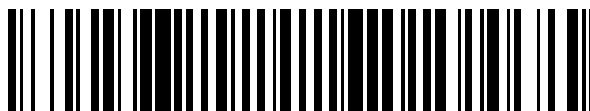


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 419 029**

51 Int. Cl.:

A61K 35/34 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

A61P 13/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.1999 E 08169379 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013 EP 2075002**

54 Título: **Mioblastos para la reparación del músculo del esfínter urinario**

30 Prioridad:

01.05.1998 US 83917 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.08.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF PITTSBURGH (100.0%)
200 GARDNER STEEL CONFERENCE CENTER
THACKERAY & O'HARA STREETS
PITTSBURGH, PA 15260, US**

72 Inventor/es:

**CHANCELLOR, MICHAEL B. y
HUARD, JOHNNY**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 419 029 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

Mioblastos para la reparación del músculo del esfínter urinario.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, a composiciones que comprenden mioblastos para la ingeniería de tejidos. La descripción se refiere además a la introducción de ácidos nucleicos exógenos en células derivadas del músculo, incluyendo mioblastos y células precursoras derivadas del músculo, que da como resultado la expresión de uno o más productos génicos por parte de las células derivadas del músculo genéticamente modificadas. Estas células modificadas entonces son capaces de producir los productos génicos y producir una respuesta fisiológica potenciada después de la administración a un hospedante receptor, que incluye a seres humanos.

10 Antecedentes de la invención

Una serie de defectos, enfermedades y trastornos patológicos en una diversidad de áreas de la medicina se beneficiarían del desarrollo de tratamientos no invasivos que empleasen sistemas y vehículos de transporte de genes mejorados que permitan la producción segura, eficaz y sostenida de productos génicos hacia un sitio en tejidos u órganos afectados. En particular, los métodos y los vehículos de transporte de genes mediados por células mejorados podrían emplearse para mejorar patologías no mortales, aunque debilitantes, del sistema musculoesquelético, tales como la artritis y la enfermedad de las articulaciones (por ejemplo, ligamento, menisco y cartílago); del hueso, tales como defectos segmentales y falta de uniones del hueso; y del sistema genitourinario, tales como incontinencia urinaria y trastornos de la vejiga.

15 Aunque se han utilizado células sinoviales para transportar agentes potencialmente terapéuticos a las articulaciones, la expresión de dichos agentes disminuye a lo largo del tiempo, con lo que estos agentes en general se hacen indetectables después de aproximadamente cuatro a seis semanas (G. Bandara *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90(22):10764-10768; C.H. Evans y P.D. Robbins, 1995, Ann. Med., 27(5):543-546; C.H. Evans y P.D. Robbins, 1994, J. Rheum., 21(5):779-782). Esta disminución de la expresión a lo largo del tiempo puede mejorarse mediante el uso de un transporte de genes mediado por células que empleee un tipo celular miogénico que se convierte en postmitótico después de la diferenciación, según la presente invención.

20 Los defectos segmentales y falta de uniones del hueso son problemas relativamente habituales para todos los cirujanos ortopédicos. Las proteínas osteogénicas, por ejemplo, la proteína morfogénica ósea-2, BMP-2, pueden estimular la curación del hueso en defectos segmentales del hueso. Sin embargo, se necesita una gran cantidad de proteína recombinante humana para potenciar el potencial de curación del hueso. Además, las actuales vías de transporte de dichas cantidades de proteína, es decir, un aloinjerto biológico o un vehículo sintético, tienen el inconveniente de su limitada disponibilidad, de la posible transmisión de enfermedades y de la necesidad de más investigaciones.

25 La terapia génica mediada por células en un defecto óseo podría permitir una expresión sostenida de proteínas osteogénicas, potenciando aún más la curación del hueso, y ofrece una solución a los problemas que rodean a los actuales métodos de transporte de proteínas óseas. Así, según la presente invención, la utilización de células derivadas del músculo, por ejemplo, mioblastos, como vehículos para el transporte de genes celulares para corregir o mejorar un defecto óseo, proporciona un paso importante para establecer un tratamiento menos invasivo para los defectos segmentales y la falta de uniones del hueso.

30 La terapia génica *ex vivo* y el trasplante de mioblastos son dos métodos muy relacionados que requieren el aislamiento y el cultivo de células *in vitro*. Las técnicas *ex vivo* implican la biopsia del músculo y el aislamiento de células miogénicas (T.A. Rando *et al.*, 1994, J. Cell Biol., 125:1275-1287; Z. Qu *et al.*, 1998, J. Cell Biol., 142(5):1257-1267). Las células derivadas del músculo aisladas se transducen *in vitro* con el vector que porta el gen deseado. Las células satélite entonces se reinyectan en el músculo esquelético, se fusionan para formar miotubos y miofibras postmitóticos, y comienzan la producción del factor del crecimiento. Esta técnica puede realizarse con vectores adenovíricos, retrovíricos, y víricos del herpes simplex.

35 A continuación se ofrecen ejemplos de aplicaciones ortopédicas para la terapia génica y la ingeniería de tejidos basadas en el músculo relacionadas con la práctica de la presente invención.

Lesiones del músculo y su reparación

40 Las lesiones del músculo comprenden un gran porcentaje de lesiones atléticas recreativas y de competición. Las lesiones musculares pueden surgir de traumatismos directos (por ejemplo, contusiones, laceraciones) e indirectos (por ejemplo, esguinces, isquemia y lesiones neurológicas). Después de la lesión se liberan y se activan células satélite para que se diferencien en miotubos y miofibras, estimulando con ello la curación del músculo. Sin embargo, este proceso reparador normalmente es incompleto y viene acompañado de una reacción fibrosa que produce tejido cicatricial. Este tejido cicatricial limita el potencial del músculo para su recuperación funcional (T. Hurme *et al.*, 1991, Med. Sci. Sports Exerc., 23:801-810; T. Hurme *et al.*, 1992, Med. Sci. Sports Exerc., 24:197-205).

Las investigaciones en animales han identificado posibles aplicaciones clínicas de la ingeniería de tejidos basada en el músculo para tratar lesiones musculares (W.E. Garrett *et al.*, 1984, *J. Hand Surgery (Am.)*, 9A:683-692; W.E. Garrett *et al.*, 1990, *Med. Sci. Sports Exerc.*, 22:436-443). El músculo esquelético lesionado libera numerosos factores del crecimiento que actúan de modo autocrino y paracrino para modular la curación del músculo. Estas proteínas activan a las células satélite para que proliferen y se diferencien en miofibras (T. Hurme, 1992, *Med. Sci. Sports Exerc.*, 24:197-205; R. Bischoff, 1994, "The satellite cell and muscle regeneration", *Myology*, 2ª edición, Nueva York, McGraw-Hill, Inc., pp. 97-118; H.S. Allamedine *et al.*, 1989, *Muscle Nerve*, 12:544-555; E. Schultz *et al.*, 1985, *Muscle Nerve*, 8:217; E. Schultz, 1989, *Med. Sci. Sports Exerc.*, 21:181).

La ingeniería de tejidos basada en el músculo ofrece fascinantes terapias potenciales para los trastornos musculares. Un gran número de lesiones atléticas recreativas y profesionales implican al músculo esquelético (Garrett *et al.*, 1990, *Med. Sci. Sports Exerc.*, 22:436-443). Las terapias para mejorar la recuperación funcional y que acortan la rehabilitación pueden optimizar la actuación y minimizar la morbilidad. Se están desarrollando investigaciones para perfeccionar estas aplicaciones de ingeniería de tejidos basada en el músculo. Los resultados de estas investigaciones pueden proporcionar tratamientos revolucionarios para estas lesiones musculares habituales. La presente invención proporciona nuevos y fascinantes tratamientos para la reparación muscular tras lesiones del músculo, en particular para la aplicación en entornos clínicos.

Curación del hueso

Para muchas especialidades quirúrgicas, incluyendo la cirugía ortopédica, plástica y maxilofacial, la potenciación de la curación del hueso es una cuestión importante. Los métodos de estas disciplinas se basan en técnicas de potenciación del hueso para mejorar la curación de la falta de unión de fracturas, las reconstrucciones de defectos óseos oncológicos y traumáticos, las fusiones de articulaciones y columna, y las estabilizaciones de implantes artificiales. Por desgracia, las actuales técnicas de autoinjerto, aloinjerto, y estimulación eléctrica a menudo no son óptimas. Por tanto, las estrategias de ingeniería de tejidos para la formación de hueso tienen inmensas aplicaciones.

La formación de hueso intramuscular es un fenómeno aún poco comprendido. Puede estar presente en los estados clínicamente patológicos de la osificación heterotópica, la miositis osificante, la fibrodysplasia osificante progresiva y el osteosarcoma. La terapia de radiación y el fármaco antiinflamatorio indometicina pueden evitar la miositis osificante. Sin embargo, aún no se comprende el mecanismo de formación ni de supresión de hueso ectópico. Se ha reconocido que una familia de proteínas morfogenéticas óseas (BMP), miembros de la superfamilia del factor del crecimiento transformante- β (TGF- β), es capaz de estimular el hueso intramuscular. La BMP-2 humana en forma recombinante (rhBMP-2) y el ADNc que codifica BMP contenido en una construcción plasmídica ha inducido la formación de hueso cuando se inyecta en el músculo esquelético (E.A. Wang *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:2220-2224; J. Fang *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:5753-5758). Las actuales aplicaciones se centran en la inyección de rhBMP-2 directamente en defectos y falta de uniones del hueso. Sin embargo, la ingeniería de tejidos basada en el músculo constituye una gran promesa en el campo de la curación del hueso y puede arrojar luz sobre el mecanismo fisiológico de la formación de hueso ectópico.

Trastornos intraarticulares

Los trastornos articulares degenerativos y traumáticos aparecen con frecuencia a medida que la población se hace más activa y vive durante más tiempo. Estos trastornos incluyen artritis de diversas etiologías, roturas de ligamentos, desgarros del menisco, y lesiones osteocondrales. En la actualidad, las herramientas del médico consisten principalmente en procedimientos quirúrgicos dirigidos a alterar la articulación de forma biomecánica, tales como reconstrucciones del ligamento cruzado anterior (ACL), sustitución total de la rodilla, reparación o excisión del menisco, desbridamiento del cartílago, etc. La ingeniería de tejidos aplicada a estos estados de enfermedad intraarticulares ofrece, en teoría, un proceso reparador más biológico y menos alterador.

Se han indicado estrategias de terapia génica directas (I. Nita *et al.*, 1996, *Arthritis Rheum.*, 39:820-828) y *ex vivo* (G. Bandara *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10764-10768) para modelos de artritis. La estrategia *ex vivo* mediada por células sinoviales, aunque ofrece las ventajas de una transferencia de genes *ex vivo*, tales como la seguridad de la manipulación genética *in vitro* y la selección precisa de células, tiene la desventaja de una disminución de la expresión génica después de 5-6 semanas (Bandara *et al.*, 1993, *Ibid.*). Debido a su capacidad para formar miotubos y miofibras postmitóticos, las células satélites ofrecen la ventaja teórica de una producción de proteínas más abundante y a más largo plazo.

Es posible el transporte de genes *ex vivo* mediado por células musculares hacia numerosas estructuras intraarticulares. La inyección intraarticular de mioblastos primarios, transducidos con adenovirus que portan el gen marcador de β -galactosidasa, da como resultado el transporte de genes hacia muchas estructuras intraarticulares (C.S. Day *et al.*, 1997, *J. Orthop. Res.*, 15:227-234). Los tejidos que expresan β -galactosidasa a los 5 días después de una inyección en la rodilla de conejo incluyen el revestimiento sinovial, la superficie del menisco, y el ligamento cruzado (*ibid.*). Por contraste, la inyección de células sinoviales transducidas sólo produce expresión de β -galactosidasa en el sinovio (*ibid.*). De forma similar, la inyección de mioblastos inmortalizados transducidos da como resultado el transporte de genes hacia diversas estructuras intraarticulares, incluyendo el revestimiento sinovial y la superficie del ligamento patelar. Sin embargo, los mioblastos inmortalizados purificados se fusionan con más

facilidad y producen más miofibras intraarticulares *de novo* que los mioblastos primarios. Esto ilustra la importancia de obtener una población pura de células miogénicas, sin la contaminación por fibroblastos y adipocitos que se observa a menudo en mioblastos primarios.

5 Las estrategias *ex vivo* mediadas por células musculares están basadas en la fusión de mioblastos para formar miofibras, fábricas productoras de proteínas plurinucleares. La inyección intraarticular de mioblastos inmortalizados transducidos en un ratón con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) da como resultado la formación de miotubos y la expresión de transgenes en múltiples estructuras a los 35 días. Por tanto, la expresión génica intraarticular (durante al menos 35 días) que se produce como resultado de la ingeniería de tejidos mediada por células musculares es factible en modelos animales. Basándose en estos datos, una estrategia de transferencia de genes mediada por células musculares puede transportar genes para mejorar la curación de varias estructuras intraarticulares, de modo específico al ACL y al menisco.

15 El ACL es el segundo ligamento de la rodilla que más se lesiona. Por desgracia, el ACL tiene una baja capacidad de curación, probablemente debido a que incluye lámina sinovial o al fluido sinovial circundante. Debido a que el desgarramiento completo del ACL no puede curarse de modo espontáneo, las actuales opciones de tratamiento están limitadas a la reconstrucción quirúrgica empleando un autoinjerto o un aloinjerto. El injerto de sustitución, a menudo originado del ligamento patelar o del tendón de la corva, sufre una ligamentización con una remodelación del colágeno final (S.P. Arnoczky *et al.*, 1982, *Am. J. Sports Med.*, 10:90-95). Por tanto, mediante la práctica de los métodos descritos en la presente, se contempla la potenciación de este proceso de ligamentización empleando factores del crecimiento para afectar al comportamiento de los fibroblastos. Los datos *in vivo* sugieren que el factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor del crecimiento transformante- β (TGF- β) y el factor del crecimiento epidérmico (EGF) estimulan la curación del ligamento (N.A. Conti *et al.*, 1993, *Trans. Orthop. Res. Soc.*, 18:60). No es probable que unos bajos niveles transitorios de estos factores del crecimiento, que aparecen tras su inyección directa en el ligamento lesionado, produzcan una respuesta significativa. Por tanto, un mecanismo de transporte eficaz es fundamental para el desarrollo de una terapia aplicable desde el punto de vista clínico. La terapia génica *ex vivo* mediada por células musculares según las indicaciones de la presente ofrece el potencial de lograr una expresión de genes local persistente y el posterior transporte de factores del crecimiento al ACL.

20 Centrándose más en la rodilla, el menisco de la rodilla desempeña un papel crítico para mantener la biomecánica de la rodilla normal. Las principales funciones del menisco incluyen la transmisión de carga, la absorción de choques, la lubricación de la articulación, y la estabilización tibiofemorales en la rodilla con ACL deficiente. El tratamiento histórico de la menisectomía para desgarros del menisco ha sido sustituido por la reparación del menisco cuando el desgarramiento implica el tercio vascular periférico del menisco. Los factores del crecimiento, que incluyen al factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), son capaces de potenciar la curación del menisco (K.P. Spindler *et al.*, 1995, *J. Orthop. Res.*, 13(2):201-207). Sin embargo, el médico y el paciente necesitan mejores métodos y procedimientos para administrar estos factores necesarios al menisco para proporcionar una curación y una reparación.

35 *Aplicaciones urológicas*

La incontinencia urinaria es un terrible trastorno médico y social. La incidencia de la incontinencia urinaria cada vez es mayor en EEUU debido a que la población va envejeciendo. En enero de 1997, the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease lanzó una campaña de salud pública para hacer notar el hecho de que existen más de once millones de mujeres y cuatro millones de hombres en EEUU que tienen problemas de incontinencia urinaria. Casi la mitad de los quince millones de personas con incontinencia tienen incontinencia urinaria de esfuerzo; sin embargo, menos de la mitad de las personas afectadas buscan ayuda y reciben los tratamientos disponibles (Agency for Health Care Policy and Research, AHCPR, 1992 y 1996).

45 En la actualidad, se calcula que el coste anual del tratamiento de personas con incontinencia urinaria es de más de 16 mil millones de dólares en EEUU. La mayor parte de este dinero se gasta en medidas de gestión, tales como pañales y compresas para adultos, pero no en tratamientos. Puesto que una parte importante del tratamiento invasivo y quirúrgico de la incontinencia urinaria implica el tratamiento de la incontinencia urinaria de esfuerzo, se calcula que el coste para gestionar la incontinencia urinaria de esfuerzo es de nueve mil millones de dólares anuales en EEUU (AHCPR, 1996).

50 Para evaluar un individuo con incontinencia se identifican tres de los tipos y causas más comunes de incontinencia: a) incontinencia de urgencia, b) incontinencia de esfuerzo, o c) incontinencia por rebosamiento (M.B. Chancellor y J.G. Blaivas, 1996, *Atlas of Urodynamics*, Williams and Wilkins, Filadelfia, PA).

55 La incontinencia de esfuerzo es la pérdida involuntaria de orina durante la tos, el estornudo, la risa u otras actividades físicas que aumentan la presión abdominal. Este trastorno puede confirmarse observando la pérdida de orina coincidente con un aumento en la presión abdominal, en ausencia de contracción de la vejiga o de una vejiga sobredistendida. El trastorno de incontinencia de esfuerzo puede clasificarse como hiper movilidad uretral o como deficiencia del esfínter intrínseca. En la hiper movilidad uretral, el cuello de la vejiga y la uretra descienden durante la tos o el esfuerzo sobre la urodinámica, y la uretra se abre con una pérdida urinaria visible (presión del punto de pérdida entre 60-120 cm H₂O). En la deficiencia del esfínter intrínseca, el cuello de la vejiga se abre durante el llenado de la vejiga sin contracción de la vejiga. La pérdida urinaria visible se observa sin que se haya realizado

ningún esfuerzo o con un esfuerzo mínimo. Se produce un descenso variable del cuello de la vejiga y de la uretra, aunque a menudo no se produce en absoluto, y la presión del punto de pérdida es baja (<60 cm H₂O) (J.G. Blaivas, 1985, Urol. Clin. N. Amer., 12:215-224; D.R. Staskin *et al.*, 1985, Urol. Clin. N. Amer., 12:271-278).

5 La incontinencia de urgencia se define como la pérdida involuntaria de orina asociada con un deseo repentino y fuerte para evacuar. Aunque las contracciones involuntarias de la vejiga pueden asociarse con trastornos neurológicos también pueden producirse en individuos que parecen ser neurológicamente normales (P. Abrams *et al.*, 1987, Neurol. & Urodynam., 7:403-427). Los trastornos neurológicos habituales que están asociados con la incontinencia de urgencia son el ictus, la diabetes, y la esclerosis múltiple (E.J. McGuire *et al.*, 1981, J. Urol., 126:205-209). La incontinencia de urgencia está provocada por contracciones del detrusor involuntarias que también
10 pueden ser debidas a la inflamación de la vejiga y una contractilidad alterada del detrusor cuando la vejiga no se vacía por completo.

La incontinencia por rebosamiento se caracteriza por la pérdida de orina asociada con la sobredilatación de la vejiga. La incontinencia por rebosamiento puede ser debida a una contractilidad alterada de la vejiga o a la obstrucción de la salida de la vejiga que conduce a la sobredilatación y al rebosamiento. La vejiga puede ser poco activa como
15 resultado de trastornos neurológicos, tales como diabetes o lesiones en la médula espinal, o después de una cirugía pélvica radical.

Otras causa común y grave de la incontinencia urinaria (del tipo de urgencia y por rebosamiento) es la contractilidad alterada de la vejiga. Este es un trastorno cada vez más común en la población geriátrica y en pacientes con enfermedades neurológicas, en especial diabetes mellitus (N.M. Resnick *et al.*, 1989, New Engl. J. Med., 320:1-7; M.B. Chancellor y J.G. Blaivas, 1996, Atlas of Urodynamics, Williams and Wilkins, Filadelfia, PA). Con una contractilidad alterada, la vejiga no puede vaciar su contenido en orina; esto provoca no solo incontinencia, sino también infección en el tracto urinario e insuficiencia renal. En la actualidad, los médicos no tienen mucha capacidad para tratar la contractilidad alterada del detrusor. No existen medicaciones eficaces para mejorar la contractilidad del detrusor. Aunque la urecolina puede aumentar ligeramente la presión intravesical, no se ha demostrado en estudios controlados que ayude a un vaciado eficaz de la vejiga (A. Wein *et al.*, 1980, J. Urol., 123:302). El tratamiento más
20 habitual es evitar este problema con una cateterización intermitente o interna.

Existe una serie de modalidades de tratamiento para la incontinencia urinaria de esfuerzo. Los tratamientos actuales que se aplican con más frecuencia para la incontinencia de esfuerzo incluyen los siguientes: productos absorbentes; cateterización interna; pesarios, es decir, un anillo vaginal colocado para sostener el cuello de la vejiga; y medicación (Agency for Health Care Policy and Research, Public Health Service: Urinary Incontinence Guideline Panel, Urinary Incontinence in Adults: Clinical Practice Guideline, AHCPR publicación nº 92-0038. Rockville, MD, U.S. Department of Health and Human Services, marzo de 1992; M.B. Chancellor, Evaluation and Outcome, en: The Health of Women With Physical Disabilities: Setting a Research Agenda for the 90's, eds. Krotoski D.M., Nosek, M., Turk, M., Brooks Publishing Company, Baltimore, MD, capítulo 24, 309-332, 1996). Con respecto concretamente a la medicación, existen varios fármacos aprobados para el tratamiento de la incontinencia de urgencia. Sin embargo, no existen fármacos aprobados o eficaces para la incontinencia urinaria de esfuerzo.
30

El ejercicio es otra modalidad de tratamiento para la incontinencia urinaria de esfuerzo. Por ejemplo, el ejercicio de Kegel es un método habitual y popular para tratar la incontinencia de esfuerzo. El ejercicio puede ayudar a la mitad de las personas que lo realizan cuatro veces diarias durante 3-6 meses. Aunque 50% de los pacientes indican alguna mejoría con el ejercicio de Kegel, la tasa de curación de la incontinencia después de los ejercicios de Kegel sólo es del 5%. Además, la mayoría de los pacientes dejan de hacer el ejercicio y abandonan el protocolo porque es muy largo y se requiere una disciplina diaria.
40

Otro método de tratamiento para la incontinencia urinaria es el tapón uretral. Es un nuevo tapón con forma de tapón de corcho desechable y barato para las mujeres con incontinencia de esfuerzo. Debe utilizarse un nuevo tapón después de cada micción, con un coste diario calculado de aproximadamente 15-20 dólares. El coste de eliminación anual calculado es de más de 5.000 dólares. El tapón está asociado con más de 20% de infecciones del tracto urinario y, por desgracia, no cura la incontinencia.
45

También se emplea la estimulación eléctrica funcional y de biorretroalimentación utilizando una sonda vaginal para tratar la incontinencia urinaria de urgencia y de esfuerzo. Sin embargo, estos métodos son largos y caros, y los resultados son sólo moderadamente mejores que el ejercicio de Kegel. Para tratar la incontinencia urinaria de esfuerzo también se emplea la cirugía, tal como suspensiones del cuello de la vejiga laparoscópicas o a abdomen abierto; suspensiones del cuello de la vejiga abdominales a través de la vagina; esfínter urinario artificial (un procedimiento quirúrgico complejo y caro con una tasa de reversión del 40%).
50

Otros tratamientos incluyen procedimientos de inyección de la uretra con materiales inyectables exógenos, tales como teflón, colágeno, y grasa autóloga. Cada uno de estos inyectables tiene sus desventajas. De modo más específico, existen significativas dudas en la comunidad médica acerca del uso del teflón. Las complicaciones de la inyección de teflón incluyen granuloma, divertículos, quistes, y formación de pólipos uretrales. Es más problemática la migración (a través de los sistemas linfático y vascular) de partículas de teflón hacia emplazamientos lejanos, que producen fiebre y neumonitis.
55

Las inyecciones de colágeno en general emplean colágeno bovino, que es caro y a menudo se reabsorbe, con lo que son necesarias varias inyecciones. Otra desventaja del colágeno es que aproximadamente 5% de los pacientes son alérgicos al colágeno de una fuente bovina y desarrollan anticuerpos.

5 El injerto de grasa autóloga como agente de carga inyectable tiene una importante desventaja, y es que la mayor parte de la grasa inyectada se reabsorbe. Además, el grado y la duración de la supervivencia de un injerto de grasa autóloga siguen siendo controvertidos. En general se produce una reacción inflamatoria en el sitio del implante. Las complicaciones del injerto de grasa incluyen la reabsorción de la grasa, nódulos, y asimetría de los tejidos.

10 En *J. Reproductive Medicine for the Obstetrician and Gynecologist*, 40, 1995, 503-506 (base de datos Embase, nº de sumario EMB-1995233867), se indica un tratamiento quirúrgico para mujeres con incontinencia urinaria de esfuerzo mediante el procedimiento de Ball-Burch.

En el documento US 5667778 se describe un tratamiento del reflujo vesicouretral empleando células del músculo de la vejiga mezcladas con alginato.

15 A la vista de las anteriores limitaciones y complicaciones para tratar la incontinencia urinaria y la contractilidad de la vejiga, en la técnica son necesarias modalidades nuevas y eficaces en esta área. Se proporciona una terapia de inyección de células musculares empleando células derivadas del músculo modificadas de modo exclusivo como un medio nuevo y mejor para tratar y curar diversos tipos de incontinencia, en particular la incontinencia urinaria de esfuerzo, y para la potenciación de la continencia urinaria. Como ventaja, la inyección con células derivadas del músculo pueden ser preferiblemente autólogas, para que no haya o haya muy pocas reacciones alérgicas, a diferencia del uso del colágeno mencionado anteriormente. Además, a diferencia del colágeno, las células miogénicas, tales como blastos, no son absorbidas; por tanto, pueden proporcionar una mejor tasa de curación y mejora.

20 Los mioblastos, los precursores de las fibras musculares, son células musculares mononucleadas que se diferencian de muchas maneras de otros tipos de células. Los mioblastos se fusionan de forma natural para formar miotubos multinucleados postmitóticos que dan como resultado la expresión a largo plazo y el transporte de proteínas bioactivas (T.A. Partridge y K.E. Davies, 1995, *Brit. Med. Bulletin*, 51:123-137; J. Dhawan *et al.*, 1992, *Science*, 254:1509-1512; A.D. Grinnell, 1994, en: *Myology*, 2ª edición, eds. Engel A.G. y Armstrong C.F., McGraw-Hill, Inc., 303-304; S. Jiao y J.A. Wolff, 1992, *Brain Research*, 575:143-147; H. Vandeburgh, 1996, *Human Gene Therapy*, 7:2195-2200). Los mioblastos se han utilizado para el transporte de genes al músculo para enfermedades relacionadas con el músculo, tales como la distrofia muscular de Duchenne (E. Gussoni *et al.*, 1992, *Nature*, 356:435-438; J. Huard *et al.*, 1992, *Muscle & Nerve*, 15:550-560; G. Karpati *et al.*, 1993, *Ann. Neurol.*, 34:8-17; J.P. Tremblay *et al.*, 1993, *Cell Transplantation*, 2:99-112), así como para enfermedades no relacionadas con el músculo, por ejemplo, el transporte de genes de la adenosina desaminasa humana para el síndrome de deficiencia en adenosina desaminasa (C.M. Lynch *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:1138-1142); la transferencia de genes de la proinsulina humana para la diabetes mellitus (G.D. Simonson *et al.*, 1996, *Human Gene Therapy*, 7:71-78); la transferencia de genes para la expresión de la tirosina hidroxilasa para la enfermedad de Parkinson (S. Jiao *et al.*, 1993, *Nature*, 362:450); la transferencia y la expresión del factor IX para la hemofilia B (Y. Dai *et al.*, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10892); el transporte de la hormona del crecimiento humana para el retraso en el crecimiento (J. Dhawan *et al.*, 1992, *Science*, 254:1509-1512).

40 El uso de mioblastos para tratar la degeneración muscular, para reparar tejido dañado o para tratar una enfermedad se describe en las patentes de EEUU nº 5.130.141 y 5.538.722. Además, el trasplante de mioblastos se ha empleado para la reparación de la disfunción miocárdica (S.W. Robinson *et al.*, 1995, *Cell Transplantation*, 5:77-91; C.E. Murry *et al.*, 1996, *J. Clin. Invest.*, 98:2512-2523; S. Gojo *et al.*, 1996, *Cell Transplantation*, 5:581-584; A. Zibaitis *et al.*, 1994, *Transplantation Proceedings*, 26:3294).

45 El óxido nítrico (NO) se ha reconocido como un transmisor importante en la función del tracto genitourinario. El NO media en la relajación del músculo liso y también es la clave para conseguir la erección. En fechas recientes, se ha demostrado la presencia de óxido nítrico sintasa constitutiva e inducible (NOS o iNOS) en el urotelio, la pared de la vejiga y de la uretra. Los pacientes que tienen inflamación de vejiga y cistitis intersticial tienen deficiencia en el NO urinario (M.A. Wheeler *et al.*, 1997, *J. Urol.*, 158(6):2045-2050; S.D. Smith *et al.*, 1997, *J. Urol.*, 158(3, punto 1):703-708). Además, los pacientes con cistitis intersticial mejoran sus síntomas urinarios y aumentan la producción de NO urinario cuando se tratan con L-arginina oral (M.A. Wheeler *et al.*, 1997, *J. Urol.*, 158(6):2045-2050). Pruebas recientes han demostrado que la relajación del músculo liso uretral está mediada por la liberación de NO, y que el NO también media en la relajación del músculo liso de la próstata (H. Kakizaki *et al.*, 1997, *Am. J. Phys.*, 272:R1647-1656; A.L. Bumett, 1995, *Urology*, 45:1071-1083; M. Takeda *et al.*, 1995, *Urology*, 45:440-446; W. Bloch *et al.*, 1997, *Prostate*, 33:1-8).

55 Sumario de la invención

La presente invención es la siguiente:

1. Mioblastos autólogos para su uso en la reparación del músculo del esfínter urinario *in vivo*;

2. Mioblastos autólogos según 1., en los que dichos mioblastos se introducen en una cantidad eficaz para mejorar la incontinencia urinaria de esfuerzo;

3. Mioblastos autólogos según cualquiera de 1. o 2., en los que los mioblastos comprenden un medio fisiológicamente aceptable;

5 4. Mioblastos autólogos según cualquiera de 1. a 3., en los que los mioblastos se introducen en una cantidad de aproximadamente 10^5 a 10^6 células por cm^3 de tejido para ser tratado en un medio fisiológicamente aceptable;

10 5. Mioblastos autólogos según cualquiera de 1. a 4., en los que los mioblastos se ponen en contacto con una citoquina o un factor del crecimiento seleccionado de uno o más de factor del crecimiento de fibroblastos (b-FGF), factor del crecimiento de tipo insulínico (IGF), o factor del crecimiento nervioso (NGF), antes de introducir dichos mioblastos en el receptor.

Descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos de las figuras se presentan para describir más a fondo la invención y la descripción acompañante, y para ayudar a su entendimiento aclarando sus diversos aspectos.

15 Las **figuras 1A-1I** presentan análisis de microscopía óptica y de fluorescencia de tejido del cuello uretral y de la uretra que demuestran la persistencia de mioblastos inyectados que portan el gen de la β -galactosidasa y que producen β -galactosidasa, es decir, lacZ (manchas azules) y microesferas de látex fluorescentes (verde fluorescente). Se muestra un aumento creciente (de 40x a 100x) del mismo espécimen; las figuras 1A, 1D y 1G tienen el aumento menor, y las figuras 1C, 1F y 1I tienen el aumento mayor. Las **figuras 1A-1C** representan una inyección de mioblastos en el cuello de la vejiga. Las **figuras 1D-1F** representan una inyección de mioblastos uretral. Las **figuras**
 20 **1G-1I** representa una inyección de mioblastos uretral empleando una técnica de tinción doble, en la que puede visualizarse el marcaje con lacZ (azul) y con microesferas de látex fluorescentes (verde fluorescente). Se observan muchas miofibras regenerativas que expresan la β -galactosidasa en la pared del cuello de la vejiga y uretral. Aparecen grandes patrones desorganizados de miofibras mezcladas con microesferas de látex fluorescentes. Se empleó la tinción del tejido con hematoxilina-eosina (H y E).

