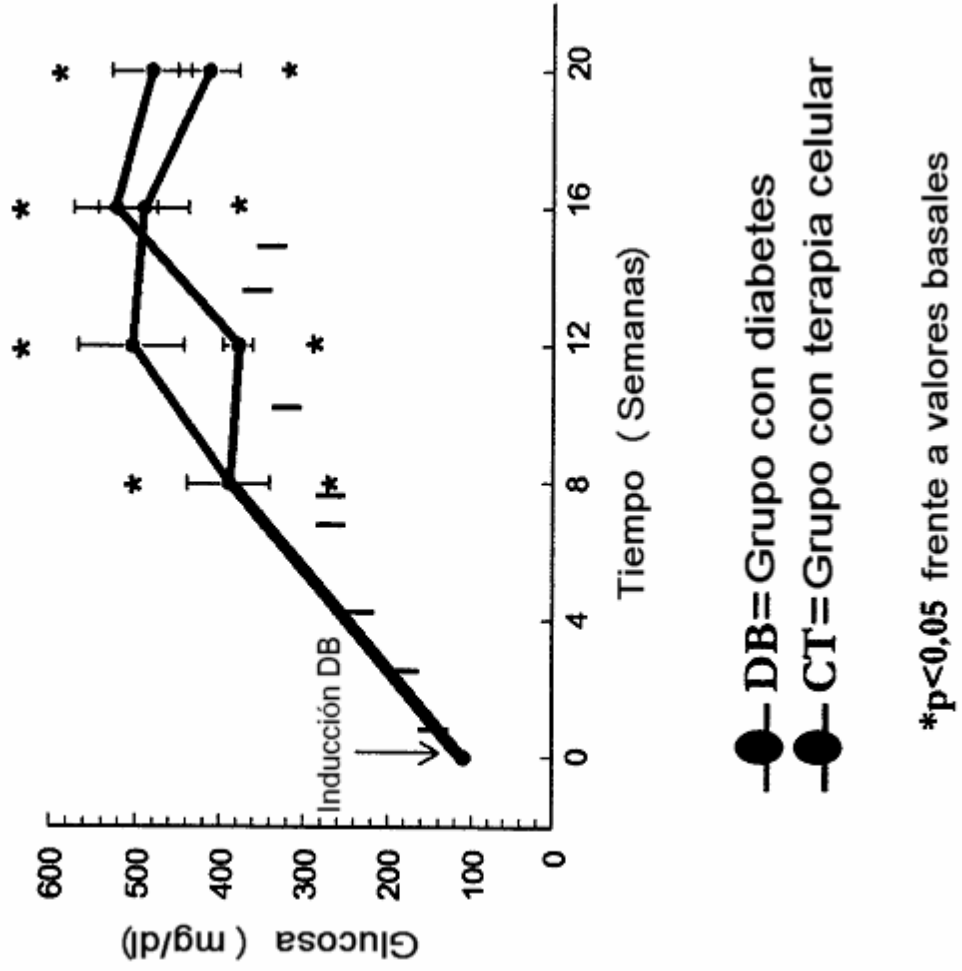


Figura 4

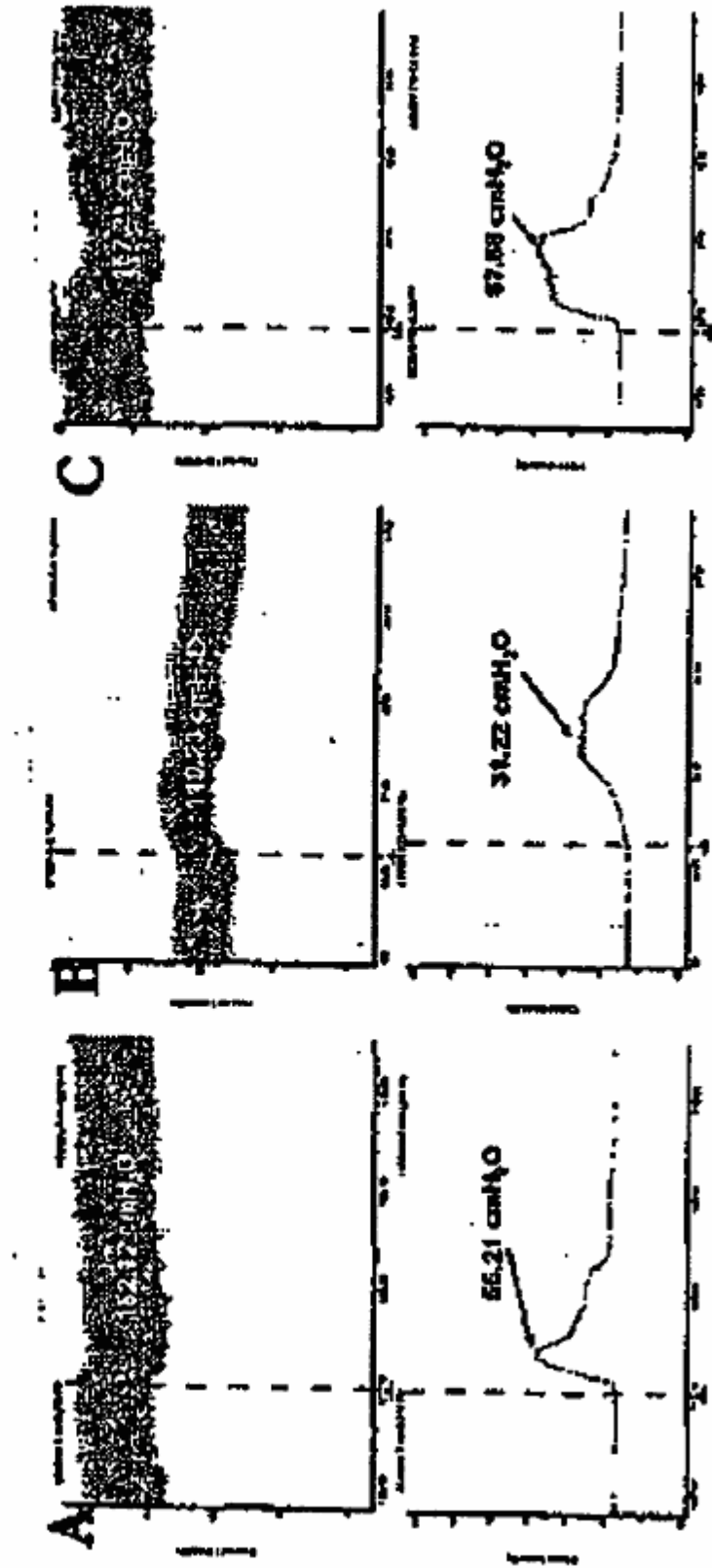