25 La **figura 2** muestra un aumento grande (es decir, 100x) de una inyección de mioblastos en la pared uretral tal como se muestra en la figura 1I. Se observan mioblastos transducidos, miotubos y miofibras que expresan la β -galactosidasa (color azul, flechas) en la pared uretral cerca del epitelio uretral (cabezas de flecha). Se empleó la tinción del tejido con H y E.

30 Las **figuras 3A-3F** muestran los resultados de transducir mioblastos frente a células sinoviales *in vitro* (ejemplo 9). Las células sinoviales (**figura 3A, 3B**) y los mioblastos (**figuras 3C, 3D**) proceden de líneas celulares cultivadas. Ambas líneas celulares se infectaron con un vector adenovirico que porta el gen indicador LacZ utilizando una multiplicidad de infección similar (MOI = 25). La expresión de β -galactosidasa por ambos tipos celulares se observó empleando una histoquímica de LacZ a los 2 días (**figuras 3A, 3C**) y a los 6 días (**figuras 3B, 3D**) después de la infección. Se demostró que los mioblastos transducidos conservaban su capacidad para diferenciarse en miotubos
 35 que expresan β -galactosidasa (**figura 3D**). La inmunofluorescencia de desmina de los cultivos de mioblastos indica la presencia de múltiples miotubos largos plurinucleados cuando los mioblastos son capaces de diferenciarse utilizando un medio de fusión (**figura 3E**). Se cuantificó la cantidad de producción de β -galactosidasa por los cuatro cultivos celulares diferentes a los dos días después de infección utilizando el ensayo de lacZ. Los mioblastos inmortalizados produjeron casi 5 veces más β -galactosidasa que los mioblastos primarios, las células sinoviales primarias y las células sinoviales inmortalizadas. Aumentos A-E: 10x.

La **figura 4** muestra la producción de proteína agonista del receptor de interleuquina-1 (IRAP) ($\text{ng/ml}/10^6$ células según se mide mediante ELISA) después de que se utilicen células sinoviales (sin) o mioblastos (mio) transducidos con un vector adenovirico que porta el gen que codifica IRAP (ad-IRAP) para infectar una articulación de conejo.

45 Las **figuras 5A-5D** muestran los resultados de la transferencia de genes *ex vivo* mediada por mioblastos hacia el menisco de conejo. Los mioblastos transducidos con un vector adenovirico que porta el gen que codifica la β -galactosidasa (LacZ) se inyectaron en menisco de conejo. Las **figuras 5A y 5B** muestran la expresión de LacZ en el menisco después de la inyección y la expresión de β -galactosidasa. La **figura 5C** demuestra que la tinción de LacZ está colocalizada con las microesferas de látex fluorescentes en el área inyectada. La **figura 5D** muestra la
 50 expresión de desmina, un marcador miogénico (fluorescencia verde) que demuestra la presencia de células musculares en el menisco.

55 Las **figuras 6A-6D** muestran los resultados de la transferencia de genes *ex vivo* mediada por mioblastos hacia el ligamento de conejo. Los mioblastos transducidos con un vector adenovirico que porta el gen que codifica la β -galactosidasa (LacZ) se inyectaron en ligamento de conejo. Las **figuras 6A y 6B** muestran la expresión de LacZ en el ligamento después de la inyección y la expresión de β -galactosidasa. La **figura 6C** demuestra que la tinción de LacZ está colocalizada con las microesferas de látex fluorescentes en el área inyectada. La **figura 6D** muestra la

expresión de desmina, un marcador miogénico (fluorescencia verde) que demuestra la presencia de células musculares en el menisco.

Las **figuras 7A-7H** muestran la caracterización de la supervivencia de diferentes poblaciones de células derivadas del músculo después del trasplante en músculo esquelético. La inyección de las células derivadas del músculo obtenidas después del precultivo nº 1 se perdió rápidamente a las 48 horas después de la inyección (**figura 7A**): en el músculo inyectado sólo se midió 7% de la expresión del transgén LacZ presente en la preinyección de mioblastos. Las células aisladas del precultivo nº 2 (**figura 7E**) produjeron 55% de pérdida de mioblastos; el precultivo nº 3 (**figura 7B**) una pérdida del 12%; y el precultivo nº 6 (**figura 7F**) una ganancia del 124% en el nivel de expresión del transgén presente en las células antes del trasplante. Se observó una pérdida del 96% de la población pura de mioblastos aislados de miofibras a las 48 horas después del trasplante (Fibras de mioblastos, FMb, **figura 7C**). De modo similar, la línea celular de mioblastos mdx inmortalizados muestra una pérdida de células después del trasplante: se observó 93% del nivel de expresión del transgén presente en el cultivo celular después de la implantación a los dos días después de la inyección (Línea celular Mdx, **figura 7G**). El PP (precultivo) nº 3 y PP nº 6 (**figuras 7D y 7H**) muestran una mejor supervivencia de las células a los dos días después de la inyección, pero se observó una disminución en la cantidad del gen indicador LacZ en el músculo inyectado a los 5 días después de la inyección. Sin embargo, las células que muestran una mejor supervivencia (PP nº 3 y PP nº 6) siguen presentando un mayor nivel de transferencia génica a los 5 días después de la inyección. “**” indica una diferencia significativa ($P < 0,05$) cuando se compara con mioblastos no inyectados transducidos (0 horas).

Las **figuras 8A-8D** muestran la capacidad de los mioblastos modificados que expresan la sustancia antiinflamatoria IRAP para evitar la poca supervivencia de las células inyectadas. La supervivencia de los mioblastos modificados para expresar la proteína antagonista del receptor de interleuquina-1 (IL-1Ra) (**figura 8B**) se comparó con las células control no modificadas (**figura 8A**). Las células no modificadas se perdieron rápidamente a las 48 horas después de la inyección (mioblastos control). Por contraste, las células modificadas para que expresasen IL-1Ra redujeron significativamente la pérdida temprana de las células inyectadas (mioblastos que expresan IL-1Ra): sólo 20% de las células inyectadas se perdieron a las 48 horas después de la inyección. Sin embargo, se observó una reducción significativa en la cantidad de expresión de β -galactosidasa a las 24 horas después de la inyección, comparado con los mioblastos no inyectados. Un alto número de miofibras transducidas persistió entre el día 2 y el día 5 después de la inyección (**figuras 8C, 8D**). La ausencia de una diferencia significativa para ambas poblaciones de células a las 0 y 0,5 horas después de la inyección sugiere que la pérdida de mioblastos fue mínima durante la inyección. “**” indica una diferencia significativa ($P < 0,05$) cuando se compara con mioblastos no inyectados transducidos (0 horas).

La **figura 9** presenta los niveles de actividad fosfatasa alcalina (ALP), U/l, después de que diversas poblaciones de células derivadas del músculo (pp1-pp6) fueran estimuladas con la proteína osteogénica BMP-2, $t = 30$ minutos. Los tipos celulares son células estromáticas (control) y células precultivadas (pp) nº 1, 2, 3, 5 y 6 según se describe. El PP nº 6 se corresponde con BMP-2 que produce fosfatasa alcalina de una manera dependiente de la dosis y a un nivel similar al observado con células estromáticas (SC).

La **figura 10** presenta el porcentaje de células positivas a desmina después de un número diferente de dosis (100 ng/ml) de BMP-2. Se observó que la estimulación del BMP-2 no sólo aumenta el nivel de expresión de la fosfatasa alcalina por las células derivadas del músculo, sino que también disminuye el número de células positivas a desmina en la población de células derivadas del músculo.

La **figura 11** demuestra que células derivadas del músculos inyectadas (PP nº 6) estimuladas con BMP-2 e insertadas en un dispositivo de inmunoaislamiento Theracyte (descrito en el ejemplo 1) que se implantó de modo subcutáneo, son capaces de participar en la formación de hueso según se observa mediante tinción de von Kossa (mineralización) y de hematoxilina/eosina. Estos resultados sugieren que las células derivadas del músculo son capaces de formar hueso.

La **figura 12** muestra una representación esquemática de la construcción de un plásmido lanzadera para construir un virus adenoasociado para transportar la expresión de IGF-1 (lesiones musculares), VEGF (curación del hueso y del cartílago) y BMP-2 (curación del hueso y del cartílago). Este plásmido lanzadera, denominado pXX-UF1, se emplea para construir un virus adenoasociado.

La **figura 13** muestra los resultados del uso de una biopsia de músculo para la curación del cartílago. En los cuadros mostrados en la figura 13, se observa que la biopsia de músculo encierra un defecto en el cartílago a las 3 semanas después de la inyección, y que la formación de músculo y cartílago es evidente. Por tanto, la biopsia de músculo puede utilizarse como andamiaje biológico para transportar factores del crecimiento, así como fuente de células derivadas del músculo pluripotenciales para mejorar la curación de un defecto en el cartílago. En esta figura, “M” representa músculo, mientras que “C” representa cartílago.

Las **figuras 14A-14C** muestran los resultados de la transferencia de genes *ex vivo* mediada por mioblastos hacia cartílago de conejo. Los mioblastos transducidos con un vector adenovírico que porta el gen que codifica la β -galactosidasa (LacZ) se inyectaron en cartílago de conejo. Las **figuras 14A y 14B** muestran la expresión de desmina, un marcador miogénico (fluorescencia verde), que revela la presencia de células musculares en el

cartílago. La **figura 14C** muestra la expresión de β -galactosidasa en el cartílago inyectado con mioblastos transducidos con adenovirus que transportan la expresión de β -galactosidasa.

Las **figuras 15A-15C** muestran los resultados de la inyección de células derivadas del músculo primarias hacia el tracto urinario inferior (ejemplo 4). Los mioblastos transducidos con un vector adenovírico que porta el gen que codifica la β -galactosidasa (LacZ) se inyectaron en vejiga y uretra de ratón. La **figura 15A** muestra la persistencia de seis meses después de la inyección sin daños en la pared de la vejiga. La **figura 15B** muestra los ensayos que indican que la β -galactosidasa en la vejiga inyectada se mantiene en aproximadamente 66% después de 70 días. La **figura 15C** muestra la sección transversal de una uretra de rata. La inyección de células derivadas del músculo de rata primarias produce un gran efecto de relleno en la pared de la uretra.

10 Descripción detallada de la invención

En la presente se describen células derivadas del músculo genéticamente modificadas que contienen al menos un ácido nucleico heterólogo (es decir, exógeno a las células musculares) que codifica un producto génico deseado, tal como una proteína, un polipéptido, un péptido, una hormona, un metabolito, una enzima, o un factor trófico, incluyendo citoquinas, en las que el producto o productos génicos se expresan de una manera sostenida en las células, y son transportados terapéuticamente por las células modificadas hacia un sitio de tejidos u órganos para estimular la curación después de una lesión, o para remediar una disfunción localizada de un órgano o un tejido. Los tejidos y los órganos adecuados para el transporte de genes mediado por células derivadas del músculo incluyen el sistema musculoesquelético (por ejemplo, articulaciones), hueso, y sistema urogenital (por ejemplo, uretra, vejiga, esfínter).

La presente descripción proporciona células derivadas del músculo genéticamente modificadas, por ejemplo, mioblastos, para mejorar y expandir el tratamiento de varios tipos de disfunciones de la vejiga, incluyendo la contractilidad alterada de la vejiga. La presente descripción proporciona, por primera vez, el uso de células del músculo esquelético para la reparación de la disfunción del músculo liso del tracto urinario.

La presente descripción proporciona también un revolucionario tratamiento nuevo para la incontinencia urinaria provocada por una alteración o una disfunción de la vejiga y de la uretra. Las mujeres y los hombres que padecen de incontinencia urinaria son tratados utilizando una inyección de células derivadas del músculo autólogas (es decir, tales como mioblastos, recolectados del paciente) para construir y sostener al esfínter urinario. La presente descripción se refiere a células derivadas del músculo inyectadas en la pared de la vejiga como técnica de mioplastia celular para mejora la contratilidad del detrusor, y se refiere a la expresión mediada por células derivadas del músculo de la óxido nítrico sintasa (NOS) como terapia génica para el tratamiento de la disfunción del tracto urinario inferior.

Son adecuadas una serie de células derivadas del músculo o miogénicas. Los ejemplos no limitantes de estas células incluyen mioblastos, fibroblastos, adipocitos y células precursoras derivadas del músculo que residen en el tejido muscular. También se incluyen mioblastos esqueléticos del músculo esquelético, en particular para el uso en la reparación de la disfunción del músculo liso en el tracto urinario. Las células derivadas del músculo son capaces de transportar genes no sólo al músculo esquelético y liso, sino también al hueso, cartílago, ligamentos y menisco.

Las células derivadas del músculo, que incluyen mioblastos, pueden ser células primarias, células cultivadas, o clonadas. Pueden ser histocompatibles (autólogas) o no histocompatibles (alogeneicas) con el receptor, que incluye a seres humanos. Estas células se modifican genéticamente para que porten genes específicos que codifican productos génicos y/o productos de fármaco concretos, y pueden actuar como sistemas de transporte local a largo plazo para una diversidad de tratamientos, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades y patologías tales como el cáncer de vejiga, el rechazo de transplantes, los trastornos neurogénicos de la vejiga, por ejemplo, los que aparecen como resultado de la diabetes mellitus, y para la regeneración de músculos y nervios.

Se prefieren los mioblastos y las células precursoras derivadas del músculo, y se prefieren aún más los mioblastos y las células precursoras derivadas del músculo autólogos que no serán reconocidas como extraños por el receptor. A este respecto, los mioblastos utilizados para la transferencia o el transporte de genes mediado por células presentarán correspondencia con el locus de histocompatibilidad mayor (MHC o HLA en seres humanos). Estas células con MHC o HLA correspondiente pueden ser autólogas. Como alternativa, las células pueden proceder de una persona que tenga el mismo perfil de antígenos de MHC o HLA, o un perfil similar. El paciente también puede hacerse tolerante a los antígenos de MHC alogeneicos. También se contempla el uso de células que carecen de antígenos de MHC de clase I y/o II, según se describe en la patente de EEUU nº 5.538.722.

Los mioblastos, las células musculares mononucleadas, son exclusivamente diferentes de otras células del cuerpo por una serie de razones: 1) los mioblastos se diferencian naturalmente para formar túbulos de músculo capaces de la contracción muscular; 2) cuando los mioblastos se fusionan para formar miotubos, estas células se convierten en postmitóticas (detienen su división) con la maduración, permitiendo así el control del número y de la cantidad de mioblastos por inyección; y 3) como miotubos, las células expresan grandes cantidades de proteína que se produce en las células debido a la multinucleación.

Las células derivadas del músculo, incluyendo los mioblastos, pueden modificarse genéticamente mediante una diversidad de técnicas y métodos moleculares conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, transfección, infección, o transducción. La transducción, tal como se emplea en la presente, se refiere a células que se han modificado genéticamente para que contengan un gen extraño o heterólogo mediante la introducción de un vector vírico en las células. Las células derivadas del músculo, incluyendo los mioblastos, pueden ser transducidas por diferentes vectores víricos y, así, puede actuar como vehículos de transporte de genes para transferir proteínas expresadas hacia el músculo.

Aunque se prefieren los vectores víricos, los expertos en la técnica apreciarán que la modificación genética de células para que contengan secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen proteínas o polipéptidos deseados, citoquinas y similares, puede realizarse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, según se describe en la patente de EEUU nº 5.538.722, que incluyen la fusión, la transfección, la lipofección mediada por el uso de liposomas, la electroporación, la precipitación con DEAE-dextrano o fosfato de calcio, el bombardeo de partículas (biolística) con partículas revestidas con ácidos nucleicos (por ejemplo, partículas de oro), la microinyección, y similares.

La presente descripción también se refiere a vehículos o construcciones de vectores para introducir un ácido nucleico (ADN o ARN) heterólogo (es decir, extraño), o un segmento de un ácido nucleico que codifique un producto bioactivo funcional, en células derivadas del músculo, en los que los vectores comprenden una secuencia de ácido nucleico que se lee en la fase correcta para la expresión. Estos vectores o vehículos, por supuesto, poseen una secuencia de promotor, colocada de forma ventajosa cadena arriba de la secuencia que se va a expresar. Los vectores también pueden contener, opcionalmente, uno o más genes marcadores expresables para la expresión como una indicación del éxito de la transfección y de la expresión de las secuencias de ácidos nucleicos contenidas en el vector. Para asegurar la expresión, los vectores contienen una secuencia de promotor para la unión de las ARN polimerasas celulares apropiadas, que dependerá de la célula en la que se introduce el vector. Por ejemplo, el promotor para la expresión en células derivadas del músculo, tales como mioblastos, es una secuencia de promotor con la cual se unirán las ARN polimerasas celulares.

Los ejemplos ilustrativos de vehículos o construcciones de vectores para la transfección o la infección de células derivadas del músculo incluyen vectores víricos defectuosos para la replicación, vectores de virus de ADN o virus de ARN (retrovirus), tales como vectores adenovíricos, del virus del herpes simplex y vectores víricos adenoasociados. Los vectores de virus adenoasociados son monocatenarios y permiten el transporte eficaz de múltiples copias del ácido nucleico al núcleo de la células. Se prefieren los vectores adenovíricos. Los vectores normalmente estarán sustancialmente exentos de cualquier ADN procariota y pueden comprender una serie de secuencias de ácidos nucleicos funcionales diferentes. Un ejemplo de dichas secuencias funcionales puede ser una región de ADN que comprenda secuencias de inicio de la transcripción y la traducción, y secuencias reguladoras de la terminación, incluyendo promotores (por ejemplo, promotores fuertes, promotores inducibles y similares) y potenciadores que son activos en las células musculares. También se incluye como parte de las secuencias funcionales un marco de lectura abierto que codifica una proteína de interés, y también puede comprender secuencias flanqueantes para la integración dirigida al sitio. Como ejemplo concreto, en algunas situaciones, la secuencia 5'-flanqueante permitirá la recombinación homóloga, cambiando así la naturaleza de la región de inicio de la transcripción, para proporcionar una transcripción inducible o no inducible para aumentar o disminuir el nivel de la transcripción, por ejemplo.

En general, el ácido nucleico deseado que va a ser expresado por la célula derivada del músculo es el de un gen estructural, o un fragmento funcional, un segmento o una porción del gen, que es heterólogo con la célula derivada del músculo y que codifica un producto de proteína o polipéptido deseado, por ejemplo. El producto codificado y expresado puede ser intracelular, es decir, se queda en el citoplasma, en el núcleo o en un orgánulo de la célula, o puede ser segregado por la célula. Para la secreción, puede conservarse la secuencia señal natural presente en el gen estructural, o puede utilizarse una secuencia señal que no esté presente de modo natural en el gen estructural. Cuando el polipéptido o el péptido es un fragmento de una proteína que es más grande, puede proporcionarse una secuencia señal de modo que, tras la secreción y el procesamiento en el sitio de procesamiento, la proteína deseada tendrá la secuencia natural. Los ejemplos más específicos de genes de interés para su uso según la presente invención incluyen los genes que codifican la óxido nítrico sintasa; factores tróficos, incluyendo factores del crecimiento y citoquinas, tales como los factores del crecimiento de fibroblastos básico y ácido (bFGF y aFGF), el factor del crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina, el factor del crecimiento de tipo insulínico (IGF), el factor del crecimiento transformante-alfa (TGF- α), el factor del crecimiento transformante-beta (TGF- β), el factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y similares; hormonas; productos metabólicos, en general de bajo peso molecular; productos difundibles; proteínas séricas; proteínas osteogénicas, por ejemplo, BMP-2.

Tal como se mencionó anteriormente, puede estar presente un marcador para la selección de células que contengan la construcción del vector. El marcador puede ser un gen inducible o no inducible y en general permitirá una selección positiva bajo inducción, o sin inducción, respectivamente. Los ejemplos de genes marcadores incluyen neomicina, dihidrofolato reductasa, LacZ, y similares.

El vector empleado en general también incluirá un origen de la replicación y otros genes que son necesarios para la replicación en las células hospedantes, según los emplean de forma habitual los expertos en la técnica. Como

ejemplo, puede incluirse como parte de la construcción un sistema de replicación que comprenda el origen de la replicación y cualquier proteína asociada con la replicación codificada por un virus concreto. Como advertencia, el sistema de replicación debe seleccionarse de modo que los genes que codifican los productos necesarios para la replicación no transformen, en último término, a las células derivadas del músculo. Estos sistemas de replicación pueden ser representados por el adenovirus defectuoso en la replicación construido según se describe en G. Acsadi *et al.*, 1994, Human Mol. Genetics, 3(4):579-584, y por el virus de Epstein-Barr. Los ejemplos de vectores defectuosos en la replicación, en particular vectores retrovíricos que son defectuosos en la replicación, son BAG, descrito por Price *et al.*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci., 84:156; y Sanes *et al.*, 1986, EMBO J., 5:3133. Se entenderá que la construcción del gen final puede contener uno o más genes de interés, por ejemplo, un gen que codifique una molécula metabólica bioactiva, por ejemplo, NOS, iNOS, o NO, y un gen que codifica una citoquina, por ejemplo, bFGF, junto con las secuencias que permiten la expresión y la producción apropiadas de los productos génicos por las células modificadas. Además, puede emplearse ADNc, ADN producido de modo sintético o ADN cromosómico utilizando métodos y protocolos conocidos y practicados por los expertos en la técnica.

Si se desea, pueden emplearse vectores víricos defectuosos en la replicación infecciosos para modificar genéticamente las células antes de la inyección *in vivo* de la células. A este respecto, los vectores pueden introducirse en células productoras de retrovirus para la encapsulación anfotrófica. La expansión natural de las células derivadas del músculo, tales como mioblastos, hacia regiones adyacentes obvia un gran número de inyecciones en las fibras musculares del sitio o sitios de interés.

Las células derivadas del músculo pueden transducirse con un ácido nucleico que codifique un producto génico concreto, por ejemplo, un gen que codifique la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Las células derivadas del músculo transducidas, que contienen, expresan y producen el producto de iNOS, se emplean en el trasplante mediado por células o en técnicas de terapia génica para el tratamiento de disfunciones del tracto genitourinario. Los ejemplos de disfunciones del tracto urinario inferior incluyen, pero no se limitan a disfunción eréctil del pene, enfermedad de Peyronie del pene; disfunciones de la uretra, tales como incontinencia urinaria de esfuerzo, obstrucción de la salida de la vejiga, uretritis, evacuación disfuncional; disfunciones de la vejiga, tales como alteración de la contractilidad de la vejiga, vejiga neurogénica, cistitis y enfermedad inflamatoria de la vejiga; y disfunción de los órganos sexuales y reproductivos femeninos, tales como la vagina, el cuello del útero, el útero, las trompas de Falopio y los ovarios.

También pueden cotransducirse las mismas u otras células derivadas del músculo con un ácido nucleico heterólogo que codifique factores tróficos cuya expresión y producción por las células derivadas del músculo ayuda a realizar y/o potenciar los usos terapéuticos de las células derivadas del músculo transducidas en una terapia génica mediada por células. Se emplean preferiblemente factores tróficos tales como citoquinas. De modo más específico, las citoquinas útiles incluyen las que se presentaron anteriormente en la presente, entre las cuales se encuentran el factor del crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), el factor del crecimiento nervioso (NGF) y las interleuquinas, tales como IL-1 e IL-6.

Las células derivadas del músculo modificadas para que contengan un ácido nucleico que codifique uno o más factores tróficos pueden administrarse como tratamiento al mismo tiempo que las células derivadas del músculo que contienen un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica o una molécula bioactiva, tal como una proteína, un polipéptido, un péptido, una hormona, un metabolito, un fármaco, una enzima y similares. Como alternativa, las células derivadas del músculo modificadas para que expresen factores tróficos pueden administrarse en un momento anterior o posterior, dependiendo del tipo de tratamiento deseado.

En general, una inyección de células derivadas del músculo genéticamente modificadas, que incluyen mioblastos y células precursoras derivadas del músculo, en un tejido o un sitio de lesión concretos comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de células en disolución o suspensión, preferiblemente de aproximadamente 10^5 a 10^6 células por cm^3 de tejido que se va a tratar, en un medio fisiológicamente aceptable, tal como disolución salina o disolución salina tamponada con fosfato, y similares.

Se contempla el transporte de genes *ex vivo* hacia células y tejidos de un hospedante mamífero receptor, incluyendo seres humanos, mediante el uso de células derivadas del músculo, por ejemplo, mioblastos, que se han transducido víricamente utilizando un vector adenovírico modificado para que contenga un gen heterólogo que codifique un producto génico deseado. Esta estrategia *ex vivo* proporciona la ventaja de una transferencia eficaz de genes víricos que, en los casos de tratamientos de defectos y disfunciones musculares, tal como se describe en la presente, es mejor para estrategias de transferencia directa de genes. El procedimiento *ex vivo* implica el establecimiento de un cultivo primario de células derivadas del músculo procedentes de células aisladas de tejido muscular. La biopsia muscular que actúa como fuente de células derivadas del músculo puede obtenerse de un sitio lesionado o de otra área que pueda proporcionar con más facilidad un cirujano clínico.

Las células derivadas del músculo primero se infectan con vectores víricos modificados que contienen al menos un gen heterólogo que codifica un producto génico deseado, y después se inyectan en el mismo hospedante. En el caso de mioblastos como ejemplo, las células derivadas del músculo isogénicas transducidas inyectadas después se fusionan para formar miotubos en el sitio de la inyección o cerca. El producto génico deseado es expresado por las células inyectadas que, así, introducen el producto génico en el tejido inyectado, por ejemplo, músculo. Los

productos génicos introducidos pueden estimular y potenciar la regeneración muscular y la fuerza muscular *in vivo* para mejorar la curación del músculo después de lesiones.

5 Se emplea la inyección de células derivadas del músculo, preferiblemente una inyección de mioblastos autólogos, en la pared uretral como tratamiento para la incontinencia urinaria de esfuerzo para potenciar, mejorar y/o reparar el esfínter urinario. Las células derivadas del músculo, preferiblemente mioblastos, que portan uno o más ácidos nucleicos heterólogos transducidos o transfectados que codifican una molécula bioactiva y/o un factor trófico, se inyectan en la pared uretral, y sobreviven y se diferencia en miofibras para mejorar la función del esfínter. La viabilidad y la supervivencia de la inyección de mioblastos en la pared uretral se demuestra en el ejemplo 2. Las inyecciones de células derivadas del músculo autólogas (es decir, células derivadas del músculo recolectadas de un paciente con incontinencia de esfuerzo concreto y cultivadas para este) pueden utilizarse como agente no alergénico para rellenar la pared uretral, potenciando así la coaptación y mejorando el músculo del esfínter urinario.

10 Las células derivadas del músculo pueden inyectarse en la pared de la vejiga para mejorar la contractilidad del detrusor. Las células derivadas del músculo, tales como mioblastos y células precursoras derivadas del músculo, inyectadas en la pared de la vejiga son capaces de sobrevivir y diferenciarse en miofibras que pueden potenciar la contractilidad del detrusor, según se muestra en el ejemplo 3. Además, las células derivadas del músculo que han sido genéticamente modificadas para que porten un gen extraño expresan el producto génico extraño después de la inyección en la pared de la vejiga.

15 Las células derivadas del músculo autólogas administradas directamente a la vejiga y a la uretra muestran una supervivencia a largo plazo. El uso de una terapia génica mediada por células que implique a células derivadas del músculo genéticamente modificadas resulta ventajoso frente al uso de otras formas de terapia génica, es decir, terapias génicas que implican la administración directa de virus o vectores plasmídicos, por ejemplo. Como ejemplo, el tipo de célula derivada del músculo puede contribuir a la supervivencia de las células inyectadas después del trasplante. A este respecto, pueden recolectarse mioblastos primarios autólogos y los mioblastos cultivados pueden conservarse y utilizarse en cantidades suficientes para realizar repetidas inyecciones en la uretra y la vejiga. Una inyección de mioblastos autólogos da como resultado una supervivencia a largo plazo segura y no inmunogénica de las miofibras en el tracto urinario inferior (véase el ejemplo 4 y las figuras 15A-15C).

20 La terapia génica mediada por células derivadas del músculo también incluye células derivadas del músculo, por ejemplo, mioblastos, transducidas con un vector adenovírico que porta el gen bFGF, permitiendo con ello la expresión de bFGF por las células derivadas del músculo transducidas en un tejido concreto. Las células derivadas del músculo modificadas con bFGF se inyectan en la uretra para tratar la incontinencia de esfuerzo y también en la pared de la vejiga para mejorar la contractilidad del detrusor. La inyección de células derivadas del músculo modificadas con bFGF permite una mejora en la supervivencia y la función frente a células derivadas del músculo no modificadas. Después de realizar experimentos a corto plazo se llevaron a cabo experimentos a largo plazo utilizando una inyección de mioblastos primarios autólogos-bFGF en la vejiga y la uretra a los 4, 14 y 30 días, según se describe en el ejemplo 6. La terapia génica mediada por células que emplea mioblastos transducidos que segregan el factor trófico bFGF proporciona un mayor éxito para solucionar las disfunciones en la uretra y la vejiga, comparado con mioblastos que no segregan bFGF.

25 Pueden introducirse vectores adenovíricos que portan el gen de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en células derivadas del músculo, y las células transducidas resultantes pueden emplearse en una terapia génica mediada por células. Cuando estas células derivadas del músculo transducidas se administran de modo local a la uretra y a la vejiga se producen unas extraordinarias modificaciones funcionales, por ejemplo, una disminución en la inflamación de la vejiga y una mejora en la relajación uretral (véase el ejemplo 7). La terapia génica mediada por células derivadas del músculo modificadas con iNOS en la vejiga proporciona una disminución de la inflamación de la vejiga. Además, una inyección de mioblastos modificados con iNOS en la uretra ha demostrado ser útil para disminuir la obstrucción de la salina uretral. Una terapia génica mediada por mioblastos-iNOS produce un aumento en la producción local de NO en el tejido inyectado. Una terapia génica con iNOS en la vejiga también disminuye la respuesta inflamatoria de la vejiga inducida por ciclofosfamida (CYP). Una terapia génica con iNOS en la uretra también induce la relajación sostenida del músculo liso uretral, según se describe en el ejemplo 7.

30 El uso de una transferencia de genes mediada por células derivadas del músculo hacia el sistema musculoesquelético, tal como las articulaciones, ofrece numerosas ventajas. Una biopsia de músculo para el aislamiento de células derivadas del músculo, por ejemplo, mioblastos, para su uso como vehículos de transporte de genes es mucho más fácil y menos invasiva que, por ejemplo, una biopsia de la cápsula sinovial quirúrgica para el aislamiento de células sinoviales. En una biopsia de músculo, una pequeña área de tejido muscular generalmente contiene suficientes células miogénicas para producir con rapidez millones de células derivadas del músculo en cultivo. Para los mioblastos, después de aislar y cultivar las células, resulta fácil distinguir los mioblastos puros de otros tipos celulares, puesto que los mioblastos se fusionan para formar miotubos alargados *in vitro*. Además, puede utilizarse la desmina, una proteína marcadora específica miogénica, para determinar el índice de miogenicidad del cultivo celular sin que sea necesaria una diferenciación. Por contraste, debido a que las células sinoviales son más difíciles de distinguir de otros tipos celulares, la obtención de un cultivo de células sinoviales puro resulta problemático para el tratamiento de enfermedades o disfunciones musculares.

Además, antes de la fusión, los mioblastos son transducidos con cinco veces más eficacia que las células sinoviales empleando el mismo número de partículas adenovíricas por células *in vitro*. La diferenciación de los mioblastos transducidos en miotubos aumenta el nivel de expresión génica en las miofibras y los miotubos diferenciados. Una de las ventajas principales de los mioblastos frente a otros tipos celulares, tales como las células sinoviales, es la capacidad de los mioblastos para fusionarse y convertirse en una célula postmitótica diferenciada, que puede expresar de forma persistente un nivel alto de un producto génico exógeno. De hecho, la expresión génica mediada por los mioblastos persiste durante al menos 35 días en la articulación. Esto permite la expresión y la producción persistente y eficaz de cualquier proteína de interés en la articulación.

Además, los mioblastos transducidos con vectores adenovíricos que portan el gen que codifica la proteína agonista del receptor de interleuquina-1 (IRAP) producen nueve veces más IRAP, según se mide mediante ELISA, que una infección por células sinoviales transducidas de modo similar. Los resultados indican que los mioblastos están introduciendo más proteína después de la transferencia génica en el revestimiento sinovial de la articulación de la rodilla adyacente a la zona patelar (figura 4).

Además, se ha demostrado que los mioblastos sobreviven en las articulaciones articulares (rodilla) de recién nacidos y adultos en modelos animales. Estos mioblastos se han adherido a la mayoría de las estructuras de la rodilla de recién nacido, incluyendo los ligamentos patelares, los ligamentos cruzados, el menisco, el sinovio y la cápsula articular. Por contraste, las células sinoviales han sobrevivido en la rodilla adhiriéndose sólo al revestimiento sinovial.

Además, las inyecciones de células derivadas del músculo directamente en las estructuras intraarticulares, incluyendo el ligamento y el menisco, producen una mayor transferencia génica que la observada utilizando una inyección en el fluido articular. Se ha demostrado que los mioblastos modificados con un adenovirus que transporta la expresión del gen indicador de β -galactosidasa son capaces de producir una mayor eficacia y una persistencia a largo plazo del gen indicador, cuando se compara con el uso de fibroblastos del ligamento y una inyección adenovírica directa (figura 6A-6D). Por consiguiente, los mioblastos transducidos con adenovirus son capaces de transportar genes y expresar productos génicos en el ligamento y el menisco del conejo una semana después de la inyección (figuras 5A-5D, menisco, y figuras 6A-6D, ligamento), indicando con ello que el uso de esta tecnología puede ayudar a mejorar la curación del ligamento después de lesiones. Así, tal como se describe en la presente, puede utilizarse una inyección directamente en las estructuras intraarticulares o en el fluido articular para transportar genes hacia la articulación.

El transporte de genes estable y persistente a través de células derivadas del músculo hacia las articulaciones tiene numerosas aplicaciones clínicas. Las células derivadas del músculo genéticamente modificadas, tales como mioblastos y células precursoras derivadas del músculo, puede transportar proteínas con una función antiartrítica, tales como la proteína agonista del receptor de interleuquina-1 (IL-1Ra) o receptores solubles para el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) hacia una articulación de la rodilla inflamada (ejemplo 9). Esta tecnología puede reemplazar a la intervención quirúrgica para ayudar a la curación de diferentes tipos de tejidos dañados (por ejemplo, ligamento, menisco, cartílago) que tienen pocas capacidades intrínsecas de curación en la articulación. Además pueden transportarse factores de crecimiento hacia el sitio y pueden persistir allí en la práctica de la presente invención para mejorar las patologías tisulares en la articulación. El alto nivel de expresión génica y de producción del producto génico mediante la tecnología de la transferencia de genes mediada por células musculares proporciona ventajas en la técnica que previamente no podían lograrse utilizando las metodologías actuales.

Las células precursoras derivadas del músculo pueden aislarse a partir del músculo esquelético. Cuando se estimulan de forma apropiada con la proteína morfogenética ósea-2 (BMP-2), estas células son capaces de expresar la fosfatasa alcalina de una manera dependiente de la dosis y, de modo más importante, de participar de forma activa en la formación de hueso *in vivo*. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse en otros linajes. Por consiguiente, estas células pueden utilizarse no sólo para transportar factores del crecimiento y citoquinas al sistema musculoesquelético, sino que también actúan como fuente endógena de células respondedoras que pueden participar de forma activa en el proceso de curación del sistema musculoesquelético.

La transferencia de genes mediada por células derivadas del músculo puede emplearse para tratar defectos óseos (ejemplo 10). Debido a que la mayoría de los defectos óseos están rodeados por músculo, las células derivadas del músculo inyectadas, tales como mioblastos, tienen un medio miogénico natural sobre el que fusionarse. Las biopsias de músculo para aislar células derivadas del músculo adecuadas para su uso según la invención son procedimientos menos invasivos que las biopsias de médula ósea para aislar células estromáticas, por ejemplo. De hecho, la mayoría de las biopsias musculares pueden realizarse en un consultorio.

Además, un gran porcentaje de las células aisladas de una biopsia de músculo esquelético son mioblastos, mientras que sólo del 1% al 2% de las células de la médula ósea tienen capacidad osteogénica. Los mioblastos en cultivo celular pueden purificarse aún más utilizando una tecnología establecida (T.A. Rando y H.M. Blau, 1994, J. Cell. Biol., 125:1275-1287), y las células musculares son relativamente fáciles de cultivar *in vitro*; pueden obtenerse millones de células en unos pocos días.

Otra ventaja de la terapia génica mediada por células derivadas del músculo para el tratamiento de defectos óseos es que las células musculares pueden transformarse en osteoblastos cuando son estimuladas por proteínas

osteogénicas, otorgándolas así un potencial osteogénico después de la estimulación. Por ejemplo, los mioblastos transducidos son capaces de fusionarse en miofibras en el defecto óseo y en los músculos que rodean el defecto y al mismo tiempo expresar un gen marcador (ejemplo 10). La modificación de células del músculo esquelético que rodean al defecto óseo para que expresen o sobreexpresen proteínas osteogénicas, por ejemplo, BMP-2, permite la liberación de estas proteínas para mejorar la curación del hueso en el defecto óseo adyacente. De forma más importante, el trasplante de células derivadas del músculo modificadas con BMP-2, que pueden fusionarse para formar miotubos y miofibras que producen la proteína osteogénica en el defecto óseo, puede potenciar aún más la curación del hueso. De hecho, la transferencia de genes mediada por células derivadas del músculo de proteínas osteogénicas tiene la capacidad de mejorar los aspectos osteoinductores y osteoconductores de la curación del hueso.

La citoarquitectura de las miofibras fusionadas no sólo puede actuar como depósito para segregar proteínas osteogénicas, sino también como matriz para la formación de hueso. Es probable que el músculo, debido a su alta vascularidad, pueda mejorar la revascularización del defecto óseo y, así, ayudar a mejorar la curación del hueso. Una estrategia viable y eficaz para mejorar la curación de defectos segmentales del hueso, de fracturas y falta de uniones del hueso se describe en la presente, así como se describen células que pueden participar en la formación de hueso deseada.

Se ha determinado que una población de células osteoprogenitoras que residan dentro del músculo esquelético sería adecuada como vehículo para el transporte de proteínas osteogénicas, tales como BMP-2, hacia el área del defecto óseo. Además, bajo la estimulación de dichas proteínas osteogénicas, las células de transporte en sí mismas tienen el potencial de convertirse en osteoblastos y participar en la formación de hueso (ejemplo 11). Estas células preosteoblásticas derivadas del músculo (es decir, células mesenquimáticas pluripotenciales que se encuentran en el músculo esquelético) son mejores que las células estromáticas como vehículos de transporte de genes *ex vivo* mediado por células, debido a la mayor capacidad proteica de las primeras.

Tal como se describe en el ejemplo 11, una subpoblación de células derivadas del músculo, que puede obtenerse mediante una técnica que puede reproducirse con facilidad, puede inducirse para que adquiera actividad fosfatasa alcalina (ALP) mediante una estimulación con BMP-2. Sin la estimulación con BMP-2, esta misma población de células no tiene actividad ALP. La actividad ALP tiene tendencia a una dependencia de la dosis y aumenta significativamente con más dosificaciones de BMP-2 a lo largo del tiempo. La misma población de células disminuye su expresión de desmina, un marcador miogénico, con una estimulación con BMP-2. La población de células productoras de ALP estimulables con BMP-2 está diferenciada desde el punto de vista morfológico de otras células derivadas del músculo, y se divide lentamente. Es probable que estas células representen una población de células mesenquimáticas pluripotenciales presente en el músculo y son útiles para el transporte de genes mediado por células hacia el hueso.

Ejemplos

Los ejemplos indicados en la presente pretenden ejemplificar los diversos aspectos de la presente invención y la descripción que se han indicado en la presente.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Animales e inyección de mioblastos: Se emplearon ratas hembra adultas Sprague-Dawley (S.D.) (Hilltop Laboratories, Pittsburgh, PA), que pesan aproximadamente 250 g en los experimentos descritos. Sólo se emplearon animales exentos de virus certificados. Los animales se alojaron en una instalación P-2 para terapia vírica aprobada en the University of Pittsburgh Medical Center. Se siguió un estricto seguimiento del protocolo P-2. Los animales se anestesiaron con pentobarbital (50 mg/kg) para la recolección de mioblastos, la inyección de mioblastos, y durante las mediciones de la presión de la vejiga.

Después de la preparación quirúrgica se realizó una incisión en la baja línea media para exponer la vejiga y la uretra proximal. Durante la inyección, utilizando una jeringa Hamilton, se inyectaron 10-20 microlitros (μl) de suspensión de mioblastos (aproximadamente $1-2 \times 10^6$ células por $10 \mu\text{l}$) en la vejiga o la submucosa uretral proximal dorsal de los animales experimentales (grupo 1) en dos sitios. En cada animal se inyectó en el mismo sitio. Los animales control (grupo 2) recibieron una inyección con un volumen igual de disolución salina estéril. Durante la primera semana después de la implantación, los animales se controlaron atentamente para observar la aparición de acontecimientos adversos.

Modelo de criolesiones: Se empleó una varilla de aluminio de 8 mm de diámetro (Harvard Scientific) como criosonda para producir una lesión en la pared uretral o de la vejiga a lo largo de su espesor total sin provocar la rotura de la vejiga. La criosonda se colocó en hielo seco durante 1 minuto y después se colocó inmediatamente sobre la pared de la vejiga o la pared uretral durante 10 segundos sin provocar la ruptura de la vejiga, según se determina mediante histología. Se ha descubierto que este método provoca una lesión transmural fiable y reproducible. En animales tratados de forma simulada, la criosonda se colocó sobre el tejido a temperatura ambiente. Para la lesión en la vejiga, la vejiga se rellenó hasta 1 ml de volumen utilizando disolución salina estéril a

través de un catéter uretral. Cada vejiga se lesionó en un sitio (cúpula de la vejiga). La inyección con mioblastos se realizó 15 minutos después de la criolesión o la lesión simulada en el sitio de la lesión. La lesión uretral se realizó en la posición ventral de las 12 horas de la uretra proximal con el cuello de la vejiga como margen craneal.

5 **Medición del patrón de micción:** Se obtuvieron perfiles del patrón de micción utilizando una jaula metabólica especializada que desvía la orina evacuada para su recolección y cuantificación a lo largo de un periodo de 24 hoars. Los parámetros de micción evaluados en los experimentos descritos incluyen la producción de orina total/24 horas, el número de micciones/24 horas, y el volumen medio por micción (M.D. Chancellor *et al.*, 1994, J. Urol., 151:250-254; T. Watanabe *et al.*, 1996, J. Urol., 156: 1507-1510).

10 La orina desviada se recogió en una copa colocada en un transductor indicador de la tensión (Grass, F3) conectado a un preamplificador indicador de la tensión (Word Precision Instruments, Saratoga, FL). Los datos se introdujeron en un sistema de adquisición de datos: la adquisición de los datos se realizó con una tarjeta AD (DATAW) colocada en un ordenador Gateway 2000. En el ordenador se había instalado un programa de adquisición de datos apropiado (es decir, DI-200, DATAQ) y un programa informático de reproducción (es decir, WindaqEx).

15 **Cistometrograma (CMG):** Se realizó un CMG (es decir, una medición de la inyección uretral de mioblastos, una medición de la inyección en la vejiga de mioblastos, y una medición de la presión uretral) bajo anestesia de uretano (2,4 mg/kg²). Las técnicas específicas del CMG para la inyección uretral y en la vejiga se describen a continuación.

20 **Medición de la inyección uretral de mioblastos:** La vejiga se canuló utilizando un catéter p-50 colocado a través del sitio de la punción en la cúpula de la vejiga y se fijó con una ligadura de seda. Este catéter estaba conectado a un conector en Y, a una bomba de infusión Harvard y a un polígrafo Grass. Se realizó una evaluación urodinámica de infusión continua con una velocidad de relleno constante de 0,075 ml/min utilizando una bomba Harvard. Se determinó el volumen de la capacidad de la vejiga, la presión máxima de evacuación, y el volumen de orina residual.

25 **Medición de la inyección en la vejiga de mioblastos:** La vejiga se canuló utilizando un catéter p-50 colocado en la uretra. Este catéter estaba conectado a un conector en Y, a una bomba de infusión Harvard y a un polígrafo Grass. Se realizó una evaluación urodinámica de infusión continua con una velocidad de relleno constante de 0,075 ml/min utilizando una bomba Harvard. Se determinó el volumen de la capacidad de la vejiga, la presión máxima de evacuación, y el volumen de orina residual. La uretra se canuló según se describe en los experimentos, y no como se canula la vejiga tal como se indica en la medición de la inyección uretral de mioblastos para no alterar la función de la vejiga.

30 **Medición de la presión uretral:** Se midió la presión de perfusión uretral y la presión de la vejiga isovolumétrica con catéteres insertados a través de la cúpula de la vejiga en ratas S.D. hembra anestesiadas con uretano. Un montaje de catéter previamente descrito (H. Kakizaki *et al.*, 1997, Am. J. Physiol., 272:R1647-1656) se introdujo en el cuello de la vejiga para bloquear el paso de fluidos entre la vejiga y la uretra sin afectar el suministro nervioso a los órganos. La uretra externa no se cateterizó. Las respuestas se estudiaron a una velocidad de infusión de disolución salina uretral de 0,075 ml/min.

35 Se preparó un catéter de registro de la presión y de perfusión intrauretral transvesical de lumen doble como sigue: Se construyó un catéter de vejiga de lumen doble con un tubo PE 200 (lumen externo, extremo libre quemado con llama) y un tubo PE 50 (lumen interno). El tubo PE 200 se conectó a una jeringa para el llenado de la vejiga, y el tubo PE 50 se conectó a un transductor de presión. Ambos tubos también pueden conectarse, mediante tapones, a un sistema de bomba peristáltica ajustada para un intercambio de fluido isovolumétrico como método para el transporte intravesical de fármaco.

40 Se construyó un catéter uretral de lumen doble utilizando un tubo PE 160 (lumen externo) y un tubo PE 50 (lumen interno). El tubo PE 160 tenía una punta de pipeta en un extremo y se conectó a una bomba de infusión para la perfusión intrauretral de disolución salina o disolución de fármaco. El lumen interno del tubo PE 50 se extiende ligeramente más allá del lumen externo, pero sigue estando dentro de la punta de la pipeta. El otro extremo está conectado con un transductor de presión para la medición de la presión de perfusión intrauretral.

45 El sistema de catéter uretral se hace pasar a través de la cúpula de la vejiga y se asienta cómodamente en el cuello de la vejiga. Los catéteres uretral y de la vejiga se fijaron a la cúpula de vejiga con una sutura.

50 **Medición de la contracción de tiras de vejiga y uretrales provocada por una estimulación eléctrica:** La vejiga y la uretra se retiraron con rapidez del abdomen después de la decapitación. Se preparó una tira longitudinal de cada vejiga, y se preparó una tira espiral de la uretra. Las preparaciones se montaron en 5 ml de baño de órganos que contenía disolución de Krebs (mmol/l: NaCl 113, KCl 4,7, CaCl₂ 1,25, MgSO₄ 1,2, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1,2, glucosa 11,5) y se burbujearon constantemente con una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂. La tensión inicial se ajustó a 10 mN y se midieron las contracciones isométricas con transductores indicadores de tensión acoplados con un amplificador indicador de tensión TBM4 (World Precision Instruments) y se registraron en un ordenador utilizando un programa de adquisición de datos (Windaq, DATAQ Instruments Inc., Akron, OH, EEUU). La velocidad de muestreo por canal se ajustó a 100 Hz. La amplitud de las contracciones provocadas por la estimulación se calculó utilizando un programa de cálculo (WindaqEx, DATAQ). Después de 20 minutos de equilibrio se aplicaron estímulos de campo eléctrico a través de dos electrodos de alambre de platino colocados en la parte superior e inferior del baño de

órganos con 4 cm de separación.

Paradigma de estimulación: Las tiras de vejiga y uretrales se estimularon con pulsos de onda cuadrada con una duración de 0,25 mseg con el voltaje máximo (100 V) y se construyó una curva de respuesta a la frecuencia utilizando 10 y 80 choques a 1, 2, 5, 10, 20 y 40 Hz. Después se añadió carbacol 5 y 50 μM a la preparación de vejiga para provocar contracciones por la activación del receptor muscarínico M3 postsináptico, y se aplicó K^+ 90 mM para activar directamente el mecanismo contráctil del músculo liso. En las preparaciones uretrales, se aplicó una estimulación de 20 Hz/10 choques para provocar la contracción a través de la estimulación nerviosa. Después se añadió fenilefrina 2 μM al baño para comprobar las contracciones del músculo liso a través de la activación del receptor alfa-1-adrenérgico postsináptico. Entonces se usó K^+ 90 mM para comprobar las respuestas del músculo liso a una despolarización directa.

Modelo de inflamación de la vejiga: Una serie de ratas recibieron una única inyección intraperitoneal de CYP (100 mg/kg) (Sigma Chemical) para el modelo de inflamación de la vejiga. Los mioblastos transducidos mediante un adenovirus que porta el gen iNOS, o mioblastos tratados de forma simulada, se inyectaron a la ratas en la misma sesión bajo una breve anestesia con pentobarbital. Los animales control tratados de forma simulada recibieron una inyección de disolución salina estéril. Los animales se controlaron para determinar el patrón de micción durante 4 días antes de los estudios de CMG y el sacrificio. Se recolectó tejido de la vejiga para los estudios de contractilidad y después se procesó para los estudios inmunohistoquímicos.

Modelo de obstrucción uretral: Se empleó una modificación de la técnica descrita por B. Uvelius y A. Mattiasson, 1984, *J. Urol.*, 132:587-590; y W.D. Steers *et al.*, 1991, *J. Urol.*, 155:379-385 para crear una obstrucción parcial de la salida de la vejiga.

Brevemente, ratas S.D. hembra (aproximadamente 250 gramos) se sometieron a una ligadura parcial con sutura de la uretra proximal bajo una breve anestesia con pentobarbital a través de una pequeña incisión en la línea media. El diámetro uretral se redujo a 1 mm atando dos suturas de nailon 4-0 alrededor de la uretra y un tubo de polietileno (D.O. 1 mm) colocado fuera del lumen. El tubo después se retiró y se volvió a aproximar la incisión abdominal. Los animales control se sometieron a una cirugía simulada en la que la uretra se diseccionó circunferencialmente pero no se ligó. Los animales se controlaron atentamente para observar la aparición de complicaciones e incontinencia por rebosamiento. Cuatro semanas después, los mioblastos transducidos con una construcción de adenovirus que porta el gen que codifica la iNOS humana (mioblastos-iNOS), o disolución salina de simulación, se inyectaron en los animales obstruidos y control (aproximadamente 8 animales en cada uno de los 4 grupos). Cuatro días después, los animales se controlaron para observar el patrón de micción antes de los estudios de CMG y el sacrificio. También se determinó el patrón de micción durante las 24 horas inmediatamente anteriores a la inyección de mioblastos. Se recogió tejido uretral y de vejiga para los estudios de contractilidad y después se procesó para los estudios inmunohistoquímicos y la PCR.

Purificación de mioblastos primarios: Se retiraron las patas anteriores y traseras de ratones neonatos (T.A. Rando *et al.*, 1994, *J. Cell Biol.*, 125:1275-1287; Z. Qu *et al.*, 1998, *J. Cell Biol.*, 142:1257-1267) y el hueso se diseccionó. El resto de masa muscular se trituró para producir una suspensión bruta utilizando cuchillas. Las células musculares se disociaron de modo enzimático mediante la adición de colagenasa de tipo X1 (al 0,2%) durante 1 hora a 37°C, dispasa (calidad II, 240 ml) durante 30 minutos, y tripsina (al 0,1%) durante 30 minutos. El extracto de células musculares se precultivó en matraces revestidos con colágeno. Se aislaron diferentes poblaciones de células derivadas del músculo basándose en el número de precultivos realizados en los matraces revestidos con colágeno. El precultivo nº 1 (PP nº 1) representa una población de células derivadas del músculo que se adhieren en la primera hora después del aislamiento; el PP nº 2 representa una población de células derivadas del músculo que se adhiere en las siguientes dos horas; el PP nº 3 representa una población de células derivadas del músculo que se adhiere en las siguientes 18 horas; y los siguientes precultivos en placa se obtuvieron a intervalos de 24 horas (PP nº 4-6). Se evaluó la población miogénica en cada matraz mediante tinción de desmina y según su capacidad de diferenciación cuando se cultiva en un medio de fusión. El medio de proliferación fue F10-Ham suplementado con suero bovino fetal al 20% y penicilina/estreptomicina al 1%; el medio de fusión fue F10-Ham suplementado con suero bovino fetal al 2% y disolución de antibiótico al 1% (penicilina/estreptomicina). Todos los medios de cultivos se adquirieron en Gibco, BRL, Grand Island, NY, EEUU. El primer matraz de precultivo contenía una mayoría de fibroblastos, y el último precultivo estaba muy enriquecido en células miogénicas (positivas a desmina).

Las diferentes poblaciones de células se infectaron con adenovirus que expresan β -galactosidasa. El adenovirus, un adenovirus recombinante con E1-E3 delecionado, fue suministrado amablemente por GeneVec Inc. (doctor I. Kovesdi), y tiene el gen indicador de β -galactosidasa bajo el control del promotor del citomegalovirus humano (HCMV), seguido del t-intrón de SV40 y una señal de poliadenilación (poliA). Las células transducidas con adenovirus entonces se transplantaron al músculo de la pata trasera (gastrocnemio y sóleo) de ratones mdx y se ensayó su supervivencia después de la implantación.

También se obtuvieron mioblastos puros a partir de miofibras viables aisladas como sigue: Inmediatamente después de la dislocación cervical o la decapitación de los ratones mdx, se prepararon fibras de músculo aisladas a partir del músculo sóleo o extensor largo de los dedos (EDL) diseccionados mediante disgregación enzimática en colagenasa de tipo 1 al 0,2% (Sigma, St. Louis, MO, EEUU). Se emplearon fibras de músculo aisladas de ratones de 2 días, 15

días, 1 mes, 6 semanas y 6 meses. Debido al pequeño tamaño de los ratones de 1 a 3 días, el sóleo y el gastrocnemio se retiraron en bloque de la pata inferior para la disgregación.

Se prepararon los músculos de compartimento anterior cortando la pata en las articulaes del tobillo y de la rodilla, y añadiendo toda la pata inferior a la disolución de colagenasa. Después del aislamiento de 200 miofibras por músculo, se cultivó un mínimo de 5-10 miofibras por pocillo en placas de 6 pocillos revestidas con Matrigel 1 mg/ml (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA, EEUU) en 2 ml de medio DMEM que contenía suero de caballo al 10% y extracto de embrión de pollo al 1%, L-glutamina al 2% y penicilina/estreptomicina al 1% (Sigma Co.). Las placas se colocaron en un incubador a 37°C, 5% de CO₂ durante varios días. Las células se surgen de las miofibras cultivadas se hicieron crecer hasta que alcanzaron la confluencia, se ensayaron para la expresión de desmina, se transdujeron con un adenovirus que transporta la expresión del gen indicador LacZ, y se ensayaron para la supervivencia de los mioblastos después de la implantación según el procedimiento descrito en la presente.

También se empleó una línea celular mdx inmortalizada. Esta línea celular se aisló a partir de un animal transgénico que portaba un antígeno T de SV40 termolábil bajo el control de un promotor inducible, según se describe en J.E. Morgan *et al.*, 1994, *Develop. Biol.*, 162:486-498. La línea celular mdx inmortalizada prolifera indefinidamente bajo condiciones permisivas (33°C con gamma-interferón) en medio de proliferación (DMEM + FBS al 20%) y sufre una diferenciación normal a 37-39°C sin gamma-interferón en medio de fusión (DMEM + FBS al 2%).

Vectores adenovíricos: Se construyeron vectores adenovíricos que portan el gen que codifica la β-galactosidasa (es decir, adenovirus-lacZ), el gen que codifica bFGF (es decir, adenovirus-bFGF) y el gen que codifica iNOS (es decir, adenovirus-iNOS) según se describe en la presente. El gen iNOS se ha clonado y se han producido construcciones de vectores según se describe en D.A. Geller *et al.*, 1993, "Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:3491-3495; en E. Tzeng *et al.*, 1997, "Adenoviral transfer of the inducible nitric oxide synthase gene blocks endothelial cell apoptosis", *Surgery*, 122(2):255-263; y en E. Tzeng *et al.*, 1996, "Gene Therapy" (artículo), *Current Problems in Surgery*, 33(12):961-1041. La construcción molecular de un adenovirus defectuoso en la replicación, tal como se emplea en la presente, se describe en G. Ascadi *et al.*, 1994, *Human Mol. Genetics*, 3(4):579-584. La técnica, que implica la construcción, la propagación, la purificación y la valoración del vector adenovírico de primera y tercera generación, se ha descrito en S. Kochanek *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:5731-5736; y G. Ascadi *et al.*, 1994, *Human Mol. Genetics*, 3(4):579-584.

Se clonó ADNc de iNOS humana recombinante a partir de hepatocitos humanos cultivados estimulados con citoquinas, según se describe en D.A. Geller *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:3491-3495 (secuencia del ADNc completa, GenBank n° de registro L09210). El ADNc de iNOS clonado se subclonó en el vector adenovírico junto con un gen de resistencia a neomicina para producir la construcción DFGiNOS. El vector control previamente construido BaglacZ es un retrovirus que expresa el gen lacZ de *E. coli* (que codifica la β-galactosidasa) bajo el control transcripcional de la repetición terminal larga del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV 5' LTR) y el codón de inicio de la traducción gag pr65, y el gen de resistencia a la neomicina bajo el control del promotor temprano de SV40 (Price *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:156-160). Se generaron sobrenadantes víricos BaglacZ y DFR-iNOS sin virus auxiliares a partir de células encapsuladoras CRIP (E. Tzeng *et al.*, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11771-11775; E. Tzeng *et al.*, 1996, *I. Surgery*, 120:315-321).

Preparación de mioblastos: Se cultivaron mioblastos primarios a una densidad de 5×10^4 células por pocillo en una placa de 6 pocillos. Después de 24 horas, las células se lavaron en disolución salina equilibrada de Hank (HBSS). Se formaron partes alícuotas con la cepa de adenovirus y se introdujeron en cada pocillo para lograr una multiplicidad de la infección igual a 50 (MOI = 50). Las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C para permitir una infección adecuada. Entonces se añadió medio de proliferación (ver a continuación) a cada pocillo. Las placas se incubaron a 34°C durante 48 hr. Las células pueden inmunotefñirse para la expresión del transgén o recolectarse en HBSS para su inyección a animales. Las inyecciones varían de $1,33 \times 10^5$ a 1×10^6 células por 100 μl. El tejido se recolectó a las 48 horas después de la inyección.

Transducción de mioblastos con adenovirus: Se cultivaron mioblastos primarios durante 5 días en medio de proliferación, que contenía DMEM y suero bovino fetal al 15%-20% (Gibco-BRL, NY, EEUU). Se infectaron 6×10^5 mioblastos con adenovirus utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 20. Se añadieron microesferas de látex fluorescentes (FLM) a los mioblastos cultivados a una dilución de 1:1000 para marcar los mioblastos, permitiendo con ello seguir *in vivo* el destino temprano de los mioblastos inyectados (J. Huard *et al.*, 1994, *J. Clin. Invest.*, 93:586-599; J. Huard *et al.*, 1994, *Muscle & Nerve*, 17:224-234; J. Huard *et al.*, 1995, *Gene Therapy*, 2:107-115). A las 24 horas después de la infección, los mioblastos se desprendieron utilizando tripsina (al 0,25%) durante aproximadamente un minuto, se centrifugaron durante cinco minutos a 3500 rpm, y el sedimento de mioblastos se reconstituyó con 25 μl de HBSS (Gibco-BRL, NY, EEUU). Las células recolectadas se transplantaron utilizando la técnica descrita a continuación.

Recolección de tejidos e histología: El tejido se recolectó en diferentes momentos dependiendo del experimento. Todos los especímenes de vejiga y uretra se congelaron o se fijaron en formaldehído tamponado al 10%, dependiendo de las necesidades del ensayo. El área alrededor de cada sitio de inyección se estudió al microscopio, se tiñó para el gen indicador LacZ y para la inmunohistoquímica, y se fotografió. Se realizaron los ensayos

apropiadas para el gen indicador LacZ y la expresión de genes del factor del crecimiento de fibroblastos.

Tinción de LacZ mediante técnicas histoquímicas: Se tiñeron secciones de criostato de los tejidos inyectados y control para determinar la expresión de LacZ como sigue. Las secciones primero se fijaron con glutaraldehído al 1,5% (Sigma) durante un minuto, se enjuagaron dos veces en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y después se incubaron en sustrato X-gal (5-bromo-cloro-3-indolil-β-D-galactósido 0,4 mg/ml (Boehringer-Mannheim, Indianápolis, IN, EEUU), MgCl₂ 1 mM, K₄Fe(CH₃)₆ 5 mM/K₃Fe(CN)₆ 5 mM en PBS) durante la noche a 37°C.

Ensayo para la actividad β-galactosidasa: Esta técnica proporciona una mejor cuantificación y comparación del nivel de expresión del transgén en células infectadas, así como en tejidos inyectados (por ejemplo, músculo, vejiga, uretra). El músculo inyectado se congeló en nitrógeno líquido y se homogeneizó en Tris-HCl 0,25 M (pH 7,8), y el homogeneizado se centrifugó a 3.500 x g durante 5 min. El homogeneizado muscular se disgregó mediante 3 ciclos de congelación/descongelación, y el sobrenadante se recogió mediante centrifugación (12.000 x g/5 min a 4°C) y se trasladó a un tubo de microcentrífuga limpio. Después se mezclaron 30 μl de este extracto con 66 μl de 1x o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido; ONPG (ONPG 4 mg/ml en fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,5), 3 μl de 100x disolución de Mg (MgCl₂ 0,1 M, β-mercaptoetanol 4,5 M), 201 μl de fosfato de sodio 0,1 M (41 ml de Na₂HPO₄·2H₂O 0,2 M, 9 ml de NaH₂PO₄·2H₂O 0,2 M, y 50 ml de H₂O) y después se incubó a 37°C durante 30 minutos, o hasta que se produjo un color ligeramente amarillo. Por último, la reacción se detuvo añadiendo 500 μl de Na₂CO₃ 1 M y se leyó la densidad óptica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm. Se extrapoló el nivel de actividad β-galactosidasa (nº de unidades/muestra) en una curva de calibración que convierte la densidad óptica a 420 nm en la concentración de enzima β-galactosidasa.

Determinación de la persistencia de la inyección de mioblastos: Se incubaron mioblastos con FLM y se transdujeron con adenovirus que portan el gen indicador de β-galactosidasa. Cada matraz de 500.000 células se tripsinizó utilizando tripsina al 0,5%-EDTA, se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos, y se resuspendió en 100 μl de medio. La disolución de un matraz se inyectó en la uretra o en la vejiga de los animales. Se inyectaron 25 μl de una disolución de células del músculo infectadas (1 x 10⁶ células) en la uretra utilizando una jeringa Hamilton.

A los diversos intervalos de sacrificio se retiraron la uretra y la vejiga. Después de los estudios de contractilidad, el tejido se congeló de forma instantánea utilizando 2-metilbutano preenfriado en nitrógeno líquido. El análisis de las secciones incluyó la tinción con hematoxilina-eosina; la tinción con X-gal; una inmunohistoquímica de desmina y la localización de las FLM. A partir de estos análisis se determinó el emplazamiento y la viabilidad de las células inyectadas. Además, utilizando diferentes marcadores miogénicos, tales como desmina y las cadenas pesadas de miosina, pudo determinarse si se había producido la fusión de los mioblastos con las estructuras internas de la articulación. Las cadenas pesadas de desmina y miosina se ensayaron para demostrar que las células derivadas del músculo portan el gen indicador y que la proteína indicadora, por ejemplo, LacZ, se estaba expresando. Mediante la colocalización del gen indicador LacZ con los genes que codifican proteínas estructurales musculares (por ejemplo, desmina y las cadenas pesadas de miosina), puede determinarse que la expresión de LacZ es el resultado de la fusión de las células inyectadas. Las cadenas pesadas de miosina sólo se expresan en células musculares en diferenciación (es decir, miotubos y miofibras).