Figura 5

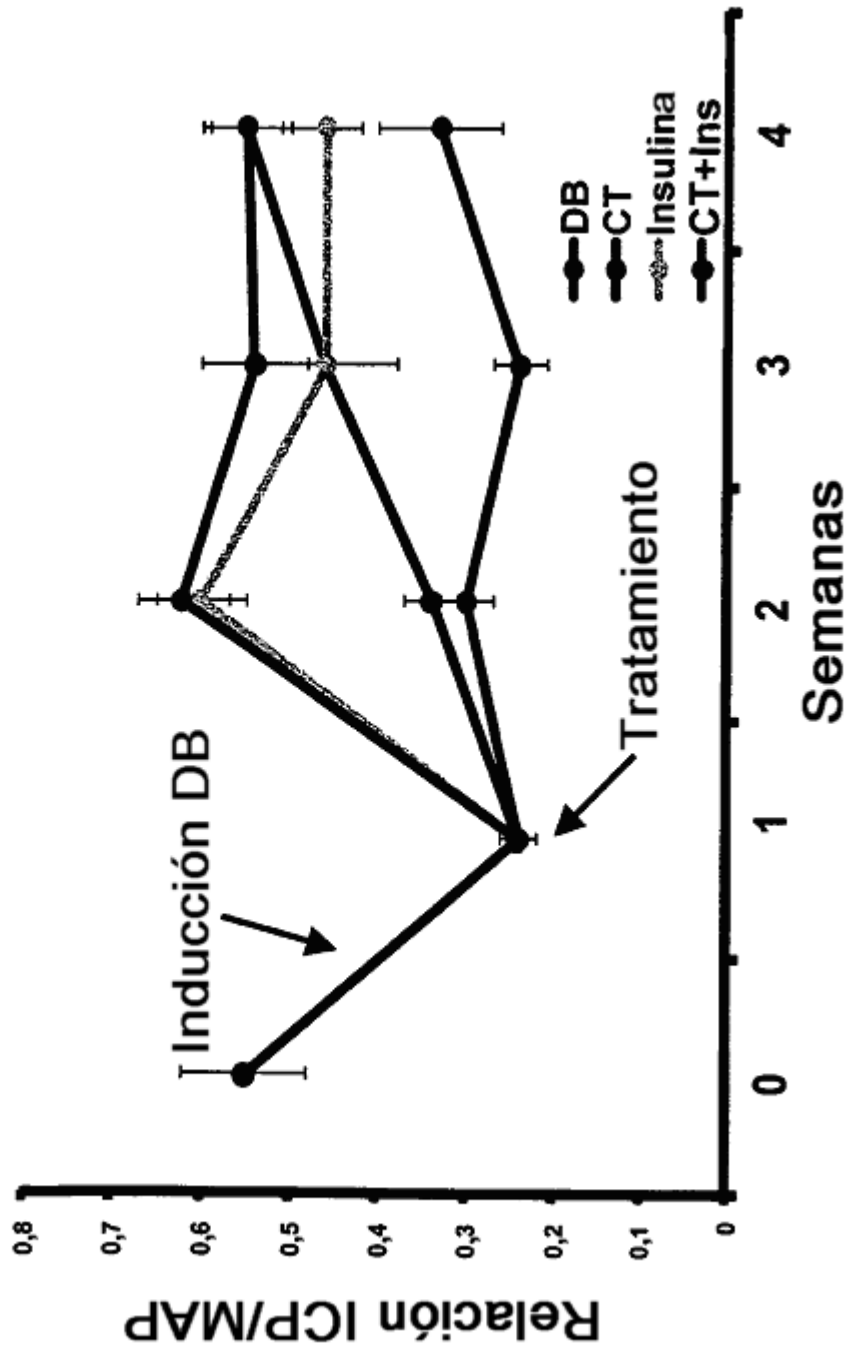


Figura 6