La comparación estadística de la eficacia de la fusión de los mioblastos en los cultivos primarios se realizó contando el número de miofibras y mioblastos transducidos en la uretra. Además, utilizando el ensayo de ONPG, pudieron realizarse comparaciones estadísticas en cada intervalo de tiempo del nivel de expresión de β-galactosidasa mediado por la inyección de mioblastos transducidos. También se pudo determinar el número de miofibras y mioblastos transducidos que disminuye a lo largo del tiempo en la uretra y la vejiga inyectadas.

Inmunohistoquímica de iNOS: Se recolectó tejido y se fijó según se describe para la tinción de β-galactosidasa. Las secciones se montaron sobre portaobjetos revestidos con gelatina. Las peroxidases endógenas se inactivaron con H₂O₂ al 0,5% en MeOH absoluto durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con anti-iNOS (anticuerpo monoclonal de ratón, Transduction Laboratory) en suero de cabra normal (1:50). Se incubó anticuerpo anti-ratón biotinilado (de cabra, Kirkengaard-Perry) durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de una incubación con estreptavidina-peroxidasa de rábano durante 30 minutos. Los portaobjetos se revelaron mediante la adición de reactivo de diaminobenzidina (1 mg/ml)/peróxido de hidrógeno (al 0,03%) y se dejó que se revelaran durante 3 a 5 minutos.

Inmunotinción de NOS de los mioblastos: Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos y se permeabilizaron con metanol frío (-20°C) durante 10 minutos. Se empleó albúmina de suero bovino al 1% en PBS para bloquear las células y diluir los reactivos. El anticuerpo anti-iNOS diluido (dilución 1:250, anticuerpo policlonal de conejo, Santa Cruz) se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. El anticuerpo anti-ratón biotinilado (de cabra, Kirkengaard-Perry) se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de una incubación con estreptavidina-cy3 (estreptavidina unida a un marcador fluorescente rojo) durante 30 minutos. Los pocillos se estudiaron al microscopio. Además, se empleó selectivamente un anticuerpo antiproteína de adenovirus (Santa Cruz) para confirmar que los mioblastos habían sido transducidos con el vector adenovírico apropiado.

Medición del nitrito (NO₂): Las células se trasladaron a placas de 24 pocillos. Después de 24 horas, el medio

celular se reemplazó por medio solo o medio que contenía H4B (100 μ M; Sigma). Se cuantificó el NO_2^- acumulado en los sobrenadantes empleando la reacción de Griss (L.C. Green *et al.*, 1982, *J. Analyt. Biochem.*, 126:131-138) utilizando nitrato de sodio como patrón.

5 **Determinación de la formación de óxido nítrico (NO):** Se midió la formación de NO y se comparó en la vejiga y en la uretra de animales tratados con iNOS frente a animales tratados de forma simulada. Se calculó la formación de NO comparando el contenido en los tejidos de su producto estable de la oxidación, el nitrito, en las tiras estimuladas y no estimuladas. El contenido en nitrito de los tejidos se midió utilizando una técnica colorimétrica previamente descrita (L.J. Ignarro *et al.*, 1987, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 170: 843-850). Las muestras de tejido pesadas se colocaron en un tubo de vidrio y se descongelaron en 0,5 ml de metanol enfriado en hielo. El tejido después se
10 homogeneizó utilizando una mano de mortero de vidrio. El homogeneizado se dejó en reposo durante 18 horas a 4°C para asegurar la extracción completa del nitrito. Las muestras entonces se colocaron en una centrifuga refrigerada a 4°C y se centrifugaron a 15.000 x g durante 15 minutos. Se mezcló una parte alícuota (0,3 ml) de cada muestra con 0,4 ml de ácido sulfanílico al 1% en HCl 0,4 M. Después de 10 min, se añadieron 0,3 ml de N-(1-naftil)etilendiamina al 1% en metanol y se midió la absorbancia del complejo rosa resultante en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 548 nm. La concentración de nitrito se interpoló en una línea patrón construida realizando un ensayo idéntico utilizando patrones de nitrito de sodio en el intervalo de 0,5-5 μ M, junto con blancos de metanol.

15 **Ensayo de la actividad NOS:** Se midió la actividad NOS y se comparó en la vejiga y en la uretra de animales tratados con iNOS frente a animales tratados de forma simulada controlando la conversión de [^3H]-L-arginina a [^3H]-L-citrulina, según se describe en A.L. Burnett, 1995, *Urology*, 45:1071-1083; D.S. Bredt y S.H. Snyder, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:682-685).
20

Brevemente, los tejidos se homogeneizaron en tampón de homogeneización enfriado en hielo. Los ensayos enzimáticos contenían 25 μ l de sobrenadante de tejidos y 100 μ l de [^3H]-L-arginina 1 μ Ci/ml, NADPH 1,2 mM, y CaCl_2 0,7 mM. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, los ensayos se terminaron mediante la adición de 3 ml de Hepes 20 mM (pH 5,5) con EDTA 2 mM. La mezcla completa se aplicó a columnas de 0,5 ml de resina de intercambio catiónico Dowex-50W (forma Na^+) para eliminar la [^3H]-L-arginina sin reaccionar. Se cuantificó la [^3H]-L-citrulina en el eluato de la columna mediante espectroscopía de centelleo líquido. La tasa recuperación de la [^3H]-L-citrulina de las columnas se midió en todos los tejidos preincubando cada sobrenadante de
25 tejido con una concentración conocida de [^3H]-L-citrulina y después midiendo la [^3H]-L-citrulina en cada eluato de las columnas. También se realizaron estudios de saturación de columna para asegurarse de que toda la [^3H]-L-arginina se haya mantenido dentro de la columna. También se realizaron otros ensayos en presencia de un exceso de L-nitroarginina metil éster (L-NAME), un inhibidor competitivo de NOS, para verificar la especificidad del ensayo para la producción de [^3H]-L-citrulina para la catálisis de NOS.
30

Se controlaron las variaciones entre ensayos mediante la estandarización de las mediciones de la actividad NOS en tejidos frente a la actividad medida en el cerebelo de rata rico en NOS que se analizó en paralelo para cada ensayo.
35 El nivel de citrulina se expresa como picomoles por mg de tejido por minuto.

Aislamiento del ADN y análisis de la transferencia Northern: Se aisló el ARN total celular de animales no infectados, BacglacZ y tratados con iNOS humana utilizando ARN-zol B tal como se ha descrito previamente (P. Chomczynski y N. Sacchi, 1987, *Analytical Biochemistry*, 162:156-159). Partes alícuotas (20 mg) de ARN fueron sometidas a electroforesis sobre un gel de agarosa al 0,9% y se transfirieron en GeneScreen (DuPont-NEN, Boston, MA). Después de una prehibridación, las membranas se hibridaron con una sonda de ADN (D.A. Geller *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:522-526; D.A. Geller *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:3491-3495). Un fragmento de ADNc de iNOS humana de 2,3 Kb actuó como sonda de iNOS, mientras que un fragmento de ADNc de cNOS endotelial (ecNOS) humana de 4,1 Kb actuó como sonda de ecNOS. Un ARNr 18S actuó como control para la carga de ARN relativa.
40

45 **Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR):** Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C. El ARN celular total se extrajo de las muestras utilizando el método de P. Chomczynski y N. Sacchi, 1987, *Analytical Biochemistry*, 162:156-159. El ARN total se sometió a una síntesis de la primera hebra del ADNc utilizando cebadores oligonucleotídicos (dT) y transcriptasa inversa M-MLV (E.S. Kawasaki, *PCR Protocols: a guide to methods and applications*, eds. MA Innis, D.H. Gelfang, J.J. Sninsky, y T.J. White, Academic Press, Nueva York. pp. 22-27, 1990). Se diseñaron cebadores para amplificar iNOS con la ayuda de un programa de diseño de cebadores de PCR, PCR Plan (Intelligenetics, Mountain View, CA). La secuencia del cebador oligonucleotídico-5' de iNOS (18 pb) utilizada era 5'-AGGACATCCTGCGGCAGC-3' (SEQ ID NO:1) (E. Tzeng *et al.*, 1996, *Mol. Med.*, 2 (2):211-225) que abarca las pares de bases 3426 a 3444 de la secuencia de ADNc de iNOS humana (D.A. Geller *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:3491-3495). La secuencia del cebador oligonucleotídico-3' de iNOS (18 pb) era 5'-GCTT-TAACCCTCTCTGTA-3' (SEQ ID NO:2) (E. Tzeng *et al.*, 1996, *Mol. Med.*, 2(2):211-225) que abarca las pares de bases 3724 a 3741 de la secuencia de ADNc de iNOS humana (D.A. Geller *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:3491-3495). Se confirmó la identidad del fragmento de ADNc amplificado obtenido a partir de la reacción de RT-PCR con los cebadores de iNOS (aproximadamente 316 pb) utilizando un análisis de enzimas de restricción.
50
55

60 Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: una desnaturalización a 94°C durante 1 min; una hibridación a

57°C durante 1 min; una polimerización a 72°C durante 2 min. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Perkin Elmer 480 utilizando diferente número de ciclos para detectar un intervalo lineal de ARN de entrada. Se concluyó que el número óptimo de ciclos era de 30 ciclos. Macrófagos peritoneales de rata inducidos con tioglicolato y células RAW (línea celular de macrófagos RAW 264.7) estimuladas *in vitro* con LPS actuaron como controles positivos para el ARNm de iNOS. El control negativo para cada conjunto de reacciones de PCR contenía agua en lugar de molde de ADN. El producto de la PCR (20% del volumen de la reacción) de la RT-PCR cualitativa se separó mediante electroforesis sobre un gel de agarosa al 2% y se tiñó con bromuro de etidio.

Para la RT-PCR semicuantitativa (E.S. Kawasaki, Amplification of RNA. PCR Protocols: A guide to methods and applications, eds. M.A. Innis, D.H. Gelfang, J.J. Sninsky y T.J. White, Academic Press, Nueva York, pp. 22-27, 1990) se empleó un cebador-5' marcado en su extremo con ³²P. Se separaron 15 µl de la reacción de PCR sobre un gel de poliacrilamida al 10%. Después de secar el gel y exponerlo a un pantalla PhosphorImager (Molecular Dynamics PhosphorImager, Sunnyvale, CA), se determinó la radiactividad relativa de las bandas mediante integración de volumen utilizando una densitometría de arrido bde láser. Cada gel contiene el mismo control positivo que permite la normalización de las muestras y la comparación entre geles.

Ensayo de formación de hueso extraesquelético *in vivo*

En estos experimentos se empleó un vector retroviral que transporta la expresión del gen de la β-galactosidasa (rv-lacZ) y un adenovirus modificado para que exprese el gen BMP-2 (Adv-BMP-2). El plásmido BMP2-125 se digirió con Sal I, y se aisló el fragmento de 1237 pb que contiene el ADNc completo para la BMP-2 humana. El ADNc de BMP-2 después se insertó en el sitio Sal I del plásmido pAd.lox de modo que se obtuvo un sitio de inicio de la traducción mediante la cotransfección de pAd.lox con ADN vírico de psi-5 en células CRE-8 tal como ha sido previamente descrito por S. Hardy *et al.*, 1997, J. Virol., 71: 1842-1849.

Se transdujeron células mdx pp6 primarias con rv-lacZ como un método para controlar el destino *in vivo* de estas células. Se cultivaron 1×10^6 células en un matraz T-75. El medio de proliferación (medio F10/HAM que contenía suero bovino feral al 20%) se eliminó mediante lavado con enjuagues en serie de disolución salina equilibrada de Hank (HBSS, Gibco BRL). Se incubaron 3 mililitros de la suspensión de rv-lacZ, a una concentración de aproximadamente 5×10^6 , y 6 µl de polibreno diluido con 2 ml de HBSS, con las células durante 6 a 8 horas a 37°C. Después se añadió medio de proliferación a las células, y se dejó que las células se recuperasen durante un periodo de 24 horas antes de la infección con Adv-BMP. Después del periodo de 24 horas, estas células de nuevo se enjuagaron con HBSS y se transdujeron con Adv-BMP a una multiplicidad de infección (MOI) de 50. Las células se incubaron con la suspensión vírica durante 4-6 horas, tras lo cual se añadió el medio de proliferación sin la eliminación de las partículas víricas.

Antes de la inyección, las células se enjuagaron múltiples veces con HBSS y se contaron. Se realizaron inyecciones de $3,0 \times 10^5$ células suspendidas en 20 µl de HBSS en el músculo de la pata trasera de ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID). La suspensión celular entonces se inyectó con una aguja de calibre 30 con una jeringa hermética a gases en el tríceps sural expuesto. Los animales se sacrificaron a las 2, 3, 4 y 5 semanas después de la inyección.

Se analizó la formación de hueso ectópico en la pata inyectada mediante una revisión bruta, una radiografía, y una histología convencional. Las patas de los ratones sacrificados se radiografiaron con una máquina de radiografía dental. Las patas después se congelaron de forma instantánea en tampón de 2-metilbutano preenfriado en nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se cortaron en secciones de 10-12 µm utilizando un criostato (Fisher Scientific). Después de una fijación con glutaraldehído (al 1%), las secciones de músculo se incubaron con el sustrato de X-gal durante 1-3 horas para revelar la actividad β-galactosidasa. Otros análisis histológicos incluyen tinción de von Kossa, de hematoxilina y de eosina. Todos los procedimientos con animales siguieron las líneas directrices y se realizaron con la aprobación del Children's Hospital and the University of Pittsburgh Animal Care Committee según el protocolo 1/98.

Implantaciones con cámara de difusión

Se transdujeron *in vitro* células pp6 primarias con Adv-BMP-2 utilizando una MOI de 50. Las células se tripsinizaron, se contaron y se suspendieron 1×10^6 células en medio de proliferación. Bajo condiciones estériles, las células se cargaron en dispositivos de inmunoaislamiento Theracyte de 5 microlitros (Device Engineering Group, Baxter Healthcare, Round Lake, IL) utilizando una jeringa hermética a gases y agujas de acero inoxidable con punta roma (J. Brauker *et al.*, 1998, Human Gene Ther., 9:879-888). El puerto de carga se selló con adhesivo de silicona estéril (Dow Corning, Midland, MI). El dispositivo Theracyte consiste en una membrana de bicapa de politetrafluoroetileno (PTFE) con un tamaño de poro de la membrana externa de 5 micrómetros y un tamaño de poro de la membrana interna de 0,4 micrómetros. La membrana de bicapa de PTFE impide que las células del hospedante entren en el dispositivo y que las células implantadas salgan del dispositivo. Los dispositivos se implantan de modo subcutáneo en ratones SCID bajo anestesia de quetamina y xilazina. Los ratones se sacrificaron tres semanas después utilizando anestesia de metoxiflurano y dislocación cervical. Los dispositivos se congelaron de forma instantánea en 2-metilbutano preenfriado con nitrógeno líquido. Se realizaron secciones con un espesor de 10 micrómetros utilizando un criostato (Microm, HM 505 E) y se tiñeron con hematoxilina y eosina, con y sin tinción de von Kossa.

Ejemplo 2

Se realizaron experimentos utilizando inyecciones de mioblastos en la pared uretral como tratamiento para la incontinencia urinaria de esfuerzo.

5 En estos experimentos, se cultivaron mioblastos de la línea celular de mioblastos GH8 (disponible en el depósito de the American Type Cell Culture) transducidas con un vector adenovírico que porta un gen indicador que codifica la β-galactosidasa (adenovirus de primera generación con E1-E3 deletado) y se inyectaron en la pared uretral proximal de ratas S.D. hembra.

10 Además, las células se incubaron con microesferas de látex fluorescentes (FLM) para poder visualizar el destino de las células inyectadas (véase el ejemplo 1). Las células marcadas con FLM transducidas se inyectaron en ratas S.D. hembra adultas (n = 20). Se realizó una incisión en la línea media y se inyectaron los mioblastos en la pared uretral proximal en dos sitios con una microjeringa Hamilton de 10 µl. La concentración de mioblastos varía de 1,33 x 10⁵ a 1 x 10⁶. El tejido se recolectó de 2-4 días después de la inyección y se congeló de forma instantánea en nitrógeno líquido. El tejido después se cortó en secciones, se tiñó con el sustrato de x-gal y se contratiñó con hematoxilina y eosina (H y E). Se tomaron fotografías de los portaobjetos con microscopía óptica y de fluorescencia (figuras 1A-1I).

15 La inyección se realizó en la uretra de los animales control y también en animales que tenían una lesión uretral utilizando una sonda de aluminio de 8 mm de diámetro enfriada en hielo seco y después colocándola en la uretra ventral durante 10 segundos (véase el ejemplo 1). Después de 2, 4 y 7 días, los animales con y sin lesión uretral se eutanizaron, y la porción de la uretra que contiene los mioblastos injertados, así como la uretra y la vejiga normales adyacentes, se retiraron y se sometieron a estudios funcionales y de microscopía. Vienticuatro horas antes del sacrificio, se realizó un análisis del patrón de micción de los animales en una jaula metabólica para determina el cambio en el volumen evacuado y en la frecuencia de evacuación (véase el ejemplo 1).

Los animales con y sin uretras con mioblastos injertados también se sometieron a un análisis del patrón de micción de 24 horas en una jaula metabólica utilizando los métodos descritos por M.B. Chancellor *et al.*, 1994, J. Urol., 151:250-254.

25 Inmediatamente antes del sacrificio, los animales se sometieron a un estudio urodinámico de presión uretral (cistometrograma (CMG)) bajo anestesia de uretano utilizando catéteres urodinámicos diseñados especialmente para permitir la medición simultánea, pero aislada, de la presión de la vejiga y uretral (H. Kakizaki *et al.*, 1997, Am. J. Phy., 272:R1647-1656).

30 Se midió la presión de perfusión uretral y la presión de la vejiga isovolumétrica con catéteres insertados a través de la cúpula de la vejiga. Estos parámetros se compararon en animales inyectados con mioblastos y animales con inyección simulada, con y sin lesiones por criosonda. Para estas evaluaciones se emplearon catéteres urodinámicos especialmente diseñados para permitir la medición simultánea, pero aislada, de la presión de la vejiga y uretral. El montaje del catéter se introdujo en el cuello de la vejiga para bloquear el paso de fluidos entre la vejiga y la uretra sin afectar el suministro nervioso a los órganos, según se describe en el ejemplo 1. La uretra externa no se cateterizó. 35 Las respuestas se estudiaron a una velocidad de infusión de disolución salina uretral de 0,075 ml/min.

Después de los experimentos urodinámicos se recogieron tiras uretrales y se colocaron en cámaras de baño rellenas con disolución de Krebs para evaluar la contractilidad. Se evaluaron los animales control e inyectados de forma simulada. Se realizará una tinción histoquímica para lacZ y unos análisis de microscopía fluorescente para evaluar y cuantificar la supervivencia y la diferenciación de los mioblastos y para evaluar la producción de miotubos. 40 Los experimentos a largo plazo utilizando inyecciones de mioblastos primarios autólogos en la uretra descritos en la presente se realizaron durante 30-60 días.

Los resultados de los anteriores análisis se presentan en la tabla 1.

Tabla 1

Inyección uretral de mioblastos frente al control	Control (n = 12)	Mioblastos (n = 4)
Patrón de micción		
Volumen urinario a las 24 h (ml)	21,8 ± 3,8	19,8 ± 4,2
Frecuencia urinaria/24 h	19 ± 5	11 ± 3
Volumen medio de micción (ml)	1,0 ± 0,4	1,8 ± 0,9*
Estudios uretrales		
Presión uretral de línea de base (mm Hg)	28,3 ± 3,1	36,4 ± 5,5**
Presión de contracción de la vejiga (mm Hg)	78,3 ± 11,2	72,8 ± 23,3
*: p < 0,01; **: p < 0,5		

Estos experimentos indican un gran número de células en la pared uretral que expresan β -galactosidasa y que contienen FLM bajo microscopía de fluorescencia. También se observaron muchas miofibras regenerativas que expresan β -galactosidasa en la pared uretral. Los mioblastos primarios inyectados en ratones SCID sobrevivieron durante más de 30 días. Se descubrió que los animales tratados con inyecciones de mioblastos tenían mayor presión uretral. En los animales con uretras con lesiones de criosonda, la inyección de mioblastos dio como resultado una mayor contractilidad.

Los resultados de los experimentos demuestran la viabilidad y la supervivencia de inyecciones de mioblastos en la pared uretral. A la vista de los resultados, pueden utilizarse con éxito mioblastos autólogos (es decir, mioblastos recolectados y cultivados a partir de un paciente concreto con incontinencia urinaria de esfuerzo) como agentes no alérgicos tras su inyección para rellenar la pared uretral, potenciando así la coaptación y mejorando el músculo del esfínter urinario. A este respecto, se han aislado mioblastos humanos a partir de una biopsia de músculo y se han cultivado hasta una concentración mayor que 1×10^7 .

Ejemplo 3

Se realizaron experimentos para demostrar la viabilidad de inyecciones de mioblastos en la pared de la vejiga para mejorar la contractilidad del detrusor. Para estos experimentos se utilizó una línea celular de mioblastos transducida con un vector adenovirico que porta un gen indicador de β -galactosidasa, según se describió anteriormente en la presente. Las células se incubaron con microesferas de látex fluorescentes (FLM) para poder determinar el destino de las células inyectadas. Las células se inyectaron en ratas S.D. macho y hembra adultas ($n = 18$). Los mioblastos se inyectaron en la cúpula de la vejiga y en las paredes laterales derecha e izquierda cerca de la cúpula con una microjeringa Hamilton de 10 μ l. La concentración de mioblastos varía de $1,33 \times 10^5$ a 1×10^6 células. El tejido se recolectó después de 2-5 días, se cortó en secciones y se ensayó para la expresión de β -galactosidasa. Para los experimentos de terapia génica, los mioblastos se transdujeron con un adenovirus que contenía el gen de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) humana a una multiplicidad de infección de 50 (MOI = 50), se inyectaron en la vejiga y se estudiaron después de 2 a 7 días. Los resultados de esos experimentos demuestran que en la pared de la vejiga había un gran número de células que expresaban β -galactosidasa y que contenían FLM, según se determina mediante microscopía de fluorescencia. También se observaron muchas miofibras regenerativas que expresan β -galactosidasa en la pared de la vejiga. Utilizando un microdetector porfirínico para medir el NO, se detectó un aumento en la liberación basal de NO (20 nM) desde el área de la pared de la vejiga inyectada con mioblastos que han sido transfectados con el gen iNOS.

Estos estudios demuestran la supervivencia de los mioblastos y la expresión de genes extraños en mioblastos después de su inyección en la pared de la vejiga. Así, se ha demostrado que la inyección de mioblastos y la terapia génica mediada por mioblastos son útiles para modular la contractilidad del detrusor y para contrarrestar la función hiperactiva de la vejiga.

Se realizó una criolesión en la pared de la vejiga o uretral en un modelo de rata (S.D.) según se describe en el ejemplo 1. Dos animales se sometieron a una criolesión y a una lesión simulada con y sin inyección de mioblastos. Cuatro días después de la criolesión y de la inyección de mioblastos se realizó una evaluación de la contractilidad. Se observó un daño histológico significativo en la pared de la vejiga y uretral después de la criolesión (figura 2). La contractilidad del músculo frente a una estimulación con un campo eléctrico desapareció después de la criolesión, comparado con la ausencia de cambios en los animales lesionados de forma simulada.

Se montaron tiras de vejiga o uretrales en baños de órganos de 5 ml y se estimularon eléctricamente con 100 V, 0,25 ms a diversas frecuencias. Las tiras de vejiga y uretrales criodañadas mostraron poca o ninguna actividad contráctil frente a la estimulación con un campo eléctrico, frente a la activación indirecta del músculo liso a través de la estimulación del receptor M3 con carbacol, o frente a la activación directa del músculo liso con una cantidad alta de K^+ , comparado con los controles no dañados. Después del tratamiento con mioblastos de la vejiga o la uretra criodañada se produjo una significativa recuperación de la actividad contráctil frente a la estimulación eléctrica.

Los resultados se presentan en la tabla 2.

Tabla 2

Patrón de micción de criolesiones en la vejiga frente al control	Control (n = 12)	Criolesión (n = 4)
Volumen urinario a las 24 h (ml)	21,8 \pm 3,8	19,8 \pm 4,2
Frecuencia urinaria/24 h	19 \pm 5	11 \pm 3
Volumen medio de micción (ml)	1,0 \pm 0,4	1,8 \pm 0,9*
*: p < 0,01		

Estos experimentos demuestran claramente una alteración en la función de la vejiga y uretral con el modelo de criolesión.

Ejemplo 4

Se realizaron experimentos para evaluar la supervivencia a largo plazo de mioblastos transducidos autólogos en la vejiga y en la uretra.

5 Estos experimentos se realizaron en ratones que tienen una grave inmunodeficiencia combinada, es decir, el modelo de SCID de ratón, y después en ratones no inmunodeficientes. Se recolectaron mioblastos y células derivadas del músculo autólogos y se cultivaron en una cantidad suficiente para poder realizar varias inyecciones en la vejiga.

10 Los cultivos de mioblastos primarios se cultivaron durante 3 días en un medio de proliferación suplementado para que contuviese DMEM y suero bovino fetal al 15% (Gibco-BRL). Los mioblastos se infectaron con un vector adenovirico. También se añadieron microesferas de látex fluorescentes (0,5 μm) a los mioblastos cultivados a una dilución de 1:1000 para poder seguir el destino de los mioblastos inyectados *in vivo* (A. Satoh *et al.*, 1993, J. Histochem. Cytochem., 41:1579-1582; S. Floyd *et al.*, 1997, Basic Appl. Myol., 7(3 y 4)). A las 48 horas después de la infección, los mioblastos se desprendieron del recipiente de cultivo utilizando tripsina (al 0,25%), se centrifugaron durante 5 minutos a 3.500 rpm, y el sedimento de mioblastos se reconstituyó con 25 ml de disolución salina equilibrada de Hank (HBSS, Gibco-BRL, NY, EEUU).

15 La disolución de mioblastos transducida se inyectó en la pared del detrusor en el lado izquierdo, con el mismo número de partículas víricas inyectadas en el lado contralateral del animal. Los ratones inyectados se sacrificaron a los 4 días después de la inyección. Se retiraron las vejigas de los animales inyectados y se congelaron de forma instantánea en isopentano preenfriado en nitrógeno líquido. El músculo después se cortó en su totalidad en secciones con un espesor de 10 μm con un criostato y se preparó para la tinción.

20 La misma disolución vírica (i) se inyectó directamente por vía intramuscular, o (ii) se utilizó para transducir mioblastos *in vitro* antes de la transferencia de genes *ex vivo* al mismo animal. Se inyectaron ratones normales recién nacidos (de dos a cinco días de edad) y adultos (dos meses de edad) con mioblastos isogénicos (en el lado derecho de la vejiga con la misma cantidad de partículas víricas que se empleó para infectar los mioblastos que fueron inyectados en el lado izquierdo de la vejiga) y se sacrificaron a los tres días después de la inyección. Se evaluaron aproximadamente 8 animales en cada grupo. Los músculos inyectados se evaluaron para la actividad β -galactosidasa y para la tinción de LacZ y se controló la eficacia del transporte de genes. Después de 2, 4, 7, 14, 30, 60 y 90 días, los animales se eutanizaron, y se retiró y se analizó la porción de la vejiga que contenía los mioblastos injertados, así como la vejiga normal adyacente.

30 El nivel de expresión del transgén se comparó estadísticamente entre las estrategias de transferencia de genes directa y *ex vivo* utilizando adenovirus. Las vejigas inyectadas con mioblastos isogénicos se cortaron longitudinalmente para determinar la presencia de miofibras regenerativas. Se realizó una tinción inmunohistológica para lacZ y un análisis de microscopía de fluorescencia para evaluar y cuantificar la supervivencia y la diferenciación de mioblastos y para evaluar la producción de miofibras. La localización de las miofibras transducidas que contienen una distribución no uniforme de FLM permite la determinación de la presencia de miofibras en mosaico. Utilizando una tinción inmunohistológica para LacZ y el análisis de FLM se determinó que existía supervivencia y diferenciación de los mioblastos inyectados en miofibras.

40 Los resultados de estos análisis demuestran que las células de mioblastos autólogos pueden caracterizarse, cultivarse y conservarse. Además, se ha demostrado que los mioblastos autólogos se injertan con éxito en la vejiga y la uretra sin una inmunorreactividad significativa durante al menos 90 días hasta 6 meses. De forma más específica, la inyección de células precursoras derivadas del músculo primarias en la vejiga puede lograr una supervivencia a largo plazo y una persistencia mayor que 50% a los 6 meses. Además, se demostró el mantenimiento de un efecto de relleno persistente en la pared uretral. Este mantenimiento es necesario para el tratamiento de la incontinencia urinaria de esfuerzo (figuras 15A-15C).

Ejemplo 5

45 Se realizaron otros experimentos, según se describe en este ejemplo, para evaluar y mejorar la supervivencia de los mioblastos inyectados después de la inyección. Para realizar esta evaluación, se inyectaron en el músculo de ratones mdx adultos diferentes líneas celulares de mioblastos mdx (véase a continuación), así como mioblastos primarios, a diferentes purezas tales como se describe a continuación. Los mioblastos se transdujeron con adenovirus o se transfectaron con un plásmido que expresa β -galactosidasa, y se evaluó el destino temprano de las células inyectadas después de la inyección.

Se construyó el plásmido que contiene el gen que codifica la β -galactosidasa a partir del esqueleto del plásmido pBluescript, en el que el gen indicador de β -galactosidasa está controlado por el promotor de citomegalovirus humano (HCMV), y el gen de resistencia a neomicina está controlado por el promotor PGL (J.A. Wolff *et al.*, 1990, Science, 247:1465-1468; S. Jiao *et al.*, 1992, Human Gene Therapy, 3:21-33).

55 Se ensayaron diferentes poblaciones de mioblastos primarios que se habían purificado mediante precultivo (ejemplo 1) y que tienen un porcentaje de mioblastos que varía de aproximadamente 10% al 90%. Por último, también se

emplearon mioblastos mdx primarios obtenidos a partir de miofibras aisladas y se comparó entre los grupos la supervivencia de las células inyectadas (véase J. Huard *et al.*, 1994, *Human Gene Ther.*, 5:949-958; y J. Huard *et al.*, 1994, *J. Clin. Invest.*, 93:586-599).

5 Las diferentes poblaciones de células de mioblastos precultivadas se infectaron con adenovirus que expresan β -galactosidasa. El adenovirus, un adenovirus recombinante con E1-E3 deletado, fue suministrado amablemente por GeneVec Inc. (doctor I. Kovcsdi), tiene el gen indicador de β -galactosidasa bajo el control del promotor de citomegalovirus humano (HCMV), seguido del t-intrón de SV40 y una señal de poliadenilación (poliA). Las células transducidas con adenovirus entonces se transplantaron al músculo de la pata trasera (gastrocnemio y sóleo) de ratones mdx y se ensayó su supervivencia después de la implantación.

10 Los mioblastos se aislaron a partir de miofibras viables individuales. Se prepararon fibras de músculo individuales a partir del músculo extensor largo de los dedos (EDL) mediante disgregación enzimática en colagenasa de tipo 1 al 0,2% (Sigma, St. Louis, MO, EEUU), tal como se ha descrito previamente (D.J. Rosenblatt *et al.*, 1995, *In Vitro Dev. Biol.* 31:773-779; W.G. Feero *et al.*, 1997, *Gene Ther.*, 4:371-380). Se emplearon fibras de músculo aisladas de ratones de 6 semanas de edad. Después del aislamiento de aproximadamente 200 miofibras por músculo, un
15 mínimo de 5-10 miofibras por pocillo se cultivaron en placas de 6 pocillos revestidas con Matrigel 1 mg/ml (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA, EEUU) en 2 ml de medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía suero de caballo al 10%, extracto de embrión de pollo al 1%, L-glutamina al 2% y penicilina/estreptomina al 1% (Gibco, BRL, Grand Island, NY, EEUU). Las placas se colocaron en un incubador a 37°C, 5% de CO₂ durante varios días. Las células que surgen de estas miofibras se hicieron crecer hasta que
20 alcanzaron la confluencia, se ensayaron para la expresión de desmina, se transdujeron con un adenovirus que transporta la expresión del gen indicador LacZ, y se ensayaron para la supervivencia de los mioblastos después de la implantación siguiendo el protocolo descrito a continuación.

Se empleó una línea celular mdx inmortalizada aislada a partir de un animal transgénico que porta un antígeno T de SV40 termolábil bajo el control de un promotor inducible (J.E. Morgan *et al.*, 1994, *Develop. Biology* 162:486-498).
25 La línea celular mdx inmortalizada prolifera indefinidamente bajo condiciones permisivas de 33°C con gamma-interferón (medio de proliferación: DMEM + FBS al 20%) y sufre una diferenciación normal a 37-39°C sin gamma-interferón (medio de fusión: DMEM + FBS al 2%). La línea celular de mioblastos se ensayó para la inmunorreactividad a la desmina y la capacidad de diferenciarse cuando se cultiva en un medio de fusión. Después, estas células se transdujeron con un adenovirus que transporta la expresión del gen indicador LacZ, y se analizó la
30 supervivencia de los mioblastos inyectados como se describe a continuación.

Los mioblastos se modificaron para que expresasen agentes antiinflamatorios. La línea celular de mioblastos mdx se empleó para la modificación genética de mioblastos que expresan sustancias antiinflamatorias. Los mioblastos se infectaron con un vector retroviral que porta el gen que codifica la proteína del antagonista del receptor de interleuquina-1 (IL-1 Ra) y un gen de resistencia a neomicina (G. Bandara *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10764-10768). Después de la infección, los mioblastos se seleccionaron utilizando neomicina (1000 μ g/ml de medio) para obtener casi 100% de células infectadas, debido a que las células no infectadas mueren cuando se someten a un tratamiento con neomicina.

Los mioblastos seleccionados primero se analizaron *in vitro* para su capacidad para expresar IL-1 Ra (80 ng/1 x 10⁶ células a las 48 horas después de la infección). Se descubrió que los mioblastos modificados eran capaces de diferenciarse en miotubos *in vitro* y de formar miofibras después de un trasplante intramuscular *in vivo*. Los
40 mioblastos modificados después se infectaron con un adenovirus que porta el gen indicador LacZ y se inyectaron en el músculo mdx. Se controló el destino temprano de las células inyectadas y se comparó con el de las células no modificadas utilizando el protocolo descrito a continuación.

Inmunohistoquímica para la desmina: Las diferentes poblaciones de mioblastos se fijaron con metanol a -20°C durante 1 minuto, seguido de 2 enjuagados en disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Los cultivos celulares se bloquearon con suero de caballo al 10% durante 1 hora y se incubaron con el primer anticuerpo (1/200 anticuerpo monoclonal de ratón anti-desmina, Sigma Co., St. Louis, MO, EEUU) durante 1 hora. Después de 3 enjuagados en PBS, las secciones se incubaron con un segundo anticuerpo (anticuerpo anti-ratón conjugado con Cy3, inmunofluorescencia, 1/200, Sigma Co., St. Louis, MO, EEUU). Después se visualizó la inmunotinción mediante
50 microscopía de fluorescencia y se calculó el número de células positivas a desmina y se comparó entre los diferentes grupos.

Se emplearon diferentes poblaciones de mioblastos para estos experimentos. Se inyectaron por vía percutánea de 0,5 a 1 x 10⁶ células en la porción media del músculo gastrocnemio para cada grupo experimental; los grupos experimentales que se compararon entre sí recibieron exactamente el mismo número de células. Mioblastos mdx primarios, mioblastos aislados de fibras musculares individuales, y cultivos de mioblastos mdx inmortalizados se transdujeron con un adenovirus que porta el gen indicador LacZ utilizando una multiplicidad de infección de 50 (MOI = 50). Cuarenta y ocho horas después de la transducción, los diferentes grupos de mioblastos transducidos se recolectaron mediante tripsinización (tripsina al 0,1%), se lavaron en disolución salina equilibrada de Hank (HBSS) y se inyectaron por vía intramuscular con una jeringa Drummond. En diferentes momentos después de la inyección
60 (0,5, 12, 24, 48 horas y 5 días), los animales se sacrificaron y los músculos inyectados se ensayaron para la

expresión de LacZ (histoquímica y ONPG). La expresión de β -galactosidasa obtenida a partir de los músculos inyectados se comparó con la del extracto de células transducidas antes del trasplante (0 horas después de la inyección). Se emplearon cinco ratones mdx/mdx C57BL10/J de dos meses de edad para cada grupo. Los animales experimentales se mantuvieron en the Rangos Research Center Animal Facility del Children's Hospital of Pittsburgh. Las políticas y los procedimientos en el laboratorio con los animales se desarrollaron de acuerdo con los detallados en la guía para el "Cuidado y uso de animales de laboratorio", publicada por the USA Department of Health and Human Services.

Tinción de LacZ mediante técnicas histoquímicas: Secciones obtenidas con un criostato de los músculos inyectados y control se tiñeron para la expresión de LacZ utilizando la técnica descrita como sigue: las secciones se fijaron con glutaraldehído al 1,5% (Sigma Co., St. Louis, MO, EEUU) durante un minuto y se enjuagaron dos veces en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubaron en sustrato de x-gal [5-bromo-cloro-3-indolil- β -D-galactósido 0,4 mg/ml (Boehringer-Mannheim, Indianápolis, IN, EEUU), $MgCl_2$ 1 mM, $K_4Fe(CH_6)$ 5 mM/ $K_3Fe(CN)_6$ 5 mM en PBS] durante la noche (37°C). Después de la histoquímica de LacZ, las secciones de músculo se contratiñeron con hematoxilina/eosina y se visualizaron mediante microscopía óptica (Nikon, microscopio Optiphot).

La actividad β -galactosidasa se ensayó para lograr una mejor cuantificación y la comparación del nivel de expresión del transgén en las células infectadas y en los músculos inyectados (J. Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 1.21-1.52). Las células o los músculos inyectados se congelaron en nitrógeno líquido y se homogeneizaron en Tris-HCl 0,25 M (pH 7,8), y los homogeneizados se centrifugaron a 3.500 x g durante 5 minutos. El homogeneizado de músculo se disgregó mediante 3 ciclos de congelación/descongelación, y el sobrenadante se centrifugó (12.000 x g/5 min a 4°C) y se trasladó a un tubo de microcentrífuga. Se mezclaron 30 μ l de este extracto con 66 μ l de OPNG 4 mg/ml (O-nitrofenil- β -D-galactopiranosido, Sigma Co.) disueltos en fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,5), 3 μ l de β -mercatotanol 4,5 M disueltos en $MgCl_2$ 0,1 M, y 201 μ l de fosfato de sodio 0,1 M. La mezcla después se incubó a 37°C durante 30 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 500 μ l de Na_2CO_3 1 M, y se leyó la densidad óptica sobre un espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm. El nivel de actividad β -galactosidasa (n° de unidades/muestra) se extrapoló en una curva de calibración que convierte la densidad óptica a 420 nm en la concentración de la enzima β -galactosidasa. El nivel de la enzima β -galactosidasa se comparó en los mioblastos no inyectados transducidos con el obtenido en el músculo inyectado a las 0,5, 12, 24 y 48 horas y 5 días después de la inyección.

Tinción inmunoquímica para las isoformas de cadena pesada de miosina (MyHC): Se empleó un anticuerpo monoclonal específico para las isoformas de cadena pesada de miosina lenta. El anticuerpo monoclonal anti-cadena pesada de miosina lenta (M 8421, Sigma Co., St. Louis, MO, EEUU) reacciona con la MyHC lenta del músculo esquelético de adultos. Se realizó una tinción con MYHC utilizando técnicas de inmunoperoxidasa indirectas. Se colocaron secciones de 10 μ m cortadas en serie con un criostato sobre portaobjetos de vidrio, se fijaron con acetona fría (-20°C) durante 1 minuto y se bloquearon con suero de caballo al 5% durante 1 hora. Las secciones se incubaron durante la noche a temperatura ambiente en una cámara húmeda con anticuerpos primarios diluidos 1:500 en PBS, pH 7,4, que contenían suero de caballo al 4%. Las secciones de músculo cortadas con criostato después se enjuagaron 3 veces con PBS y se incubaron con anticuerpos anti-ratón de oveja conjugados con peroxidasa de rábano (A7282, Sigma Co., St. Louis, MO, EEUU), y se diluyeron 1:100 en PBS durante 90 minutos. Después de tres enjuagados en PBS se determinó la actividad peroxidasa mediante una incubación con diaminobenzidina 1 mg/ml en PBS que contiene peróxido de hidrógeno al 0,01%. Después se realizó la reacción con peroxidasa y se detuvo por medio de enjuagados repetidos en PBS. Las secciones se montaron en GelMount (Biomedica, Corp., Foster City, CA) y se observaron bajo microscopía óptica (Nikon, microscopio Optiphot). Se realizó la colocalización de las fibras musculares que expresan LacZ y la cadena pesada de miosina lenta sobre las secciones de músculo en serie.

Análisis estadístico: Se calculó la media del nivel de transducción en diferentes momentos para cada grupo (n = 5) y se comparó a lo largo del tiempo mediante un análisis de la varianza de un factor (ANOVA; factorial del tipo de múltiples comparaciones) utilizando programas informáticos estadísticos (Stat View 512⁺, Brain Power, Calabasas, CA, EEUU).

En este ejemplo se demostró que las diferentes poblaciones de células derivadas del músculo primarias aisladas a partir del músculo gastrocnemio forman diferentes precultivos que contienen un porcentaje diferente de células positivas a desmina. Las diferentes poblaciones de células consisten en una mezcla de células derivadas del músculo que incluyen mioblastos, fibroblastos y adipocitos. Se descubrió que las poblaciones de células derivadas del músculo mostraban diferentes inmunoreactividades a la desmina, que varían entre 7% al 80% después del precultivo. Por ejemplo, el primer precultivo contiene 7% de células positivas a desmina, mientras que los precultivos secuenciales estaban enriquecidos en células positivas a desmina (es decir, PP n° 2 = 14%, PP n° 3 = 25%, PP n° 4 = 72%, PP n° 5 = 77%, y PP n° 6 = 80%).

Estas poblaciones celulares tienen una capacidad variable para diferenciarse en miotubos cuando se cultivan en medio de fusión. De hecho, el número de miotubos obtenidos en el precultivo n° 1 y el precultivo n° 3 fue muy bajo comparado con el obtenido en el precultivo n° 5 y el precultivo n° 6. Los resultados demuestran que las poblaciones de células derivadas del músculo con alto número de células positivas a desmina muestran una mejor capacidad de

diferenciarse en miotubos.

Se obtuvo 97% de células positivas a desmina a partir de una única miofibrila aislada del músculo extensor largo de los dedos (EDL). Además, la línea celular de mioblastos mdx, aislada a partir de un ratón transgénico que porta el antígeno T de SV40, era casi 100% positiva a desmina. Estas células también fueron capaces de diferenciarse en miotubos, lo cual demuestra el alto índice de miogenicidad de estos cultivos celulares.

Se ensayaron diferentes poblaciones de células derivadas del músculo aisladas y purificadas de ratones normales y mdx (distróficos) mediante la técnica del precultivo, para detectar la presencia de diversos marcadores. Se descubrió que una población de células derivadas del músculo tenía las siguientes características: aproximadamente 95% de positivas a desmina; aproximadamente 95% de positivas a BCL-2; aproximadamente 95% positivas a CD34; aproximadamente 95% de expresión de las isoformas de cadena pesada de miosina (MyHC); aproximadamente 30-60% de expresión de MyoD; aproximadamente 30-60% de expresión de miogenina; y menos de aproximadamente 10% de expresión de M-caderina, lo cual sugiere sus cualidades de células precursoras.

Las células derivadas del músculo obtenidas del precultivo nº 1 e inyectadas en el músculo gastrocnemio se perdieron rápidamente a las 48 horas después de la inyección: en el músculo inyectado sólo se midió 17% de la expresión del gen introducido presente en los mioblastos inyectados. Sin embargo, se obtuvo una mejora en la supervivencia de los mioblastos inyectados mediante el uso de células procedentes de posteriores precultivos para la inyección. De hecho, las células aisladas del precultivo nº 2 producen una pérdida de mioblastos del 55% a las 48 horas después de la inyección, las del precultivo nº 3 producen una pérdida de mioblastos del 12%, y las del precultivo nº 6 producen una ganancia del 124% comparado con el nivel de expresión del transgén LacZ presente en las células antes de la inyección y el trasplante (figuras 7A-7H). Estos resultados sugieren que se aislaron poblaciones de células derivadas del músculo durante el precultivo que mostraban una mejor tasa de supervivencia después del trasplante.

De manera sorprendente, la población pura de mioblastos obtenidos a partir de miofibrilas aisladas (fibras de mioblastos, Fmb), que muestra más de 95% de inmunorreactividad frente a la desmina, sufre una pérdida rápida después del trasplante de los mioblastos. De hecho, se observó una pérdida del 96% de los mioblastos inyectados a las 48 horas después del trasplante. De modo similar, la línea celular de mioblastos mdx (Línea celular) (figura 7D y 7H) fue rápidamente perdida después del trasplante: 93% del nivel de la expresión del transgén LacZ presente en el cultivo celular tras la implantación desapareció después de 2 días desde la inyección. Estos resultados demuestran que el alto porcentaje de células positivas a desmina presentes en la población de células derivadas del músculo en el precultivo nº 6 es sólo un factor para explicar la mejora en la supervivencia de las células después de la implantación.

Aunque se han aislado poblaciones de células derivadas del músculo que muestran una mejor supervivencia después de la inyección (PP nº 3, PP nº 6), todas las poblaciones celulares conducen a una disminución en la expresión del gen indicador entre los días 2 y 5 después de la inyección. Sin embargo, las células con una mejor tasa de supervivencia mantienen mejor la expresión del transgén en el día 5.

Se ha descubierto que todas las poblaciones de mioblastos tras la transducción adenovírica son capaces de transportar el gen indicador de β -galactosidasa al músculo esquelético a los 2 y 5 días después de la infección. Utilizando el mismo número de células, se observó que PP nº 6, y en menor grado PP nº 3, tienen una mejor transferencia de genes que la población de células derivadas del músculo aisladas en los precultivos nº 1 y nº 2. La capacidad de las células musculares purificadas para evitar la poca supervivencia de las células inyectadas puede explicar la mejor eficacia de la transferencia de genes en el músculo inyectado. Sin embargo, también se observó que PP nº 6 muestra una mejor capacidad para fusionarse con miofibrilas del hospedante comparado con las células derivadas del músculo aisladas en precultivos más tempranos. La línea celular de mioblastos (Línea celular) y el cultivo de mioblastos muy puro aislado a partir de miofibrilas (Fmb) también muestran una reducción en la transferencia de genes cuando se compara con las células derivadas del músculo aisladas en el precultivo nº 6, lo cual sugiere que la capacidad de las células para superar la poca supervivencia después de la inyección conduce a una mejora en la transferencia de genes hacia el músculo esquelético.

Después de la inyección de las células musculares, las células se fusionan para formar miotubos o se fusionan con mioblastos y fibras musculares del hospedante para formar miofibrilas en mosaico. Unas secciones cortadas con criostato realizadas en serie demuestran que los mioblastos transducidos obtenidos a partir de las miofibrilas aisladas se fusionan para formar miotubos y miofibrilas inmaduras que expresan las cadenas pesadas de miosina rápida, o se fusionan con miofibrilas del hospedante que expresan las cadenas pesadas de miosina rápida. Esto sugiere que las miofibrilas utilizadas para aislar los mioblastos probablemente estén expresando las cadenas pesadas de miosina rápida. Por contraste, las células derivadas del músculo aisladas en el PP nº 6 se fusionan entre sí y con las miofibrilas del hospedante que expresan las cadenas pesadas de miosina rápida y lenta, lo cual sugiere que las células derivadas del músculo en PP nº 6 tienen la capacidad de fusionarse con miofibrilas de cadenas pesadas de miosina rápida y lenta.

Para investigar si las células capaces de expresar sustancias antiinflamatoria pueden mejorar la supervivencia de las células después de la inyección, se modificaron genéticamente mioblastos para que expresasen la proteína

antagonista del receptor de interleuquina-1 (1L-1 Ra), que es capaz de competir con la citoquina inflamatoria IL-1 por la unión al receptor de IL-1, pero no induce la señalización de receptor de IL-1. Después se comparó la supervivencia de los mioblastos modificados con la de las células control no modificadas. Los mioblastos utilizados para este experimento, la línea celular mdx, muestran una pérdida drástica de las células inyectadas después de la inyección (figura 7G). Se observó una pérdida del 84% de las células no modificadas a las 48 horas después de la inyección por la significativa disminución en la cantidad de expresión de β -galactosidasa, en comparación con los mioblastos transducidos no inyectados en el momento 0. Además, se detectó un ligero aumento en la cantidad del gen indicador a las 120 horas después de la inyección, que sigue siendo significativamente diferente a lo observado en las células control (figura 8A).

Por contraste, las células modificadas para que expresasen IL-1Ra redujeron significativamente la pérdida temprana de las células inyectadas. Se observó una pérdida del 60% en la cantidad de β -galactosidasa expresada en las células no inyectadas ($P < 0,05$) a las 24 horas después de la inyección pero, en contraste con el resultado observado con las células no modificadas, el nivel de expresión de β -galactosidasa detectado a los 2 días después de la inyección no fue significativamente diferente al que se encontró en los mioblastos que expresan IL-1 Ra no inyectados. Este descubrimiento sugiere que la inflamación también desempeña un papel en la poca tasa de supervivencia de las células inyectadas; por consiguiente, las estrategias capaces de bloquear la inflamación pueden ayudar al desarrollo de estrategias para lograr un trasplante eficaz de mioblastos (figuras 8B-8D).

Los experimentos en este ejemplo se realizaron para determinar si la inflamación es el único factor implicado en la poca supervivencia de los mioblastos inyectados. La gama extremadamente amplia de actividad biológica de IL-1 Ra puede mejorar la supervivencia de las células bloqueando la acción de una citoquina inflamatoria (IL-1). Tal como se describe en la presente, los mioblastos se modificaron genéticamente para que expresasen IL-1 Ra antiinflamatoria, y se ensayaron para observar si evitaban la pérdida rápida de las células inyectadas. Los mioblastos modificados que expresan IL-1 Ra permiten una mayor tasa de supervivencia de los mioblastos inyectados a las 48 horas después de la inyección. La línea celular de mioblastos no modificados muestra poca supervivencia de las células inyectadas, pero la misma línea celular que expresa IL-1 Ra mejora significativamente la tasa de supervivencia de las células inyectadas.

Se observó una mejora del 80% en la supervivencia de las células inyectadas por la expresión local de una sustancia antiinflamatoria. Se produjo una disminución significativa en la cantidad del gen indicador de β -galactosidasa a las 24 horas, comparado con las células control no inyectadas, lo cual sugiere que los mioblastos que expresan IL-1 Ra probablemente se hayan fusionado entre 24 y 48 horas después de la inyección y esto conduce a un aumento en la expresión del gen indicador de β -galactosidasa. Se observó una ligera disminución en la cantidad de la expresión del gen indicador de β -galactosidasa a los 5 días después de la inyección que puede estar relacionada con un rechazo inmunológico.

Se logró una sustancial reducción en la pérdida de los mioblastos inyectados con las células que expresan IL-1 Ra, pero se sigue observando una pérdida del 20% a las 48 horas después de la inyección. Así, es probable que la inflamación sólo sea un factor implicado en la pérdida rápida de los mioblastos inyectados después de la implantación.

Se evaluaron diferentes poblaciones de células derivadas del músculo para ayudar al desarrollo de estrategias para evitar la poca supervivencia de los mioblastos inyectados después del trasplante. Para realizar esta evaluación se inyectaron líneas celulares de mioblastos mdx, mioblastos puros aislados a partir de miofibras, y células derivadas del músculo primarias a diferentes purezas, en músculo mdx adulto. Los mioblastos se transdujeron con adenovirus según se ha descrito, y se evaluó el destino temprano de las células inyectadas después de la inyección en diferentes momentos después de la inyección (es decir, a las 0,5, 12, 24 y 48 horas, y 5 días). Se observó que las poblaciones de cultivos de células derivadas del músculo primarias aisladas a partir de músculo gastrocnemio muestran una capacidad diferente de expresar desmina y diferenciarse en miotubos. Además, la supervivencia celular después de la inyección fue diferente. De hecho, el mismo número de células musculares derivadas del precultivo n° 1 frente al precultivo n° 6 produjeron una pérdida del 83% y una ganancia del 124%, respectivamente, en la expresión del transgén, comparado con las células transducidas no inyectadas en el momento 0. Esto sugiere que el aislamiento de poblaciones específicas de células derivadas del músculo soluciona totalmente esta pérdida rápida de las células inyectadas.

Este ejemplo evalúa si la fuente de células derivadas del músculo puede tener un papel primordial en la supervivencia temprana de los mioblastos inyectados. Ya se ha observado una gran diferencia en el contenido en células satélite entre los músculos de contracción lenta y rápida (H. Schmalbruch y U. Hellhammer, 1977, Anat Rec., 189:169; A.M. Kelly, 1978, Dev. Biol., 65:1; M.C. Gibson y E. Schultz, 1982, Anat. Rec., 202:329). Los tipos de células satélite aisladas a partir de estos músculos podrían mostrar un destino distinto después del trasplante.

Se descubrió que las células derivadas del músculo de PP n° 6 tenían la capacidad de fusionarse con miofibras que expresan las isoformas de miosina lenta y rápida, en contraste con mioblastos obtenidos de miofibras aisladas, que se fusionan entre sí o se fusionan con miofibras que expresan la isoforma de miosina rápida. La incapacidad de los mioblastos obtenidos de las miofibras aisladas para fusionarse con miofibras que expresan la isoforma de miosina lenta puede estar implicada en la diferente supervivencia de los mioblastos inyectados, puesto que el músculo

inyectado (gastrocnemio) contiene una mezcla de miofibras que expresan las isoformas de miosina rápida y lenta. Es probable que los mioblastos inyectados que no son capaces de fusionarse con las miofibras del hospedante mueran en el sitio de la inyección. Aunque no se pretende limitación alguna por la teoría, esto puede explicar por qué la línea celular de mioblastos que muestra una alta inmunorreactividad frente a la desmina sigue presentando poca supervivencia después de la inyección.

Aunque las diferentes poblaciones de células derivadas del músculo y mioblastos que expresan IL-1 Ra muestran una mejor supervivencia después de la implantación en el músculo esquelético, la persistencia a largo plazo de las células inyectadas parece verse impedida por las respuestas inmunológicas. En general, todas las poblaciones de células musculares muestran una reducción en la cantidad de expresión de β -galactosidasa entre el día 2 y 5 después de la inyección. También se descubrió que el número de miofibras que expresan LacZ disminuye a lo largo del tiempo en el músculo inyectado, incluso con la utilización de mioblastos que expresan IL-1 Ra. Por consiguiente, la modificación de poblaciones específicas de células derivadas del músculo no sólo para que expresen IL-1 Ra sino para que expresen también otros factores o agentes inmunosupresores podría evitar la poca supervivencia y cualquiera de las respuestas inmunológicas adversas que puedan acompañar a la transferencia de mioblastos.

Ejemplo 6

Se realizaron experimentos para determinar la viabilidad de la terapia génica mediada por células que emplea mioblastos transducidos con un vector adenovirico que porta el gen que codifica el factor del crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). Los mioblastos modificados con bFGF se inyectaron en la uretra para tratar la incontinencia urinaria y también en la pared de la vejiga para mejorar la contractilidad del detrusor. Los vectores adenoviricos utilizados se produjeron según se describe en H. Ueno *et al.*, 1997, *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology*, 17(11):2453-60; y J.C. Takahashi *et al.*, 1997, *Atherosclerosis*, 132(2):199-205.

Se realizaron experimentos similares a los descritos para la inyección en la uretra y la vejiga de los ejemplos 2 y 3 para comparar animales control de simulación frente a animales inyectados con mioblastos transducidos con vectores adenoviricos genéticamente modificados para que contuviesen el gen de bFGF; los mioblastos transducidos expresan la proteína de bFGF después de la transducción.

Brevemente, se evaluaron cuatro grupos de animales: animales de control de vejiga y animales de control de uretra con una inyección de mioblastos-bFGF o de disolución salina de simulación. Se evaluaron aproximadamente 8 animales en cada grupo. Los animales se sacrificaron 4 días después de la inyección. Los animales que habían recibido una inyección uretral se sometieron a una evaluación fisiológica según se describe en el ejemplo 2. Los animales que había recibido una inyección en la vejiga se sometieron a una evaluación fisiológica según se describe en el ejemplo 3.

En estos experimentos, los mioblastos se transdujeron con un vector adenovirico que porta el gen de bFGF y un gen indicador de β -galactosidasa, descrito anteriormente, y también se marcaron con microesferas de látex fluorescentes (FLM) (P. Cuevas *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:11196-12001; Y. Nakahara *et al.*, 1996, *Cell Transpl.*, 5:191-204). Se realizó una tinción histoquímica para bFGF, lacZ y un análisis microscópico de la fluorescencia para evaluar y cuantificar la supervivencia y la diferenciación de los mioblastos y para evaluar la generación de miofibras.

Ejemplo 7

Los experimentos descritos en este ejemplo demuestran que los mioblastos infectados con un vector adenovirico que porta el gen iNOS e inyectados localmente en la uretra y la vejiga disminuyen la inflamación de la vejiga, mejoran la relajación uretral y afectan a la disfunción eréctil.

Brevemente, se infectaron mioblastos con un adenovirus modificado para que porte el gen iNOS (ejemplo 1). Los mioblastos transducidos se inyectaron en la uretra o la vejiga de ratas S.D. Se realizaron experimentos fisiológicos según se describe en los ejemplos 2 y 3 para la vejiga y la uretra para evaluar el efecto o efectos fisiológicos de la terapia del gen iNOS en estos tejidos.

Se empleó el modelo de ciclofosfamida (CYP) para la inflamación de la vejiga y se empleó un modelo de ligadura uretral parcial para una obstrucción uretral parcial. Para el modelo de inflamación de la vejiga de CYP se evaluaron 4 grupos de animales: los animales control y CYP recibieron inyecciones en la vejiga de mioblastos-iNOS o de disolución salina de simulación. Cada grupo comprendía aproximadamente 8 animales. Se realizó una inyección de CYP (100 mg/kg por vía intraperitoneal) al mismo tiempo que la inyección de mioblastos-iNOS o de simulación. Los animales se sacrificaron 4 días después de las inyecciones, basándose en la determinación de una inflamación persistente en la vejiga más de 4 días después de CYP, y una expresión óptima de iNOS a los 4 días (E. Tzeng *et al.*, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11771-11775; E. Tzeng *et al.*, 1996, *I. Surgery*, 120:315-321).

Para el modelo de obstrucción uretral también se estudiaron 4 grupos de animales: animales de ligadura uretral y control con una inyección uretral de mioblastos-iNOS o de disolución salina de simulación. Los mioblastos se transdujeron con un vector adenovirico que porta el gen indicador de β -galactosidasa y se marcaron con microesferas de látex fluorescentes (FLM). Se realizó una tinción histoquímica para lacZ y un análisis microscópico fluorescente para evaluar y cuantificar la supervivencia y la diferenciación de los mioblastos y para evaluar el

desarrollo de miofibras. Se realizó una inmunohistoquímica de tinción para iNOS y para las proteínas adenovíricas en todos los especímenes. Se realizó un análisis de la transferencia Northern para la producción de ARN de iNOS humana en los animales transfectados con el gen y en los controles apropiados.

5 Los experimentos y sus resultados relacionados con la producción de NO intrauretral e intravesical se presentan de modo más específico a continuación.

A. Donantes de NO intrauretrales relajan el músculo liso uretral

10 Para evaluar primero el papel de los donantes de NO en el músculo liso, se midió la presión de perfusión uretral y la presión de la vejiga isovolumétrica con catéteres insertados a través de la cúpula de la vejiga en ratas S.D. hembra anestesiadas con uretano (250-300 gramos) (n = 9). El montaje del catéter se introdujo en el cuello de la vejiga para bloquear el paso de fluidos entre la vejiga y la uretra sin afectar el suministro nervioso a los órganos. La uretra externa no se cateterizó. Las respuestas se estudiaron en el estado de control a una velocidad de infusión de disolución salina uretral de 0,075 ml/min. Después de bloquear el esfínter uretral estriado mediante la administración de alfa-bungarotoxina intravenosa (100 mcg/kg), se administraron los fármacos intrauretrales.

15 Los resultados de estos experimentos revelan que la uretra muestra unas respuestas reflejas caracterizadas por una disminución inicial en la presión uretral cuando aparecen las contracciones reflejas de la vejiga. A esto le siguió un periodo de oscilaciones de alta frecuencia que fue abolido por la alfa-bungarotoxina. Una infusión intrauretral de donantes de NO (es decir, S-nitroso-N-acetilpenicilamina [SNAP] (2 mM) y nitroprusida (1 mM)) inmediatamente disminuye la presión uretral de la línea de base en 30% al 37% y la relajación máxima uretral en 24% al 50%. Además, la duración del reflejo de relajación uretral aumenta en 96% al 100%, lo cual es probable que sea debido a que el NO exógeno potencia la relajación del NO endógeno. Ninguno de los donantes de NO cambió la amplitud de las contracciones de la vejiga. La relajación uretral persistió durante 15 minutos después de detener la infusión de los donantes de NO. Los donantes de NO intrauretrales no afectaron a la media de la presión sanguínea. La N-nitro-L-arginina (L-NAME) intrauretral (20 mM) sólo bloquea parcialmente el reflejo de relajación del NO endógeno.

20 Los resultados de estos experimentos demuestran que NO desempeña un papel clave en el reflejo de la relación del músculo liso uretral durante la micción. Los donantes de NO intrauretrales tópicos inducen con rapidez la relajación uretral sin afectar a la vejiga. Basándose en estos resultados, la aplicación intrauretral de donantes de NO puede ser clínicamente eficaz en casos de obstrucción y espasticidad del músculo liso uretral del esfínter.

B. NO intravesical sobre la cistitis inducida por ciclofosfamida

30 Para evaluar primero el papel del NO intravesical sobre la cistitis inducida por ciclofosfamida, ratas S.D. hembra recibieron una única inyección intraperitoneal de CYP (100 mg/kg) o vehículo. Entonces se controlaron los parámetros de evacuación (volumen medio evacuado y número de evacuaciones) durante 24 horas en una jaula metabólica. Cuarenta y ocho horas después de la inyección de CYP se estudió la función de la vejiga utilizando una cistometría con una infusión de disolución salina continua (0,04 ml/min) a través de un catéter transuretral PE-50 bajo anestesia de uretano. Los donantes de NO S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) (2 mM) y nitroprusida de sodio (SNP) (1 mM), así como el inhibidor de NOS N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (20 mM) se administraron por vía intravesical.

35 Los resultados demuestran que el número de micciones durante las 24 horas después de la inyección de CYP fue significativamente mayor durante 24 horas (117 ± 86 , n = 8) que en las ratas control (25 ± 4 , n = 4) ($p < 0,001$). Después de 7 días, la frecuencia de evacuación seguía siendo elevada (38 ± 4 , n = 4) ($p < 0,05$). No se observó diferencia en el volumen total de micción entre las ratas tratadas con CYP ($20,5 \pm 9,2$ ml) y las ratas control ($15,2 \pm 6,1$ ml). La infusión de un donante de NO (SNAP, n = 5, o SNP, n = 3) aumentó el intervalo de intercontracción (ICI) (64%) pero no cambió la amplitud de las contracciones de la vejiga. Un tratamiento con L-NAME (n = 8) no alteró el ICI ni la amplitud (tabla 3).

45 Además, las ratas inyectadas con CYP se controlaron durante más de 7 días y mostraron una frecuencia de evacuación persistentemente elevada, lo cual es coherente con la irritación de la vejiga.

Tabla 3

	ICI (min)	Amplitud (cm H ₂ O)	Duración de la contracción (min)
Disolución salina	4,4 ± 2,3	23 ± 8	1,1 ± 0,3
L-NAME	3,8 ± 2,0	21 ± 6	1,0 ± 0,4
Donante de NO	7,2 ± 4,6*	21 ± 5	1,2 ± 0,3
* infusión de No frente a disolución salina y L-NAME: p < 0,01 (ensayo de la t apareado)			

Los anteriores experimentos demuestran que CYP provoca irritación de la vejiga a largo plazo y que los donantes de

NO intravesicales revierte de forma aguda y eficaz la actividad de la vejiga inducida por CYP. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, se establece la hipótesis de que este efecto del fármaco no es debido a una relajación del músculo liso, sino que está mediado por un cambio en la excitabilidad del nervio aferente que aumenta el intervalo de intercontracción, pero que no cambia la amplitud de la contracción. Los donantes de NO tópicos pueden considerarse como un tratamiento para la cistitis mediada por ciclofosfamida y otros compuestos inflamatorios.