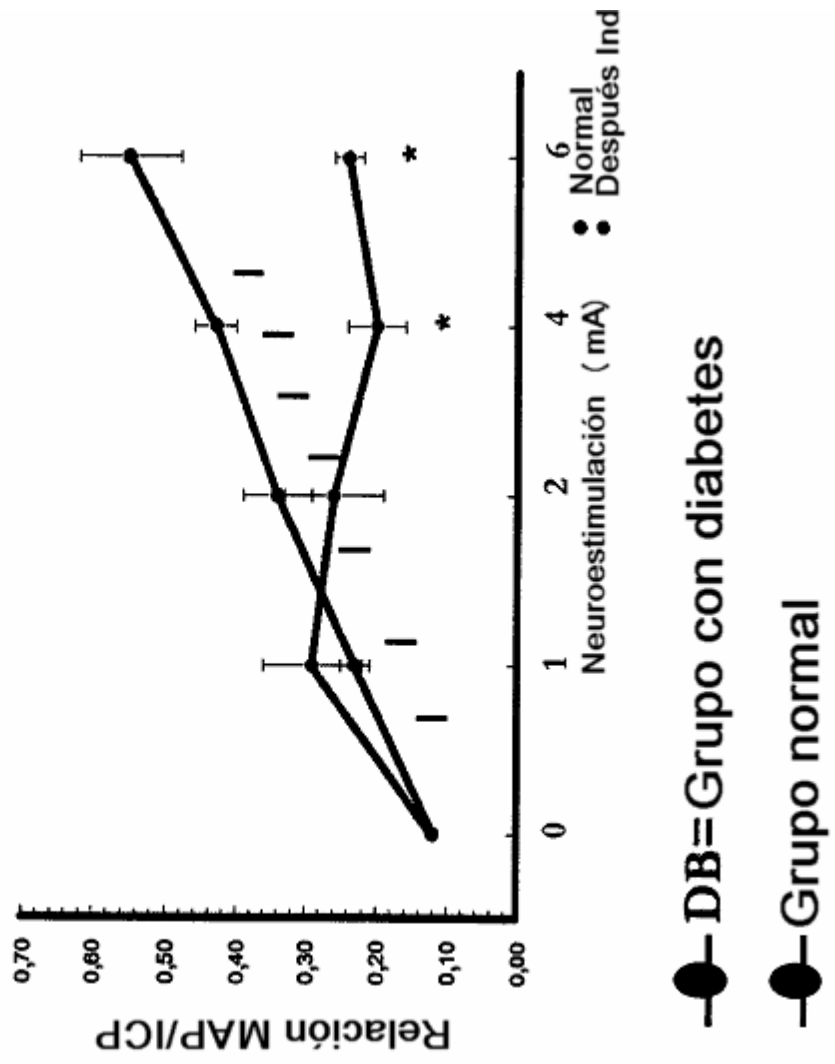
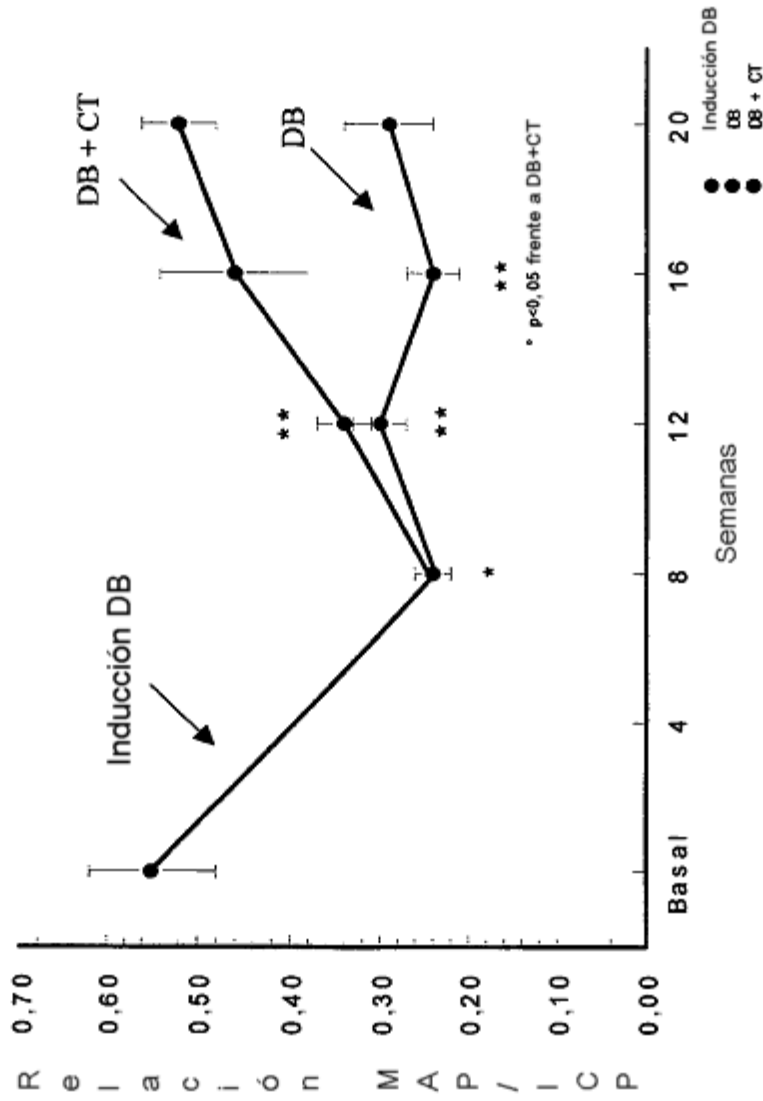


Figura 7



*p<0,01 frente a valores basales

°p<0,01 frente a DB+CT

Figura 8