C. Terapia génica de iNOS mediada por mioblastos en el sistema (genito)urinario

Se realizaron experimentos para demostrar que la terapia génica de iNOS resulta ventajosa y eficaz para un uso terapéutico en el sistema genitourinario.

1. Terapia génica de iNOS para la disfunción eréctil: comparación entre vectores plasmídicos, adenovíricos y de mioblastos transducidos con adenovirus

El gen que codifica la forma inducible de NOS (iNOS) se insertó en un plásmido y en un vector adenovírico. El plásmido de iNOS es como se describe en D.K Nakayama *et al.*, 1992, Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 7:471-476. El vector de iNOS adenovírico es como se describe en D.A. Geller *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:3491-3495 y en las patentes de EEUU nº 5.658.565 y 5.468.630. Mediante inyecciones de una disolución del plásmido, del virus, o de mioblastos víricamente transducidos se introduce iNOS humana exógena en el pene de ratas.

El pene de ratas macho adultas se inyectó con mioblastos transfectados con vectores adenovíricos que portan el gen de la β -galactosidasa. Después de 2, 4 y 7 días, se evaluó una tinción de X-gal y los efectos fisiológicos de X-gal. Se ensayaron inyecciones de 100 μ l de adenovirus con titulaciones de 10^6 - 10^9 . Los mioblastos se cultivaron a una densidad de 5×10^4 células por pocillo y se transdujeron con una cepa de adenovirus (MOI = 50). Las inyecciones varían de $1,33 \times 10^5$ a 1×10^6 células por 100 μ l. Se midió la presión intracavernosa basal (ICP) y la ICP máxima después de la estimulación del nervio cavernoso. También se realizó una inmunohistoquímica de iNOS y una PCR del cebador de iNOS humana. Para los experimentos con plásmidos, se emplearon 100 μ g de plásmido inyectado en 100 μ l de sacarosa al 20%/PBS para la inyección en la vejiga, el pene y la uretra.

Se determinaron las condiciones óptimas para la transfección de genes variando el número de partículas víricas (pfu), la concentración, el volumen y el vehículo de la disolución inyectada. El nivel de expresión de iNOS o del gen indicador depende del tiempo. Se encontró la expresión máxima en el día 4, con unos niveles más bajos en el día 2 y unos niveles mínimos en el día 7. En el día 4, la expresión génica fue la más alta para mioblastos+adenovirus > adenovirus > plásmido. Se detectó tinción inmunohistoquímica de iNOS y de proteínas adenovíricas en el pene tratado. Un análisis de la transferencia Northern para la iNOS humana dio positivo sólo en animales transfectados con genes. No hubo diferencias en la ICP basal o máxima entre los animales control y los animales tratados con el gen indicador de β -galactosidasa. Sin embargo, se produjo un aumento significativo en la ICP basal (55 ± 23 cm H₂O) en el pene tratado con genes frente al control (5 ± 6 cm H₂O). La ICP máxima aumentó en dos veces en las ratas transfectadas con iNOS.

Los resultados demuestran que la terapia génica mediada por mioblastos tiene más éxito para transportar iNOS hacia el pene que los métodos de transfección directa con virus o plásmidos. Por tanto, la terapia génica de NOS promete proporcionar un nuevo tratamiento para la disfunción eréctil.

2. Medición de la terapia génica de iNOS

Se confirmó la liberación de NO utilizando un microdetector porfirínico colocado directamente en los tejidos tratados con terapia génica de NOS inducible (iNOS) (L.A. Birder *et al.*, 1998, American Urological Association Meeting, 1998). Se empleó la transferencia de genes *ex vivo* para colocar el gen iNOS humana en el pene y la vejiga de ratas S.D. macho. Se inyectaron inyecciones de 100 μ l de mioblastos infectados suspendidos en disolución salina a un recuento total de células de $1,33 \times 10^5$ a 1×10^6 células por inyección en el cuerpo cavernoso de la rata. La vejiga se inyectó con una disolución similar; sin embargo, la concentración de células varía de $1,33 \times 10^5$ a 1×10^6 células por inyección de 10 μ l. Los mioblastos transducidos se prepararon mediante su incubación durante 24 horas con un vector adenovírico que contenía el gen iNOS a una multiplicidad de infección de 50 partículas víricas por célula. Se realizó una tinción inmunohistoquímica sobre las células cultivadas para asegurar una infección adecuada y la producción de proteínas de iNOS.

Se midió la liberación de NO en la vejiga y el pene colocando la punta de un microdestector porfirínico revestido con Naflon (dia. 10 μ ; límite de detección, 5 nM; tiempo de respuesta, 1 ms) directamente sobre la superficie de la vejiga (mucosa y serosa) y sobre el cuerpo cavernoso, respectivamente. La concentración máxima de liberación de NO fue de 1-1,3 μ M y fue provocada por el agonista adrenérgico norepinefrina (3 μ M) y también por el cofactor de iNOS tetrahidrobiopterina (TBH4).

Se detectó la incorporación del gen iNOS en el pene y la vejiga mediante una tinción inmunohistoquímica positiva para anticuerpos de iNOS y de adenovirus, y un análisis de la transferencia Northern para la producción de ARN de iNOS humana sólo fue positivo en animales transfectados con el gen de iNOS humana. El microdetector porfirínico

medió unos niveles bajos similares de liberación de NO constitutiva en diversas áreas de la vejiga. La adición de TBH4 100 μ M provoca un breve aumento (<5 segundos) en la liberación de NO (1-5 nM) en las áreas control de la vejiga.

- 5 En las áreas inyectadas con el gen iNOS se produjo una liberación sostenida (> 1 min) de grandes cantidades de NO (> 20 nM). El microdetector porfirínico mostró un aumento en la liberación de NO en áreas de la vejiga tratadas con terapia génica de iNOS mediada por células de mioblastos.

Ejemplo 8

El uso de cofactores, tales como factores tróficos, es decir, citoquinas, expresados por mioblastos genéticamente modificados para contener genes que codifican estos factores resulta beneficioso.

- 10 Las lesiones relacionadas con el músculo son un desafío en muchos campos de la medicina. Aunque los músculos mantienen su capacidad para regenerarse después de una lesión, se ha descubierto que el proceso de curación de los músculos después de dichas lesiones es muy lento y a menudo conduce una recuperación incompleta del músculo. Para desarrollar estrategias para mejorar la curación del músculo tras una lesión, por ejemplo, una lesión en la pared de la vejiga o la uretra (criolesión), se han desarrollado modelos de lesiones reproducibles para
15 contusiones, esguinces y laceraciones musculares.

- Las investigaciones han demostrado que la regeneración del músculo se produce después de la lesiones mencionadas anteriormente, pero el desarrollo de la formación de tejido cicatricial limita en gran medida el proceso de curación natural. Así, recién se ha determinado que la potenciación del crecimiento y la regeneración muscular puede utilizarse para mejorar la curación del músculo después de lesiones. Por consiguiente, se han identificado
20 factores del crecimiento que potencian no sólo la proliferación y la diferenciación de mioblastos *in vitro*, sino también la regeneración muscular en músculos lesionados que mejora la curación del músculo después de lesiones. Estos descubrimientos también pueden tener una aplicación directa en los casos de lesiones del músculo liso del tracto urinario inferior asociadas con la incontinencia urinaria de esfuerzo y la contractilidad alterada de la vejiga.

A. Desarrollo de modelos animales para lesiones musculares

- 25 La caracterización de las estrategias para mejorar la curación muscular después de lesiones requiere el desarrollo de modelos de lesiones musculares ortopédicas reproducibles bien definidos, que incluyan contusiones, laceraciones y esguinces según se describe en la presente. La caracterización de la regeneración muscular después de estas lesiones permite la determinación de la curación natural del músculo después de una lesión. Se desarrollaron modelos de laceración, contusión, y esguince musculares en ratones.

- 30 Brevemente, se realizó la laceración muscular cortando el músculo gastrocnemio de un ratón con tijeras al 60% de su longitud a partir de su inserción distal, 75% de su anchura, y 50% de su espesor. La contusión muscular se realizó dejando caer una bola de 16 gramos a través de un elemento impactador desde una altura de 100 cm sobre el músculo gastrocnemio del ratón, y el esguince muscular se realizó estirando la unidad de músculo-tendón hasta un punto de tensión predeterminado a una velocidad de 1 cm/min.

- 35 Para evaluar la curación del músculo después de una lesión, se empleó una tinción histológica (hematoxilina-eosina) junto con técnicas inmunohistoquímicas para evaluar la expresión de la desmina y la vimentina. Puesto que la desmina es una proteína del citoesqueleto que se expresa de modo uniforme en las miofibras en regeneración, se ha utilizado para localizar específicamente las miofibras en regeneración. La vimentina se expresa en macrófagos y fibrocitos mononucleados y se ha utilizado en la presente como marcador de la fibrosis.

- 40 Se observó que el músculo lesionado era capaz de curarse debido a una regeneración muscular masiva que se produce después de una lesión. El alto nivel de regeneración de miofibras musculares observado a los 7 y 10 días después de la lesión comienza a disminuir después de aproximadamente 14 días y continúa disminuyendo hasta los 35 días después del traumatismo. El desarrollo de una gran formación de tejido cicatricial en el músculo lesionado revela que la curación del músculo no es completa a los 35 días después de la lesión. De hecho, se observó que el
45 desarrollo de la formación de tejido cicatricial comienza a los 14 días después de la lesión y aumenta gradualmente hasta los 35 días. Es probable que el desarrollo de fibrosis, que parece impedir el proceso de curación, puede estar relacionada con la reducción de la regeneración muscular que también se observa a los 14 días después de la lesión.

- 50 B. Caracterización de los efectos de varios factores del crecimiento sobre la proliferación y la fusión de mioblastos *in vitro*

Una estrategia para mejorar la curación del músculo después de una lesión es acelerar la regeneración muscular. Una forma para lograr esta aceleración es aumentando la actividad miogénica de las células musculares en el músculo lesionado. Las sustancias que potencian la proliferación y la diferenciación de mioblastos *in vitro* también pueden aumentar la regeneración muscular *in vivo* y evitar el desarrollo de la formación de tejido cicatricial.

- 55 Durante la regeneración muscular, numerosos factores del crecimiento son liberados por el músculo lesionado para

modular la regeneración muscular. Estas proteínas activan las células satélite para que proliferen y se diferencien en miofibras para apoyar la regeneración muscular (E. Schultz, 1989, Med. Sci. Sports Exer., 21:181; T. Hurme y H. Kalimo, 1992, Med. Sci. Sports Exer., 24:197-205; R. Bischoff, The satellite cell and muscle regeneration, Myology, 2ª edición, Nueva York, McGraw-Hill, Inc. pp. 97-118, 1994). Durante el crecimiento y el desarrollo del músculo esquelético se han descubierto muchas sustancias de crecimiento que son capaces de inducir diversas respuestas del músculo esquelético. De hecho, se han demostrado los efectos individuales de estos factores del crecimiento sobre etapas específicas de la regeneración muscular (R.L. Chambers y J.C. McDermott, 1996, Can. J. Appl. Physiol., 21:155-184; J.R. Florini y K. Magri, 1989, Am. J. Physiol., 256:701-711; M.D. Ground, 1991, Path. Res. Pract., 187:1-22).

Se han investigado varios factores del crecimiento, que incluyen los factores del crecimiento de fibroblastos ácido y básico (aFGF y bFGF); el factor del crecimiento epidérmico (EGF), el factor del crecimiento de tipo insulínico-1 (IGF-1); el factor del crecimiento derivados de plaquetas (PDGF); el factor del crecimiento transformante β o α (TGF- β o TGF- α); y el factor del crecimiento nervioso (NGF), por su capacidad para potenciar la actividad miogénica de células musculares *in vitro*. Los mioblastos se cultivan en estos factores tróficos a diferentes concentraciones (1, 10 y 100 ng/ml), y se controló la proliferación y la diferenciación de mioblastos a las 48 y 96 horas después de la incubación. Los descubrimientos de la presente revelan que b-FGF, IGF-1 y NGF potencian cada uno significativamente la proliferación de mioblastos *in vitro*.

Además, se ha descubierto que bFGF, aFGF, IGF-1 y NGF son capaces de aumentar la diferenciación de mioblastos en miotúbulos (tabla 4). Otros factores del crecimiento fueron incapaces de aumentar significativamente la proliferación o la diferenciación de mioblastos. Estos resultados demuestran que b-FGF, IGF-1 y NGF potencian significativamente la proliferación de mioblastos, mientras que b-FGF, a-FGF, IGF-1 y NGF aumentan la diferenciación de mioblastos en miotúbulos. Así, estos factores producen resultados beneficiosos cuando se administran al músculo lesionado para mejorar la curación del músculo después de una lesión (tabla 5).

Tabla 4

Efecto de los factores del crecimiento sobre los mioblastos <i>in vitro</i>	Proliferación	Fusión
b-FGF, IGF, NGF	estimula	estimula
a-FGF	inhibe	estimula
PDGF, EGF, TGF- α , TGF- β	inhibe	inhibe

C. Transferencia de genes directa y *ex vivo* de factores tróficos seleccionados

La técnica elegida para transportar factores del crecimiento potenciales al músculo lesionado es de suma importancia para optimizar el beneficio terapéutico. Las opciones incluyen la inyección directa de factores del crecimiento, la terapia génica directa, la terapia génica *ex vivo*, y el trasplante de mioblastos.

El transporte *ex vivo* del gen marcador de β -galactosidasa al músculo lesionado produce muchas miofibras positivas a β -galactosidasa. La estrategia mediada por células musculares *ex vivo* proporciona no sólo un método eficaz para transportar genes seleccionados, sino que también proporciona células capaces de participar en el proceso reparador, similar al del trasplante de mioblastos. Sin embargo, en el trasplante de mioblastos no se realizan manipulaciones genéticas *in vitro*. Además, para su aplicación en enfermedades musculares heredadas, el trasplante de mioblastos ha demostrado mejorar la regeneración de miofibras en el músculo lesionado de modo experimental con agentes mionecróticos. Por tanto, las técnicas muy relacionadas de terapia génica *ex vivo* mediada por células musculares y el trasplante de mioblastos son ambas aplicables a lesiones musculares.

Unas inyecciones directas individuales de b-FGF, IGF-1 y NGF en el músculo lesionado (por ejemplo, laceración, contusión, y esguince) pueden aumentar el número de miofibras en regeneración *in vivo* y pueden aumentar la contracción muscular y la fuerza tetánica 15 días después de la lesión. Sin embargo, acompañando a una rápida eliminación y corta semivida, es probable que el efecto de las inyecciones directas del factor del crecimiento sea transitorio y subóptimo, debido a la rápida eliminación del producto del sitio de la lesión y la corta semivida de estas proteínas. Por contraste, una expresión génica persistente a través de una terapia génica mediada por células puede mejorar aún más la curación muscular después de una lesión. La modificación de vectores capaces de expresar estos factores del crecimiento abre nuevas vías de tratamiento para el tratamiento de los músculos lesionados. También según la presente invención, la terapia génica basada en la transferencia génica directa y *ex vivo* es capaz de transportar un gen (por ejemplo, un gen marcador) al músculo lesionado (es decir, laceración, contusión, o esguince).

La terapia génica directa para transportar genes al músculo esquelético es posible utilizando ADN desnudo de retrovirus, adenovirus, virus del herpes simplex y virus adenoasociados. La mayoría de estos vectores transduce relativamente pocas miofibras adultas. Sin embargo, el adenovirus es capaz de transducir un gran número de fibras musculares en regeneración, una condición presente en el músculo lesionado.

La inyección directa de adenovirus que contienen el gen marcador de beta-galactosidasa en el músculo lacerado, contusionado, y con esguince produce muchas miofibras transducidas a los 5 días. Además, la inyección directa de adenovirus que portan genes de un factor del crecimiento (es decir, bFGF, IGF-1, NGF) debería dar como resultado una producción de proteínas sostenida en el músculo lesionado. La inyección directa de virus adenoasociados (AAV) produce un alto nivel de transducción de miofibras adultas en el músculo lesionado y no lesionado. El AAV puede ser el vector preferido para el transporte directo de genes al músculo esquelético maduro, aunque es capaz de portar genes de solo 1-4 pares de KB.

La inyección de células derivadas del músculo modificadas que expresan IGF-1 es capaz de mejorar la curación del músculo después de una lesión de laceración cuando se inyectan por vía intramuscular en el sitio de la lesión. El músculo inyectado con células derivadas del músculo que expresan IGF-1 muestra una mayor contracción rápida y fuerza tetánica que el músculo lesionado tratado con disolución salina. Estos resultados sugieren que la inyección de células derivadas del músculo modificadas para que expresen IGF-1 puede utilizarse para mejorar la curación del músculo después de lesiones ortopédicas, incluyendo laceración, contusión, esguince, isquemia y denervación (tabla 5). Puesto que se ha descubierto que el adenovirus es inmunogénico, se construyó un virus adenoasociado para portar el gen para la expresión de IGF-1 (figura 12). Este virus se utiliza para modificar células musculares que se inyectarán después de modificarlas *in vitro* para que expresen IGF-1 en el músculo lesionado y, por consiguiente, para mejorar la curación del músculo después de una lesión.

También se determinó que la transferencia génica *ex vivo* mediada por mioblastos puede transportar de modo eficaz a adenovirus que expresan β -galactosidasa al músculo lesionado. De hecho, la estrategia *ex vivo* mediada por mioblastos da como resultado la producción de muchas miofibras positivas a β -galactosidasa en el músculo lesionado después de una laceración, una contusión, y un esguince. Por consiguiente, es probable que los mioblastos inyectados que expresan factores del crecimiento mejoren la regeneración muscular mediante la producción de factores del crecimiento, y que actúen como un depósito de más mioblastos que son capaces de formar nuevas miofibras.

Tabla 5

Efecto de los factores del crecimiento sobre la contracción/fuerza tetánica			
Efecto de los factores tróficos sobre la fuerza muscular <i>in vivo</i>	NGF	bFGF	IGF-1
Contusión muscular	+/+	+/+	+/+
Laceración muscular	-/-	+/+	+/+
Esguince muscular	+/-	+/+	+/+
*: (+) mejora en la fuerza frente a los músculos no inyectados; (-): no mejora en la fuerza frente a los músculos no inyectados			

D. Transplante de mioblastos para potenciar la regeneración muscular y mejorar la curación del músculo después de una lesión

El transplante de mioblastos, que consiste en la implantación de precursores de mioblastos (células satélite), potencia la regeneración muscular y crea un depósito de mioblastos normales que pueden fusionarse y transportar genes al músculo esquelético.

Para mejorar la curación del músculo después de una lesión, se obtiene una biopsia muscular a partir de un músculo no lesionado del mismo individuo que puede actuar como donante autólogo para la transferencia de mioblastos del músculo lesionado. El uso de la transferencia de mioblastos autólogos puede evitar el problema del rechazo inmunológico, bien documentado, que es un importante obstáculo del transplante de mioblastos (J. Huard *et al.*, 1994, *Human Gene Ther.*, 5:949-958; J. Huard *et al.*, 1994, *J. Clin. Invest.*, 93:586-599), y conducir a una mejor curación del músculo después de una lesión.

Ejemplo 9

En este ejemplo se evaluó la transferencia de células mediada por mioblastos para mejorar, reducir o eliminar una serie de condiciones ortopédicas. Los modelos animales utilizados fueron conejo recién nacido y ratones SCID adultos. Estos experimentos indican la utilidad de la terapia génica mediada por células de mioblastos para trastornos patológicos del sistema musculoesquelético, por ejemplo, artritis y lesiones en las articulaciones, los ligamentos, el cartílago y el menisco.

Se ha desarrollado un gran número de experimentos que estudian la transferencia génica mediada por mioblastos para trastornos ortopédicos. Aunque la transferencia génica *ex vivo* empleando células sinoviales ha demostrado que puede transportar genes que codifican proteínas antiartríticas hacia la articulación de la rodilla de conejo, el éxito de la utilización de células sinoviales se ha visto limitado por la expresión transitoria del transgén. Se emplearon células musculares como vehículo alternativo de transporte de genes a la articulación en conejos recién

5 nacidos y en ratones SCID adultos. Se ha demostrado que los mioblastos son transducidos con mayor eficacia que las células sinoviales utilizando la misma preparación adenovírica para infectar/transducir las células *in vitro*. Después de la inyección intraarticular de células musculares genéticamente modificadas, los mioblastos modificados se adhieren a varias estructuras en la articulación, incluyendo el ligamento, la cápsula, y el sinovio. Además, los mioblastos se fusionan para formar muchos miotubos postmitóticos y miofibras en diferentes emplazamiento de la articulación del conejo recién nacido 5 días después de la inyección.

10 En las rodillas de ratones SCID adultos, los mioblastos se fusionan y expresan el gen indicador durante al menos 35 días después de la inyección. La presencia de miofibras postmitóticas en la articulación de la rodilla revela las ventajas de la presente invención para la expresión a largo plazo de la proteína segregada. En la actualidad, numerosos tejidos en la articulación (ligamento, menisco, cartílago) tienen poca capacidad de curación intrínseca y con frecuencia son necesarias correcciones quirúrgicas. Un vehículo de transporte de genes estable a las articulaciones, que produzca proteínas que mejoren estos diferentes trastornos musculoesqueléticos, proporciona un cambio en las implicaciones clínicas de las patologías de las articulaciones.

A. Preparación de mioblastos primarios y células sinoviales

15 Se retiraron músculos de patas de conejos recién nacidos (2 días de edad), y el tejido muscular se aisló de otros tejidos conectivos, vasculares, cartilaginosos y óseos bajo un microscopio de disección. El tejido miogénico aislado se disoció mediante un tratamiento enzimático con colagenasa al 0,2% (1 hora) y tripsina (30 minutos) para aislar células satélite. Los cultivos primarios de células miogénicas se enriquecieron mediante un precultivo (1 hora) de la suspensión celular en matraces de cultivo de tejidos de 24 cm² revestidos con gelatina al 2%. Puesto que los fibroblastos tienden a adherirse al sustrato con más rapidez que los mioblastos, el sobrenadante que contiene mioblastos y otros tipos celulares se volvió a cultivar y se mantuvo en medio DMEM que contenía suero bovino fetal al 20% (FBS) durante tres días para obtener aproximadamente 5 x 10⁶ células de mioblastos por matriz.

20 Los cultivos primarios de fibroblastos sinoviales se prepararon a partir de sinovio diseccionado de conejos de Nueva Zelanda adolescentes. Las células se cultivaron en medio F-12 de Ham suplementado con FBS al 10% (S. Floyd *et al.*, 1997, *Basic Appl Myol.*, 7(3 y 4)).

B. Preparación de mioblastos y células sinoviales a partir de líneas celulares inmortalizadas

30 La línea celular de mioblastos mdx se aisló a partir de un ratón mdx transgénico que porta el antígeno T de SV40 termolábil bajo el control de un promotor inducible (J. Huard *et al.*, 1994, *Human Gene Ther.*, 5:949-958; J. Huard *et al.*, 1994, *J. Clin. Invest.*, 93:586-599). La línea celular mdx permanente prolifera indefinidamente bajo condiciones permisivas (33°C con gamma-interferón) y sufre una diferenciación normal a 37-39°C sin gamma-interferón. La línea de células sinoviales derivadas de conejo inmortalizada HIG-82 (H.I. Georgescu *et al.*, 1988, *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 24:1015-1022) se propagó en medio F-12 de Ham suplementado con FBS al 10%.

C. Comparación de la eficacia de transducción de los diferentes tipos celulares

35 Tras haber preparado todos los tipos celulares (es decir, mioblastos primarios e inmortalizados y células sinoviales primarias e inmortalizadas), se cultivaron 50.000 células de cada tipo en placas de 6 pocillos. Cada pocillo después se incubó durante 48 horas con un vector adenovírico que porta el gen indicador LacZ bajo el control del promotor de citomegalovirus humano (AV-HCMV-LacZ de Genvec) a una multiplicidad de infección de 25 (MOI = 25). Las células después se tiñeron para detectar la presencia de β-galactosidasa utilizando una histoquímica de X-gal. También se cuantificó la cantidad de actividad β-galactosidasa utilizando el ensayo de LacZ (J. Huard *et al.*, 1997, *Human Gene Ther.*, 4:439-450).

D. Diferenciación de mioblastos *in vitro* y tinción de desmina

45 Se dejó que algunos cultivos de mioblastos se diferenciases utilizando un medio de fusión que contenía DMEM suplementado con FBS al 2%. Este medio de fusión reduce la proliferación celular y estimula la fusión de mioblastos. Después de que se hayan formado miotubos en el cultivo también se realizó una tinción de X-gal. Además también se realizó una inmunohistoquímica de desmina (marcador específico del músculo) convencional para validar el índice de miogenicidad de estos cultivos celulares (J. Huard *et al.*, 1995, *Gene Therapy*, 2:1-9; D.K. Booth II *et al.*, 1997, *J. Tissue Eng.*, 32:125-132; J. VanDeutekom *et al.*, *Human Gene Therapy*, 1997).

E. Determinación del destino temprano de las células musculares inyectadas en la articulación de conejos recién nacidos

50 Células sinoviales primarias, células sinoviales inmortalizadas, células musculares primarias y cultivos de mioblastos inmortalizados se infectaron en primer lugar con 25 MOI de AV-HCMV-LacZ durante 24 horas como se describió anteriormente. Después de la infección vírica, las células se enjuagaron y se volvieron a incubar con una dilución 1:1000 de microesferas de látex fluorescentes (FLM) (Microprobes, Inc.) durante 12 horas más. Las FLM son microesferas fluorescentes que son fagocitadas por las células y pueden actuar como otro marcador más para determinar el destino temprano de las células inyectadas en la articulación (A. Satoh *et al.*, 1993, *J. Histochem. Cytochem.*, 41:1579-1582).

- Las células infectadas incubadas con FLM se inyectaron en las rodillas de crías de conejo recién nacidas. Cada matraz de 1×10^6 células se tripsinizó utilizando tripsina al 0,05%-EDTA, se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos, y se resuspendió en 100 μ l de disolución salina equilibrada de Hank (HBSS). Las crías recién nacidas se anestesiaron utilizando un inhalador de metofano durante 1 minuto. Se inyectaron 100 μ l de disolución de células musculares infectadas (1×10^6 células) en la articulación de la rodilla a través del tendón patelar utilizando una aguja de calibre 30. Se empleó un total de 10 crías de conejo: 2 (4 rodillas) fueron inyectados con las células musculares primarias; 2 (4 rodillas) fueron inyectados con las células sinoviales inmortalizadas; 4 (8 rodillas) fueron inyectados con los mioblastos inmortalizados; 1 (2 rodillas) fue inyectado con disolución salina; y 1 (2 rodillas) actuó como control no inyectado de simulación.
- Las crías se sacrificaron cinco días después de la inyección, y las rodillas se retiraron en su totalidad. Las rodillas se congelaron de forma instantánea y se cortaron con un criostato en su totalidad en secciones con 10 μ m de espesor. Se realizaron diversos análisis en estas secciones de rodilla, incluyendo una tinción histológica (hematoxilina-eosina); la detección de β -galactosidasa; la localización de FLM, y un marcaje de inmunofluorescencia de desmina. La distribución de las FLM y la desmina se visualizó utilizando microscopía de fluorescencia (Nikon, Optiphot-2). La colocalización de las FLM y β -galactosidasa se empleó para confirmar la expresión de los transgenes en las células inyectadas. Este marcador adicional minimiza las posibilidades de resultados falsos positivos que a menudo se producen debido a la expresión de LacZ endógeno. Además, se investigó la fusión de los mioblastos en las estructuras intraarticulares utilizando marcaje de desmina.
- Se emplearon conejos recién nacidos para esta fase del análisis porque sus rodillas no empiezan a calcificarse hasta que tienen 15 días. Así, es posible congelarlas de forma instantánea en su totalidad y analizar la rodilla completa de modo sistemático. Este análisis sistemático de secciones cortadas con criostato demuestra que la terapia génica en la rodilla no se había realizado previamente. Esta estrategia permite la caracterización de las diferentes estructuras intraarticulares a las cuales se han adherido las células transducidas.
- F. Determinación de la expresión a largo plazo de las células musculares transducidas inyectadas en las articulaciones de ratones SCID adultos
- Se incubaron 5×10^5 células musculares inmortalizadas transducidas con el vector AV-HCMV-LacZ (MOI = 25) con FLM, se resuspendieron en 10 μ l de HBSS y se inyectaron en las rodillas de 12 ratones SCID adultos (inmunodeficientes). Tres ratones se sacrificaron a los 5, 15, 25 y 35 días después de la inyección. Las rodillas primero se descalcificaron a 4°C en una dilución 50:50 de EDTA 0,5 M y disolución de glucosa 1 M durante 3 días. Después se congelaron de forma instantánea y se cortaron en secciones con un criostato en su totalidad en secciones de 10 μ m de espesor. Se analizó la expresión de β -galactosidasa utilizando una histoquímica de X-gal y se visualizó la localización de las FLM utilizando microscopía de fluorescencia (Nikon Optiphot-2). Se emplearon ratones SCID en este experimento para evitar las potenciales complicaciones inmunológicas asociadas con la primera generación de adenovirus. Se emplearon ratones adultos para asegurarse de que la capacidad de los mioblastos para adherirse a las estructuras intraarticulares fuera reproducible en la rodilla madura.
- Este estudio se subdividió en tres secciones interrelacionadas, que se describen con más detalle en la presente a continuación. En primer lugar se caracterizaron *in vitro* los mioblastos primarios, los mioblastos inmortalizados, las células sinoviales primarias y las células sinoviales inmortalizadas para determinar su eficacia de transducción vírica utilizando un vector adenovírico de primera generación. Esta fase compara los mioblastos con los tipos celulares que ya se están utilizando como vehículos de transporte de genes a las articulaciones.
- Se analizó el destino temprano (5 días después de la inyección) de las células musculares inyectadas en la articulación. Esta segunda fase incluye la evaluación de la viabilidad de las células inyectadas *in vivo*, la determinación de las estructuras internas de la articulación a las cuales se adhieren los mioblastos, la evaluación de la transferencia de genes mediada por mioblastos de β -galactosidasa, y la caracterización de la capacidad de las células musculares para diferenciarse en miotubos y miofibras en la articulación.
- La tercera fase analiza la expresión a largo plazo de la transferencia de genes mediada por mioblastos en la rodilla adulta. Brevemente, un cultivo de células de mioblastos se aísla a partir de una biopsia muscular. Estas células después se transducen *in vitro* con un vector adenovírico que porta el gen indicador LacZ. Los mioblastos transducidos se inyectan en la articulación de la rodilla.
- I) Análisis *in vitro*
- Los cuatro tipos celulares, células sinoviales primarias, células sinoviales inmortalizadas, mioblastos primarios y mioblastos inmortalizados se aislaron, se cultivaron y se transdujeron con el vector AV-HCMV-LacZ *in vitro*. Se observó la expresión de β -galactosidasa en las células sinoviales (figuras 3A y 3B) y en los mioblastos (figuras 3C y 3D) a los 2 días (figuras 3A y 3C) y a los 6 días (figuras 3B y 3D) después de la infección. Sin embargo, cuando se dejó que los mioblastos inmortalizados transducidos se fusionasen en cultivo, se observaron múltiples miotubos multinucleados fusionados que expresaban β -galactosidasa (figura 3D). La tinción fluorescente de desmina positiva (fluorescencia verde - FITC) valida el alto índice de miogenicidad del cultivo de mioblastos (figura 3E).

5 Cuando se analizan los diferentes tipos celulares en el ensayo de LacZ a los dos días después de la infección se obtienen de 2,5 a 5,0 picogramos de β -galactosidasa por un millón de células en las células sinoviales primarias, las células sinoviales puras, y las células musculares primarias. Por contraste, los mioblastos transducidos inmortalizados produjeron más de 20 picogramos de β -galactosidasa por un millón de células. Esto resulta significativamente mayor (ensayos de la t apareados) que con los otros tipos celulares, $p < 0,05$ (figura 3F). Además, la transducción de mioblastos y células sinoviales con un adenovirus que transporta la expresión de IL-1 Ra también conduce a una mayor producción de IRAP por las células de mioblastos que por las células sinoviales (figura 4).

II) Determinación del destino temprano de las células musculares inyectadas en la articulación

10 El estudio histológico de secciones de rodilla de conejo recién nacido demuestra que los mioblastos inyectados se habían fusionado con la mayoría de las estructuras de la rodilla. El trasplante de células sinoviales transducidas hacia la rodilla produce β -galactosidasa, pero sólo en algunas partes del revestimiento sinovial (S) de la articulación. Sin embargo, si se inyectan mioblastos primarios, se descubre que numerosos tejidos de la articulación, concretamente, el sinovio (S), el menisco (M), y el ligamento contienen células que expresan β -galactosidasa. Con la tinción de desmina (fluorescencia verde - FITC) se detectaron muy pocos miotubos en la articulación inyectada con mioblastos primarios.

15 El bajo nivel de transferencia génica mediada por la inyección de mioblastos primarios puede ser atribuido a una disminución en el número de células musculares y también a la población heterogénea de células en estos cultivos (fibroblastos, adipocitos, etc.). De hecho, se logró una mejor complementación de genes en células musculares *in vitro* utilizando el cultivo de mioblastos inmortalizados, comparado con el cultivo de mioblastos primarios que contiene otros tipos celulares. Para validar esta hipótesis se investigaron mioblastos de una línea celular inmortalizada utilizando una estrategia *ex vivo* similar.

20 El trasplante de mioblastos inmortalizados produce grandes parches de células musculares que expresan β -galactosidasa en el revestimiento sinovial adyacente a la zona patelar. Con la tinción de inmunofluorescencia de desmina se visualizaron múltiples miofibras y miotubos fusionados en la misma área. Algunos de los miotubos se observan longitudinalmente, y otros se observan en sección transversal (estructuras circulares redondeadas). Estos miotubos y miofibras se han formado con seguridad por la fusión de los mioblastos transplantados debido a la colocalización de FLM y las células positivas a desmina. Además, algunos mioblastos inyectados se adhieren al ligamento patelar y expresan β -galactosidasa dentro de las estructuras ligamentosas estriadas. En esta misma área aparecieron múltiples miotubos largos teñidos para la desmina, lo cual demuestra la presencia de células miogénicas en este emplazamiento.

25 La mayoría de las rodillas muestra una propensión a que los mioblastos se congreguen y se fusionen en la cápsula articular del hueso lateral femoral. En contraste con las inyecciones de células sinoviales y mioblastos primarios, los mioblastos inmortalizados fueron capaces de producir grandes parches de miotubos y miofibras que expresan β -galactosidasa en la cápsula articular. También se observaron grandes parches desorganizados de miofibras que expresan desmina colocalizadas con FLM en el mismo emplazamiento. Esto resulta totalmente diferente de los músculos extracapsulares normales *in vivo*, que también se tiñen en positivo para la desmina pero no presentan FLM. Con un mayor aumento, se observaron secciones transversales de fibras musculares positivas a desmina de gran diámetro colocalizadas con FLM en esta cápsula articular (Day *et al.*, 1997 J. Orthop. Res., 15, 894-903).

30 En partes de los ligamentos cruzados localizados en la fosa femoral (FN), se observa la presencia de mioblastos que expresan β -galactosidasa después del trasplante de mioblastos inmortalizados a la articulación. Sin embargo, se detectan células positivas a desmina más pequeñas y con forma más irregular, lo cual sugiere la presencia de mioblastos que aún no se han diferenciado en miofibras. A un mayor aumento, todavía pueden visualizarse secciones transversales de pequeños miotubos que contienen FLM en la fosa femoral.

III) Determinación de la expresión a largo plazo de células musculares inyectadas en la rodilla de ratón adulto

45 Cuando se inyectan mioblastos inmortalizados transducidos en la rodilla de ratones SCID adultos, también se observa transferencia de genes mediada por mioblastos del gen indicador LacZ en diversas estructuras de la rodilla, que incluyen el sinovio, la cápsula, y los tejidos en la fosa femoral. Se observa producción de β -galactosidasa colocalizada con FLM a los 35 días después de la inyección. En el grupo de 35 días, se observan grandes agregados de estructuras redondeadas que sugieren la presencia de miotubos y miofibras que producen β -galactosidasa en la fosa femoral, el sinovio y la cápsula articular.

50 La inyección directa de las células musculares transducidas en las estructuras intraarticulares conduce a un alto nivel de transferencia génica en el menisco y el ligamento cruzado anterior. Las figuras 5A-5D muestran los resultados de la transferencia génica *ex vivo* mediada por mioblastos en el menisco de conejo. Se inyectaron mioblastos transducidos con un vector adenovírico que porta el gen que codifica la β -galactosidasa (LacZ) en el menisco de conejo. Las figuras 5A y 5B muestran la expresión de LacZ en el menisco después de la inyección y la expresión de β -galactosidasa. La figura 5C demuestra que la tinción de LacZ está colocalizada con microesferas de látex fluorescentes en el área inyectada. La figura 5D muestra la expresión de desmina, un marcador miogénico (fluorescente verde).

Las figuras 6A y 6B muestran los resultados de la transferencia génica *ex vivo* mediada por mioblastos al ligamento ACL de conejo. Se inyectaron en el ligamento de conejo mioblastos transducidos con un vector adenovírico que porta el gen que codifica la β -galactosidasa (LacZ). Las figuras 6A y 6B muestran la expresión de LacZ en el ligamento después de la inyección y la expresión de β -galactosidasa. La figura 6C demuestra que la tinción de LacZ está colocalizada con microesferas de látex fluorescentes en el área inyectada. La figura 6D muestra la expresión de desmina, un marcador miogénico (fluorescente verde), que revela la presencia de células musculares en el ligamento.

Los datos *in vitro* detallan los efectos de numerosos factores del crecimiento sobre la proliferación de fibroblastos y la producción de colágeno. De hecho, según la presente invención, se ha observado que el factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor del crecimiento epidérmico (EGF), el factor del crecimiento transformante- α (TGF- α), y el factor del crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) mejoran la proliferación de los fibrocondrocitos del menisco y su expresión de colágeno y de proteínas que no son colágeno.

Independientemente del factor del crecimiento empleado para la curación del menisco, el problema principal del transporte de proteínas debe solucionarse. No es probable que inyecciones directas intrameniscales de la proteína del factor del crecimiento recombinante produzcan unos niveles sostenidos sin que sean necesarias múltiples inyecciones, un escenario que no resulta clínicamente apropiado. Un transporte eficaz y sostenido de los factores del crecimiento deseados puede lograrse mejor con el transporte génico. Tal como se describe en la presente, el transporte génico *ex vivo* mediado por células musculares ofrece la posibilidad de una expresión génica sostenida de alto nivel.

La estrategia *ex vivo* mediada por células musculares también se empleó para transportar genes marcadores al menisco de conejo. Los resultados demuestran que las células derivadas del músculo pueden utilizarse como vehículo de transporte de genes al menisco (figuras 5A-5D). La capacidad de las células derivadas del músculo para ser utilizadas como depósito de moléculas secretoras para potenciar la curación del menisco y la capacidad de algunas poblaciones de células derivadas del músculo para diferenciarse en diversos linajes permite a estas células participar en el proceso de curación del menisco. Estos descubrimientos pueden conducir a nuevas terapias para lesiones del menisco, que eviten la significativa morbilidad de estas lesiones crónicamente incapacitantes.

Además, la capacidad del cartílago del menisco para curarse en la porción central avascular del menisco es muy limitada, y esto probablemente está relacionado directamente con el suministro de sangre, que existe sólo en el tercio periférico del menisco. Estudios experimentales han demostrado que el proceso de curación en la parte central del menisco puede ser estimulado por algunos estímulos quimiotácticos o mitogénicos suministrados por un punto de fibrina o el tejido sinovial. Es probable que el uso del factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF), que estimula la angiogénesis, sea beneficioso para mejorar la curación del menisco. La figura 12 presenta un esquema de una construcción de virus adenoasociado que transporta la expresión de VEGF para el transporte a través de la terapia génica y la ingeniería de tejidos basadas en células musculares.

IV) Uso de células musculares para transportar genes en un defecto del cartílago

El cartílago articular tiene una capacidad limitada para repararse después de una lesión. Los defectos en el cartílago articular que no penetran en el hueso subcondral no pueden curarse con eficacia y dan como resultado la degeneración del cartílago articular. Por otra parte, las lesiones que penetran en el hueso subcondral producen la formación de fibrocartilago o cartílago de tipo hialino que es diferente del cartílago articular normal, y en último término conduce a la degeneración del cartílago de la articulación. Se emplearon células musculares para transportar genes a un defecto del cartílago (figura 14).

Además, también puede utilizarse la transposición de un colgajo de músculo a un defecto del cartílago para mejorar la curación del cartílago (figura 13). Se contempla que la terapia génica y la ingeniería de tejidos basadas en células musculares puedan utilizarse para mejorar la curación de un defecto en el cartílago articular. El uso de virus adenoasociados que codifican moléculas tales como BMP-2, VEGF, e IGF-1, puede mejorar aún más la curación del cartílago articular, según se muestra en la representación esquemática de la figura 12.

Además, muchos trastornos musculoesqueléticos adquiridos pueden tratarse con los nuevos vehículos, que transportan genes y su expresión de forma segura y eficaz, concretamente la artritis degenerativa, los daños en el cartílago, los daños en ligamentos, las uniones retrasadas o la falta de uniones en fracturas, el osteosarcoma y diversas enfermedades reumatóides. Puesto que en la articulación de la rodilla es donde se producen muchos de estos trastornos, una terapia génica mejorada para la articulación, por ejemplo, en forma de un sistema de transporte de fármacos, resulta importante y necesaria en la técnica.

Ejemplo 10

Este ejemplo indica los experimentos que se realizaron para demostrar el uso y las ventajas de la transferencia de genes mediada por mioblastos para mejorar un defecto óseo.

Se empleó una línea celular de mioblastos aislada de un ratón mdx transgénico que porta un antígeno T de SV40 termolábil bajo el control de un promotor inducible (J.E. Morgan *et al.*, 1994, *Dev. Biol.*, 162:486-498). La línea

celular mdx inmortalizada prolifera indefinidamente a 33°C con gamma-interferón y sufre una diferenciación normal a 37-39°C sin gamma-interferón. Estos mioblastos se mantuvieron en cultivo celular y se infectaron con el vector adenovirico-LacZ (MOI = 25). Las células también se incubaron con microesferas de látex fluorescentes (FLM) que actúan como otro marcador mediante el cual se puede seguir el destino de estas células en el defecto óseo. Antes de la inyección se analizaron algunos matracas que contenían las células transducidas para la producción de β -galactosidasa y la expresión de desmina mediante tinción de inmunofluorescencia.

Se colocaron de modo quirúrgico fijadores externos en las tibias derechas de 8 conejos adultos. Se creó un defecto óseo tibial de 0,7-1 cm en el conejo mediante una osteotomía entre el segundo y el tercer perno del fijador externo. Se tripsinizaron 7×10^6 mioblastos transducidos y se inyectaron en el músculo que rodea al defecto óseo durante la osteotomía. También se inyectó el mismo número de mioblastos transducidos por vía percutánea en el defecto óseo 24 horas después de la osteotomía. Un conejo osteotomizado no recibió las inyecciones de mioblastos y actuó como control de simulación. Los animales se sacrificaron a los 6 días después de la inyección, y la pierna completa con el fijador externo colocado se analizó de modo macroscópico para la expresión de lacZ. El tejido en el defecto y los músculos circundantes entonces se congelaron de modo instantáneo, se cortaron con un criostato, se ensayaron para la β -galactosidasa mediante una histoquímica y para la desmina mediante inmunofluorescencia según se describe en C.S. Day *et al.*, 1997, J. Orthop. Res., 15:894-903). Las FLM se localizaron utilizando microscopía de fluorescencia.

Todos los defectos tibiales de los conejos inyectados con mioblastos transducidos mostraron producción de β -galactosidasa de modo macroscópico en los músculos que rodean al defecto y en el propio defecto. Por contraste, el defecto control operado de modo simulado no mostró producción de β -galactosidasa. Cuando el tejido en el defecto se cortó con un criostato y se analizó de modo microscópico para la expresión de lacZ, se observaron muchas células redondeadas que producían β -galactosidasa en medio de los fibroblastos, mucho más pequeños. Además, cuando se analiza al mismo tiempo bajo microscopía de fluorescencia, numerosas FLM fueron colocalizadas con las miofibras redondeadas que expresan el gen indicador LacZ. También se observó expresión de LacZ en los músculos que rodean al defecto que había recibido las inyecciones de mioblastos en el día 7 después de la inyección.

El tejido del defecto cortado en secciones también se analizó para la expresión de desmina, y muchas áreas en el hueso inyectado que expresan desmina también se colocalizaron con FLM. La tinción de desmina es indicativa de la presencia de células musculares que se han fusionado en miofibras en el área no muscular del defecto segmental óseo. Así, los mioblastos han transportado con éxito el gen marcador al defecto óseo, el producto de proteína se ha expresado, y se han formado miofibras, permitiendo así la persistencia de la expresión del producto génico en las células de los miotubos fusionadas derivadas de las células de mioblastos genéticamente modificadas inyectadas en el hueso.

Ejemplo 11

Para confirmar que una población de células en el músculo esquelético es capaz de diferenciarse en hueso, poblaciones variables de células derivadas del músculo se estimularon con la proteína de BMP-2 y se analizaron para determinar la diferenciación osteogénica *in vitro* según se describe a continuación.

Los cultivos de células primarias se obtuvieron de un ratón mdx adulto (T.A. Rando y H.M. Blau, 1994, J. Cell. Biol., 125:1275-1287). Brevemente, el ratón se eutanizó mediante dislocación cervical e inmediatamente se diseccionaron y trituraron aproximadamente 500 mg del músculo de la pata trasera. El músculo se digirió de forma enzimática mediante una incubación en serie con colagenasa al 0,2%, dispasa (2,5 unidades/ml) y tripsina al 0,1%, cada una durante 1 hora a 37°C. Cualquier agregación celular remanente se disgregó mediante un pase a través de una aguja de calibre 20. Las células entonces se cultivaron en matracas revestidos con colágeno en medio F10 de Ham (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), suplementado con suero de caballo al 10%, suero bovino fetal al 10%, penicilina/estreptomina al 1%, y bFGF (humana recombinante, Life Technologies). Las células se subdividieron según sus características de adhesión celular mediante el pase en serie del sobrenadante celular hacia un nuevo matraz después de que aproximadamente 15-20% de las células se adhirieran al matraz. Esta técnica, denominada precultivo, se describe en el ejemplo 1, "Purificación de mioblastos primarios", en la presente. Este procedimiento se repitió seis veces, produciendo seis precultivos. Las células que se adhirieron a los matracas en una fase más temprana permanecieron en los precultivos de números más bajos, mientras que las que pasaron junto con los sobrenadantes en serie se adhirieron en los cultivos de números más altos. Los fibroblastos se adhieren con más rapidez que los mioblastos bajo las condiciones de este procedimiento; así, los precultivos de números más altos están enriquecidos en mioblastos.

Las diferentes subpoblaciones de células se cultivaron a 2×10^4 /pocillo en placas de 12 pocillos. Las células de cada precultivo se incubaron en medio o en medio suplementado con BMP 50 ng/ml o 200 ng/ml. La BMP se añadió a los pocillos apropiados a los 1, 3 y 5 días después del cultivo. Se obtuvo un lisado celular a las 24 horas después de la última estimulación con BMP-2 para el ensayo de la actividad fosfatasa alcalina. Las células que respondieron mejor se volvieron a estudiar bajo una estimulación con 100 ng/ml de BMP-2 a lo largo de la misma cantidad de tiempo. Para estudiar el efecto de la estimulación con BMP-2 a lo largo del tiempo, se retiró una porción de las células después de cada adición de BMP-2 para el análisis de la expresión de desmina y la actividad ALP.

El análisis de la expresión de desmina en las células se realizó mediante técnicas convencionales de inmunohistoquímica. Las células se fijaron en metanol frío durante 1 minuto, se enjuagaron en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y se bloquearon con suero de caballo al 10% durante 1 hora. Las células entonces se incubaron con una dilución 1/100 de anticuerpo anti-desmina de ratón (Sigma) durante 6-10 horas a 37°C. Después de los enjuagues con PBS, las células se incubaron con una dilución 1/100 de anticuerpo anti-ratón conjugado con el marcador fluorescente Cy3 (Sigma) durante 1 hora. Entonces se evaluó la tinción con un microscopio de inmunofluorescencia (Nikon). Los datos se cuantificaron estudiando cinco campos diferentes con un aumento de 10x y se contaron las células positivas y negativas para establecer una proporción. Se determinó la actividad fosfatasa alcalina (en U/l) mediante la hidrólisis de fosfato de p-nitrofenilo a p-nitrofenol y fosfato inorgánico utilizando un reactivo y un protocolo disponibles en el mercado (Sigma). Cuando resultó apropiado, se realizó un análisis estadístico mediante un ensayo de ANOVA para una diferencia estadística mayor que 95% de intervalos de confianza.

Los resultados demuestran que, antes de la estimulación con BMP-2, las diferentes subpoblaciones de células derivadas del músculo se caracterizan por una tinción de desmina. Para los cultivos de células, las células en el precultivo nº 1 se tiñeron 3% positivas a desmina, frente a 70,5% positivas a desmina en el precultivo nº 6. El porcentaje de células positivas a desmina aumenta con incrementos estadísticamente significativos entre el precultivo nº 3 y el precultivo nº 5, y entre el precultivo nº 5 y el precultivo nº 6. Resulta interesante que las células que tienen el mayor nivel de positividad a desmina tienden a aparecer redondas y se dividen con más lentitud que las presentes en los precultivos más tempranos.

Después de la estimulación con BMP-2, las subpoblaciones de células se ensayaron para la inducción de la fosfatasa alcalina, un indicador bioquímico de la actividad osteoblástica (A.I. Caplan, 1991, J.Orthop. Res., 9:641-650). Se empleó una población derivada de ratón de células estromáticas como control positivo. Las células derivadas del músculo que no recibieron BMP-2 no expresan actividad ALP. Sólo la subpoblación obtenida del precultivo nº 6 muestra un aumento en la actividad ALP en respuesta a la estimulación con BMP-2. Se observó una tendencia dependiente de la dosis cuando se comparan los datos para el precultivo nº 6 utilizando BMP-2 a una concentración de 50 ng/ml frente a 200 ng/ml (figura 9).

Correspondiente a un aumento en la actividad ALP en respuesta a la estimulación con BMP-2 en el precultivo nº 6, el porcentaje de células positivas a desmina disminuye (figura 10). Después de una única dosis de BMP-2, el porcentaje de células positivas a desmina en el precultivo nº 6 disminuye desde 70,5% a 47%. Dosis adicionales de 100 ng/ml de BMP-2 no provocaron una disminución tan grande; el nivel de células positivas a desmina permaneció en aproximadamente 40%.

Además, diferentes poblaciones de células derivadas del músculo se aislaron a partir de una biopsia muscular humana y se purificaron mediante la técnica del precultivo. Cuando se estimulan con BMP-2 según se describió anteriormente, las células de algunos de los precultivos (es decir, pp2, pp3, y pp4 en menor medida) expresan fosfatasa alcalina (marcador para preosteoblastos). Por tanto, según la invención, las células derivadas de músculo humano puede aislarse y purificarse, y se ha demostrado que tienen características de células pluripotenciales.

Las células aisladas del músculo esquelético son capaces de responder a la BMP-2 recombinante humano (rhBMP-2) *in vitro* e *in vivo*. Las células miogénicas de roedor primarias en cultivo celular responden de una manera dependiente de la dosis a rhBMP-2 produciendo fosfatasa alcalina, una proteína osteogénica. Además, cuanto más pura sea la población de células miogénicas, tal como evidencia la tinción de desmina, mayor es la producción de fosfatasa alcalina. La BMP-2 humana recombinante inhibe la diferenciación miogénica, puesto que estimula la diferenciación osteoblástica de las células derivadas del músculo (A. Yamaguchi *et al.*, 1991, J. Cell Biol., 113:681-687; T. Katagiri *et al.*, 1994, J. Cell Biol., 127:1755-1766; K. Kawasaki *et al.*, 1998, Bone, 23:223-231). Por consiguiente, los datos *in vitro* sugieren que las células miogénicas son capaces de responder al rhBMP-2 y entrar en el linaje osteogénico.

Se modificaron células derivadas del músculo de roedores primarias para que produjeran hueso intramuscular *in vivo*. Se empleó la estrategia *ex vivo* para transducir las células derivadas del músculo primarias con un adenovirus que porta el ADNc de BMP-2. Una inyección intramuscular con tan pocas células transducidas como 300.000 produce hueso en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID). El hueso producido contiene elementos osteoides y de médula ósea, según se evidencia por una histología regular y una tinción de von Kossa para la mineralización. No sólo las células musculares transducidas produjeron BMP-2, sino que las células inyectadas también respondieron a la BMP-2 produciendo hueso.

Además, las células derivadas del músculo modificadas dentro de cámaras de difusión (véase el ejemplo 1), que evitan la entrada de células del hospedante debido a su tamaño de poro, produjeron hueso cuando se implantan de modo subcutáneo en ratones inmunodeficientes. Estos resultados sugieren que estas poblaciones específicas de células derivadas del músculo son capaces de producir hueso (figura 11). La capacidad de las células para diferenciarse en otros linajes, tales como hueso, apoya la naturaleza pluripotencial de estas células derivadas del músculo, es decir, células precursoras derivadas del músculo.

Tal como se describió anteriormente en la presente, la técnica de precultivo proporciona un medio para lograr

diferentes poblaciones de células derivadas del músculo en diferentes precultivos. Con el precultivo selectivo de células se logró la formación de hueso (por ejemplo, figura 11), lo cual sugiere con fuerza la presencia de células precursoras musculares. La tabla 6 resume la expresión de diferentes marcadores por las células derivadas del músculo de ratón purificadas.

5

Tabla 6

Tipo celular	Mdx pp nº 6	Normal pp nº 6	Fibroblastos
Desmina	+	+	-
Bcl2	+	+	-
CD34	+	+	-
MyoD	+/-	+/-	-
Miogenina	+/-	+/-	-
M-cadherina	-/+	-/+	-
MyHCs	(+)	(+)	-

10

En la tabla 6, las células mdx pp nº 6 y normales pp nº 6 se derivaron del músculo de la pata trasera de ratones mdx y normales recién nacidos, respectivamente, mediante la técnica de precultivo según se describe en la presente. “+” indica que más del 95% de las células en el cultivo expresan altos niveles del antígeno. “+/-” indica que aproximadamente 60% o 30% de las células en el cultivo expresan el antígeno de MyoD o miogenina, respectivamente. “-/+” indica que menos del 10% de las células en el cultivo expresan M-cadherina, y “(+)” indica que más del 95% de las células en el medio de fusión de tres días expresa la isoforma de cadena pesada de miosina (MyHCs).

15

Además de la estrategia *ex vivo*, una transferencia génica directa mediada por adenovirus de BMP-2 produce grandes cantidades de hueso intramuscular. Por consiguiente, los datos *in vitro* e *in vivo* apoyan la hipótesis de que las células musculares pueden modificarse para convertirse en células osteogénicas. Las ramificaciones de las capacidades de las células miogénicas para formar hueso son inmensas. De hecho, la capacidad del adenovirus que transporta la expresión de BMP-2 para inducir la formación de hueso ectópico radiográfico e histológico a las 2, 3 y 4 semanas después de la inyección sugiere que un colgajo de músculo podría utilizarse como andamiaje biológico con la capacidad de mejorar la curación de tejidos duros, incluyendo el hueso y el cartílago. De hecho, el uso de un colgajo de músculo tratado con adenovirus-BMP-2 puede ser capaz de mejorar la curación del hueso.

20

25

Puesto que el uso de vectores adenovíricos puede verse impedido por las respuestas inmunológicas contra los vectores, se ha determinado que es necesario el uso de un vector menos inmunogénico para mejorar la formación de hueso utilizando el músculo como andamiaje biológico. Por tanto, se ha empleado un virus adenoasociado como nuevo vector vírico para mejorar la eficacia de la transferencia de genes hacia el músculo esquelético maduro. Este vector puede emplearse para transportar BMP-2 hacia un colgajo de músculo para mejorar la curación del hueso. En la figura 12 se presenta una representación esquemática del plásmido utilizado para construir un virus adenoasociado para transportar la expresión de BMP-2.

30

Las ingeniería de tejidos basada en el músculo para producir hueso puede aplicarse a múltiples anomalías esqueléticas. Uno de estos escenarios son los grandes defectos óseos que aparecen tras un traumatismo o resecciones oncológicas. Pueden emplearse células derivadas del músculo capaces de producir la formación de hueso para reconstruir el defecto óseo y minimizar el uso de autoinjertos, aloinjertos, y distracción ósea. Un colgajo de músculo puede modificarse para que produzca hueso y, así, reconstruir un defecto óseo experimental. Ambas terapias génicas *ex vivo* e *in vivo* pueden modificarse para lograr la formación de hueso y para reconstruir defectos óseos.

35

Otra estrategia es transformar el músculo, restringido a los confines de un molde de silicona, en hueso con una geometría deseada, tal como un fémur proximal o la diáfisis media de la tibia (R.K. Khouri *et al.*, 1991, JAMA, 266:1953). La estrategia basada en el músculo para la reconstrucción de defectos óseos es especialmente atractiva a la luz de la poca vascularidad habitual de los defectos óseos traumáticos y oncológicos. La combinación de músculo vascularizado y formación ósea *de novo* ofrece posibilidades revolucionarias para la reparación ósea.

40

Ejemplo 12

Este ejemplo proporciona una aplicación típica y muy práctica de la terapia génica y la ingeniería de tejidos mediadas por células derivadas del músculo para el tratamiento de una disfunción del tracto urinario en pacientes humanos.

45

La capacidad de realizar el transporte de genes hacia el tracto urinario inferior ya ha sido demostrada. Además, se ha demostrado que la terapia génica mediada por mioblastos tiene más éxito para transportar iNOS que la utilización

de métodos de infección/transfección directa de virus o plásmidos.

5 La utilidad clínica directa de la presente descripción ofrece a los expertos en la técnica la capacidad de tratar pacientes de modo sencillo, seguro y eficaz con consultas externas, e incluso en la consulta del médico. Por ejemplo, en una consulta de urología, los pacientes con incontinencia urinaria de esfuerzo se someten a una simple aspiración del músculo con una aguja, por ejemplo, el tríceps, que dura menos de 5 minutos.

10 Las células musculares se cultivan bajo las condiciones de cultivo celular apropiadas en un laboratorio, preferiblemente un laboratorio de un centro de biotecnología. Esta etapa tarda aproximadamente 1-4 semanas. Las células musculares cultivadas, que ahora han aumentado mucho su número, se vuelven a enviar al médico encargado y después se vuelven a inyectar en el paciente mediante un breve procedimiento endoscópico externo de 10 minutos. La inyección se realiza utilizando un cistoscopio pequeño y una aguja cistoscópica. A la vista directa del médico, la punta de la aguja se inserta en el mecanismo del esfínter uretral y la suspensión de mioblastos se inyecta en la pared uretral para provocar la coaptación y el cierre uretral.

15 Los mioblastos cultivados pueden congelarse y conservarse indefinidamente para posibles usos futuros. Según se ha descrito, las células derivadas del músculo también pueden utilizarse para una terapia génica mediada por células con diversos factores tróficos para aumentar y/o potenciar el tratamiento y los procesos de reparación en un tejido concreto. También pueden realizarse procedimientos similares de inyección de mioblastos y terapia génica en la vejiga de pacientes con contractilidad alterada de la vejiga.

20 No es necesario extraer un número grande de células del paciente, si las células posteriormente se colocan en cultivo en donde proliferarán y aumentarán su número antes de la inyección. Para la inyección, el número de células utilizadas puede ser determinado por el médico utilizando los conocimientos habituales, dependiendo de la lesión específica, de la enfermedad o disfunción que se va a tratar, del tejido u órgano que se va a inyectar, y de la construcción génica utilizada. En general, se emplea un menor número de células para los procedimientos de transporte génico/terapia génica, mientras que se emplea un mayor número de células para la ingeniería de tejidos y el relleno, es decir, del orden de aproximadamente 1×10^4 a aproximadamente 1×10^4 , preferiblemente de
25 aproximadamente 1×10^4 a aproximadamente 1×10^6 para el transporte génico. Si el número de células es demasiado bajo para producir una cantidad eficaz de producto génico en el sitio de la inyección, o cerca de este, pueden realizarse con facilidad varias inyecciones y pueden administrarse según sea necesario.

30 Se ha descubierto que las células derivadas del músculo inyectadas permanecen en el sitio de la inyección, o cerca de este, en la vejiga, uretra, pene, músculo de la pierna, articulaciones de la rodilla y hueso, por ejemplo. Además, la histología de diversos tejidos después de la inyección no ha mostrado una significativa formación de tejido cicatricial, aunque se hayan utilizado células alogeneicas. Con las células derivadas del músculo autólogas, la formación de tejido cicatricial fue prácticamente nula.

35 En el sitio de la inyección y cerca de este, los mioblastos inyectados se fusionan y forman miotubos basándose en la cantidad de espacio circundante. Después de que las células hayan rellenado el área en el sitio de la inyección, las miofibras formadas y las células ya no proliferan ni crecen. La miofibra multinucleada permanece casi del mismo tamaño después de que se haya formado y no prolifera ni muere. Así, a largo plazo, la miofibra produce y segrega de forma estable el producto génico del gen codificador transportado y expresado en el área de la inyección.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Chancellor, Michael B.
 Huard, Johnny
 University of Pittsburgh
- 5 <120> Transporte de genes mediado por células derivadas del músculo para tratar lesiones o disfunciones relacionadas con el músculo y el hueso
- <130> SEQ LIST PARA 2710-4007PCT
- <140> 2710-4007PCT
 <141> 03-04-1999
- 10 <150> documento US 60/083.917
 <151> 01-05-1998
- <160> 2
- <170> PatentIn Ver. 2.0
- <210> 1
- 15 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
- <300>
- 20 <301> Tzeng, E. *et al.*
 <303> Molecular Medicine
 <304> 2
- <306> 211-225
 <307> 1996
- <400> 1
- 25 aggacatcct gcggcagc 18
- <210> 2
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
- 30 <400> 2
- gcttaaccc ctctgta 18

REIVINDICACIONES

- 1.- Mioblastos autólogos para su uso en un método *in vivo* de reparación del músculo del esfínter urinario.
- 2.- Los mioblastos autólogos según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en el que dichos mioblastos se introducen en una cantidad eficaz para mejorar la incontinencia urinaria de esfuerzo.
- 5 3.- Los mioblastos autólogos según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 para su uso según la reivindicación 1, en el que los mioblastos comprenden un medio fisiológicamente aceptable.
- 4.- Los mioblastos autólogos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso según la reivindicación 1, en el que los mioblastos se introducen en una cantidad de aproximadamente 10^5 a 10^6 células por cm^3 de tejido que se va a tratar, en un medio fisiológicamente aceptable.
- 10 5.- Los mioblastos autólogos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso según la reivindicación 1, en el que los mioblastos se ponen en contacto con una citoquina o un factor del crecimiento seleccionado de uno o más de factor del crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF), factor del crecimiento de tipo insulínico (IGF), o factor del crecimiento nervioso (NGF), antes de introducir dichos mioblastos en el receptor.



FIG. 1A



FIG. 1D



FIG. 1G

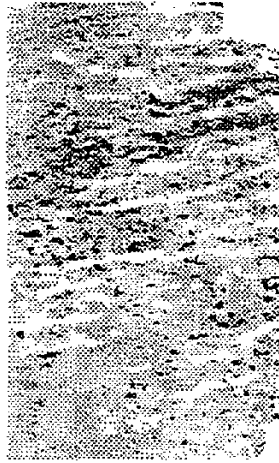


FIG. 1B



FIG. 1E

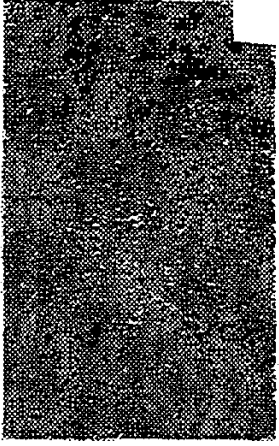


FIG. 1H

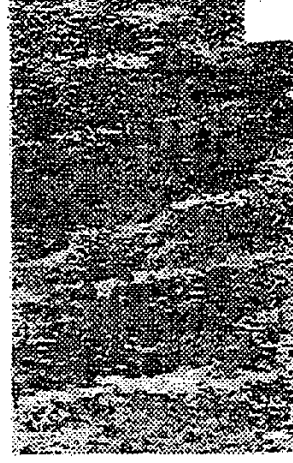


FIG. 1C

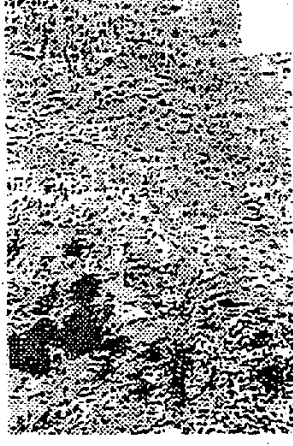


FIG. 1F

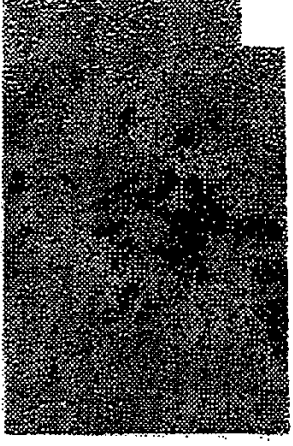


FIG. 1I

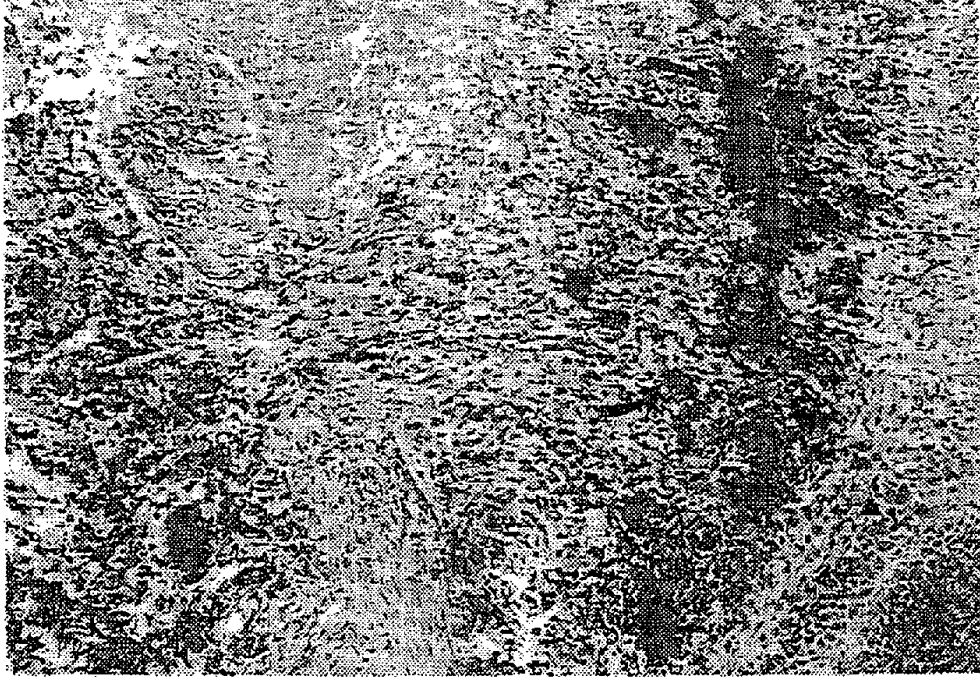


FIG. 2

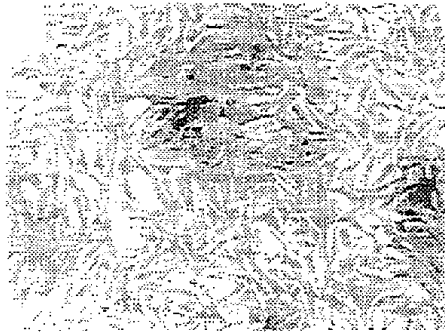


FIG. 3A

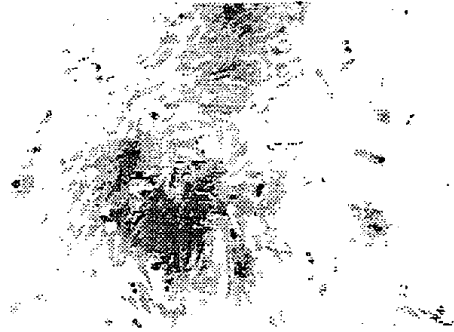


FIG. 3B

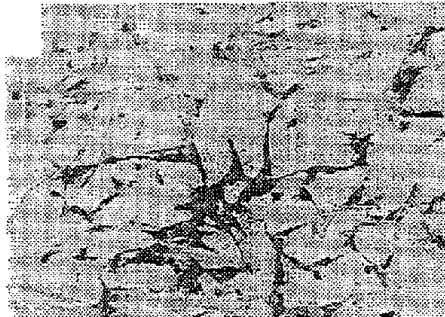


FIG. 3C



FIG. 3D

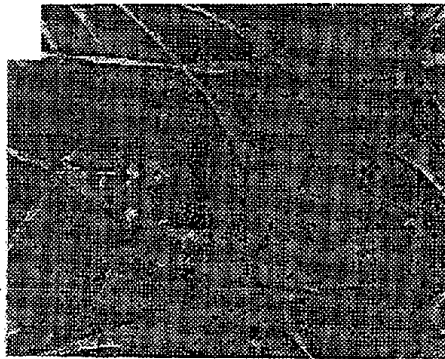


FIG. 3E

EFICACIA DE LA TRANSDUCCIÓN
IN VITRO CON ADENOVIRUS,
2 DÍAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN

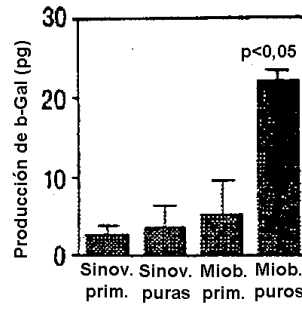


FIG. 3F

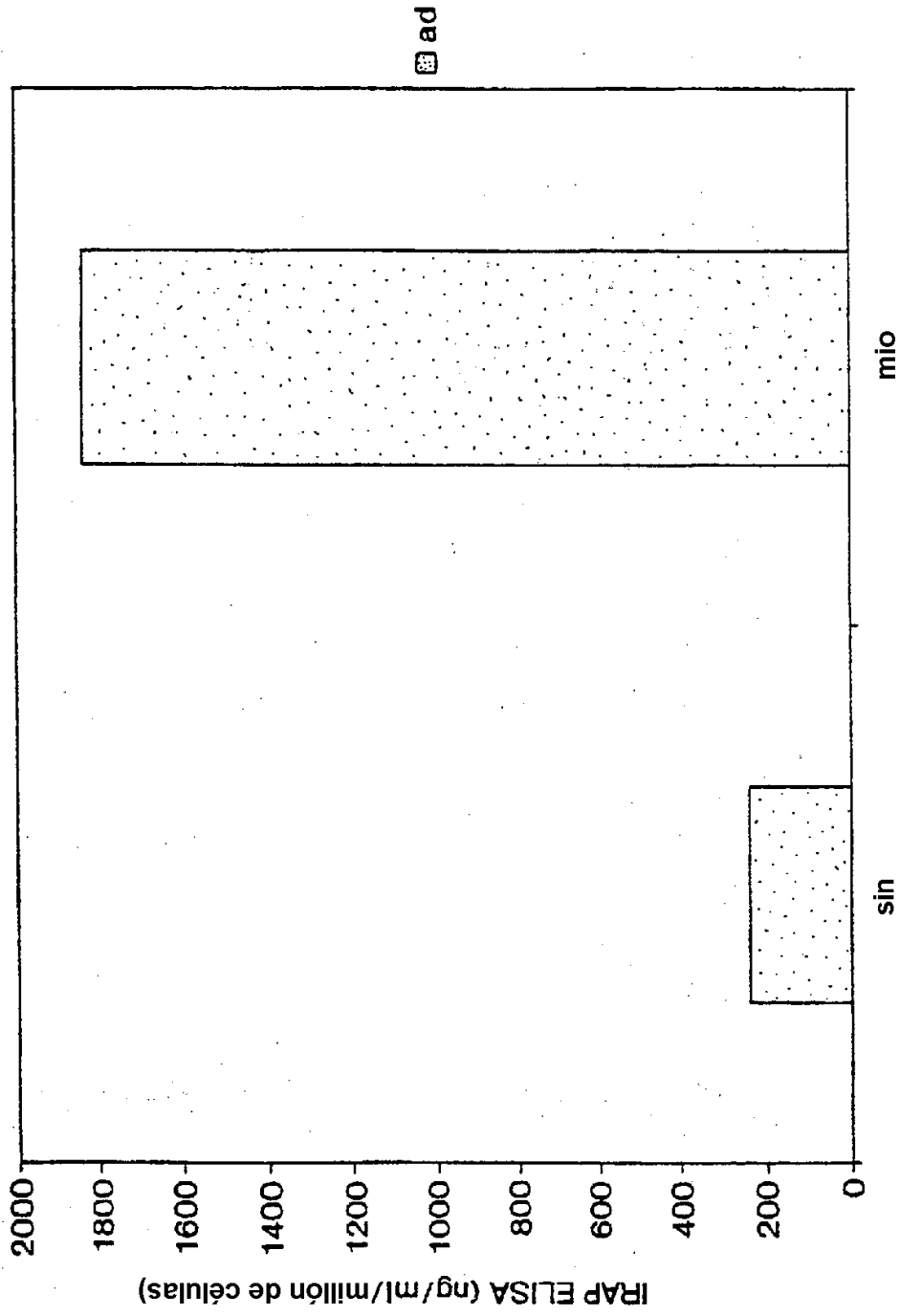


FIG. 4

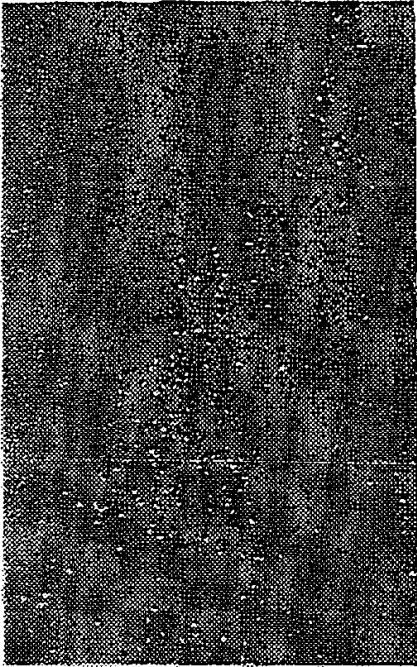


FIG. 5B

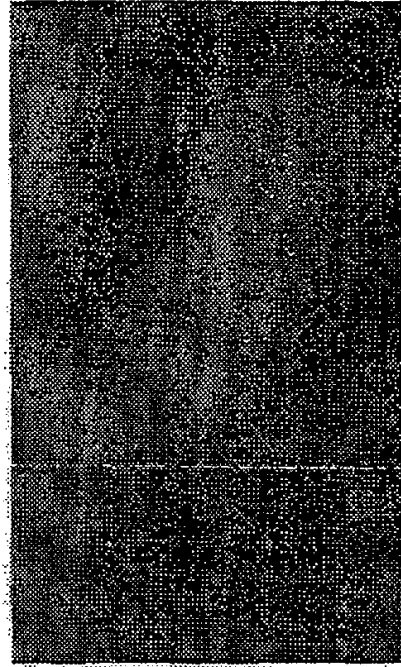


FIG. 5D



FIG. 5A



FIG. 5C



FIG. 6B

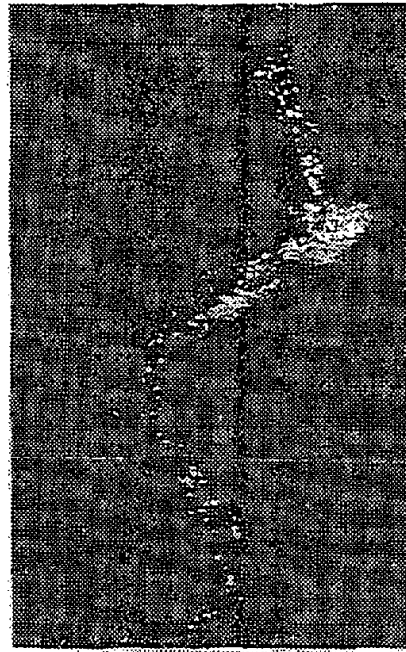


FIG. 6D



FIG. 6A

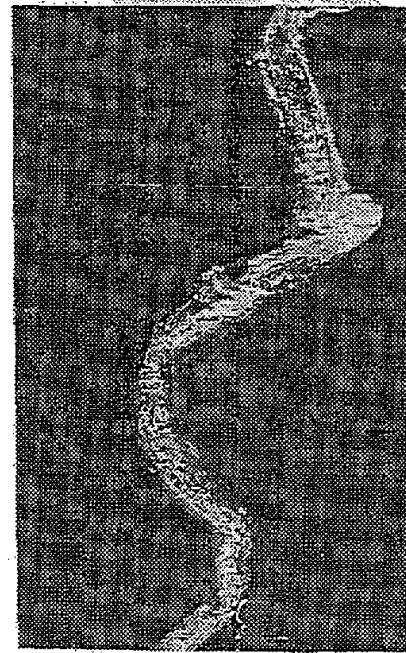


FIG. 6C

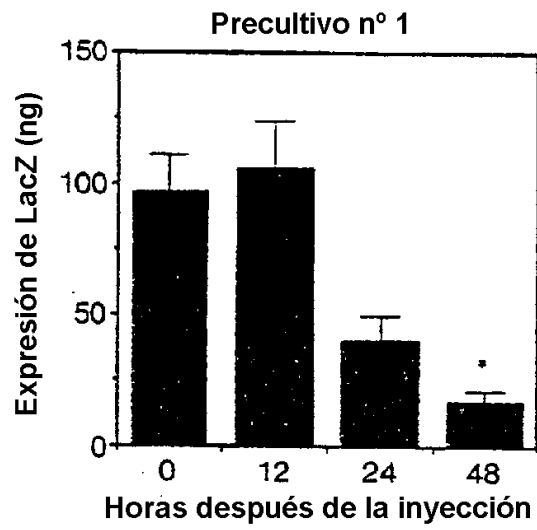


FIG. 7A

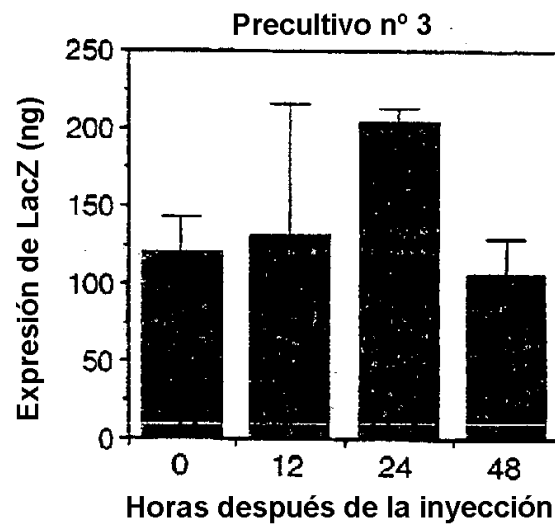


FIG. 7B

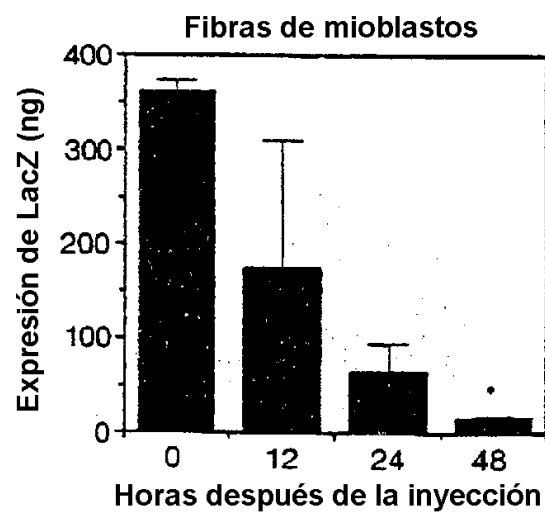
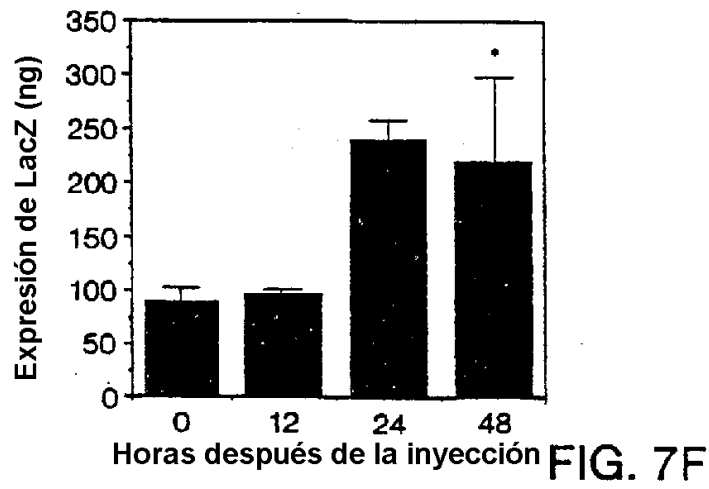
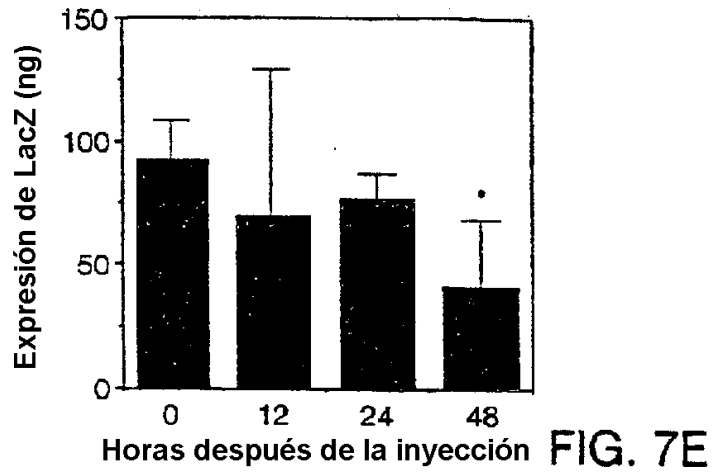
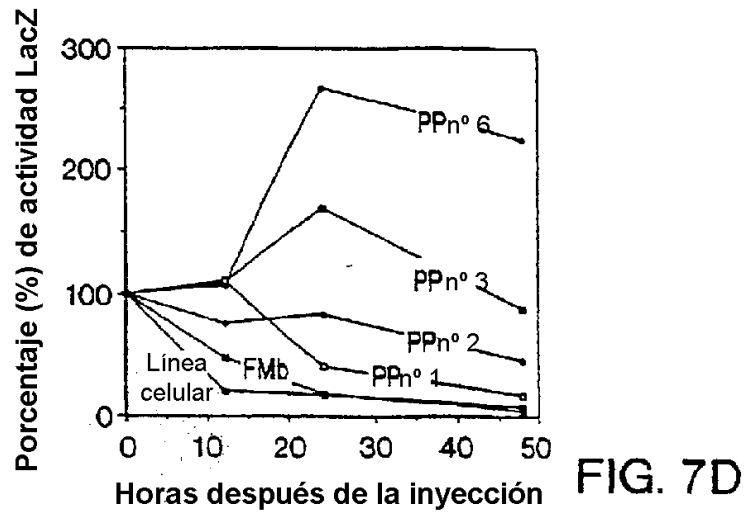


FIG. 7C



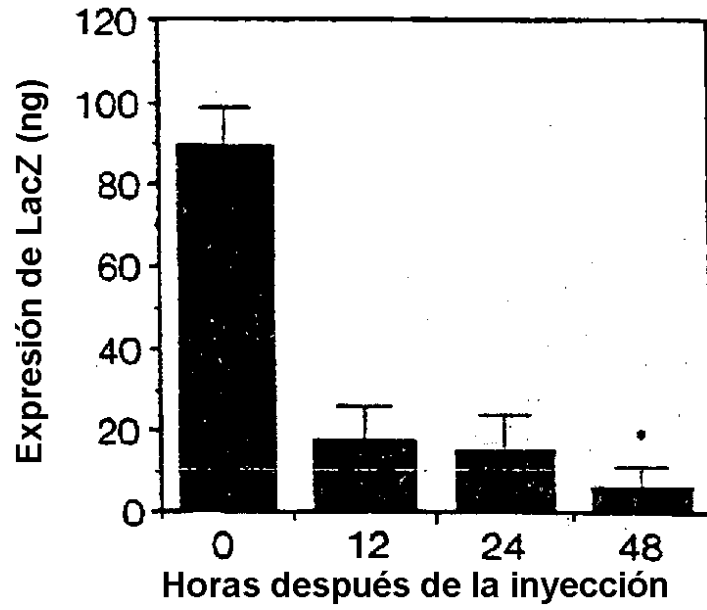


FIG. 7G

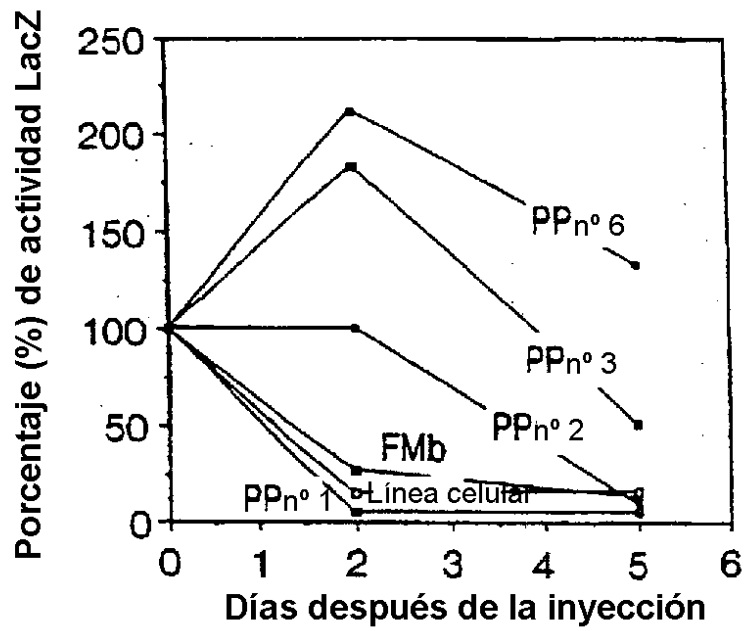
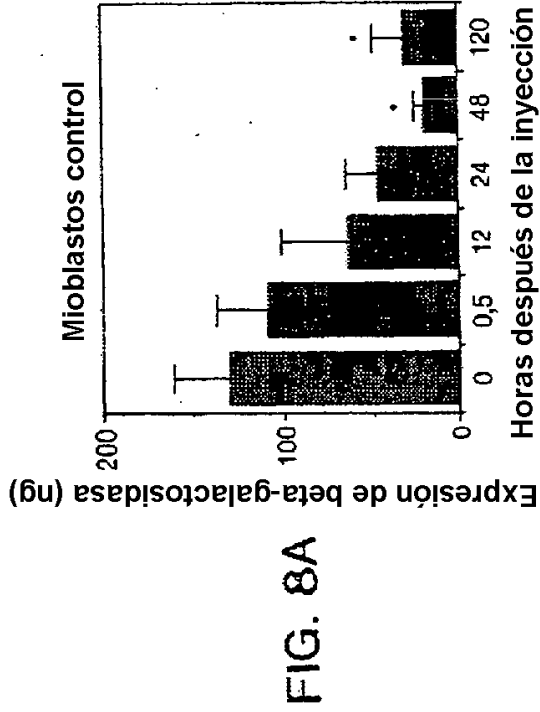
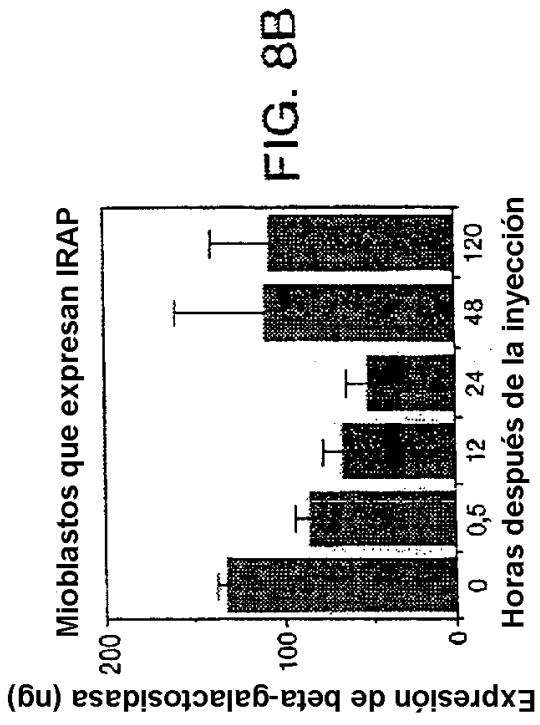


FIG. 7H



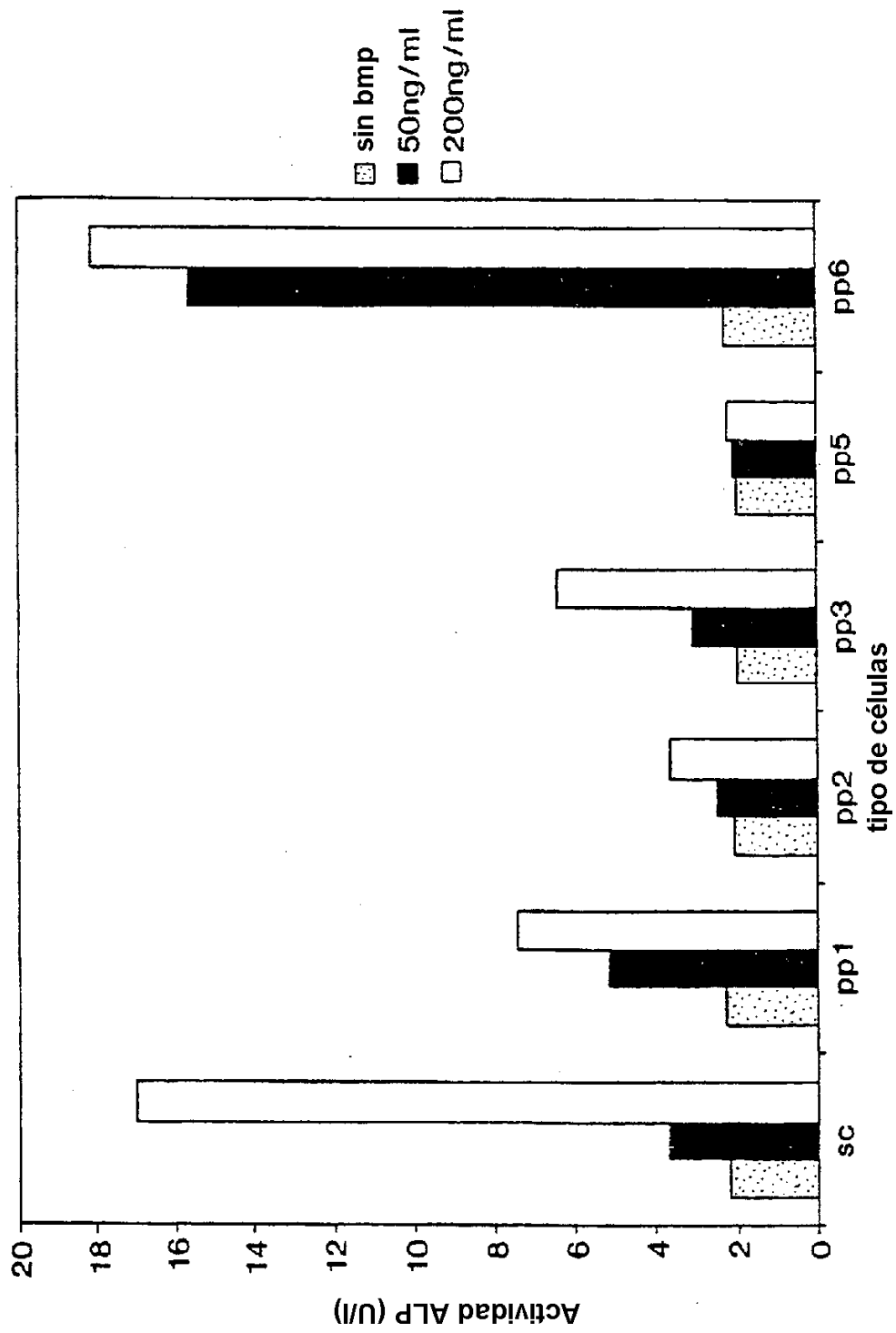


FIG. 9

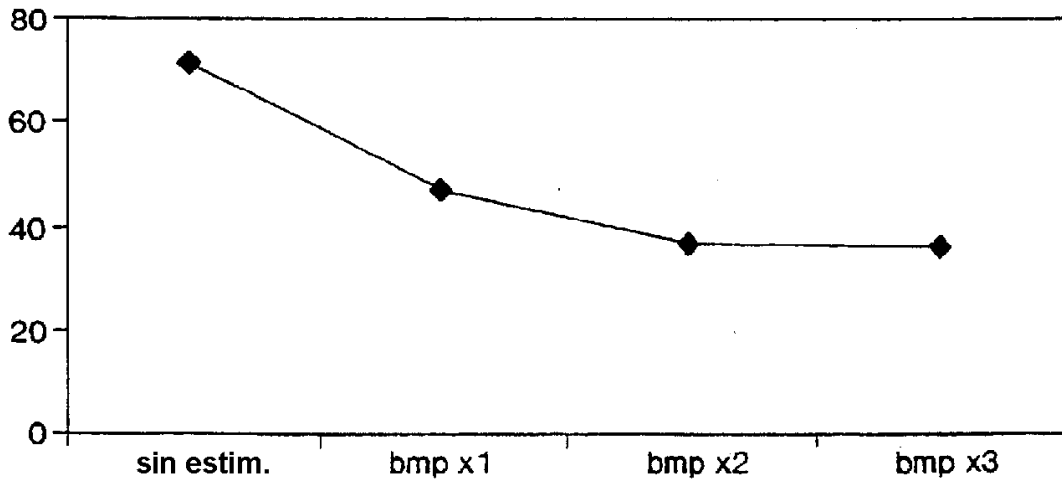


FIG. 10

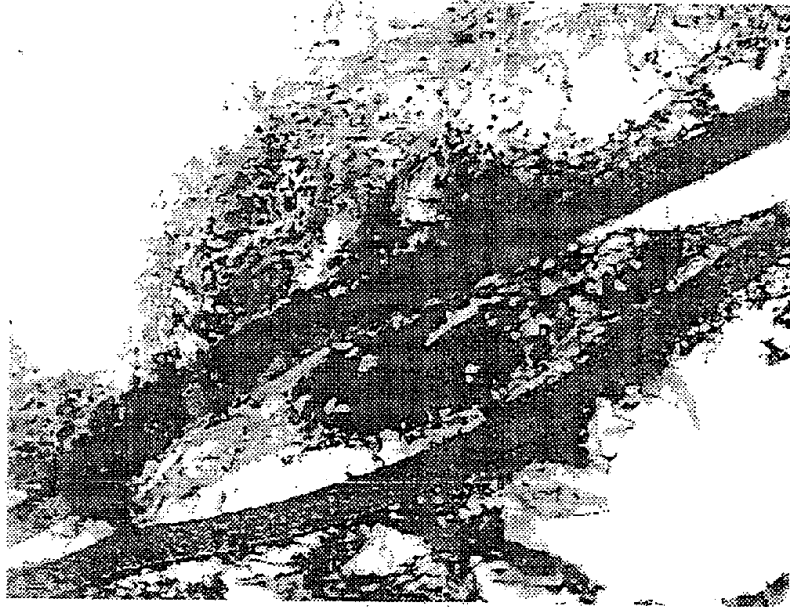
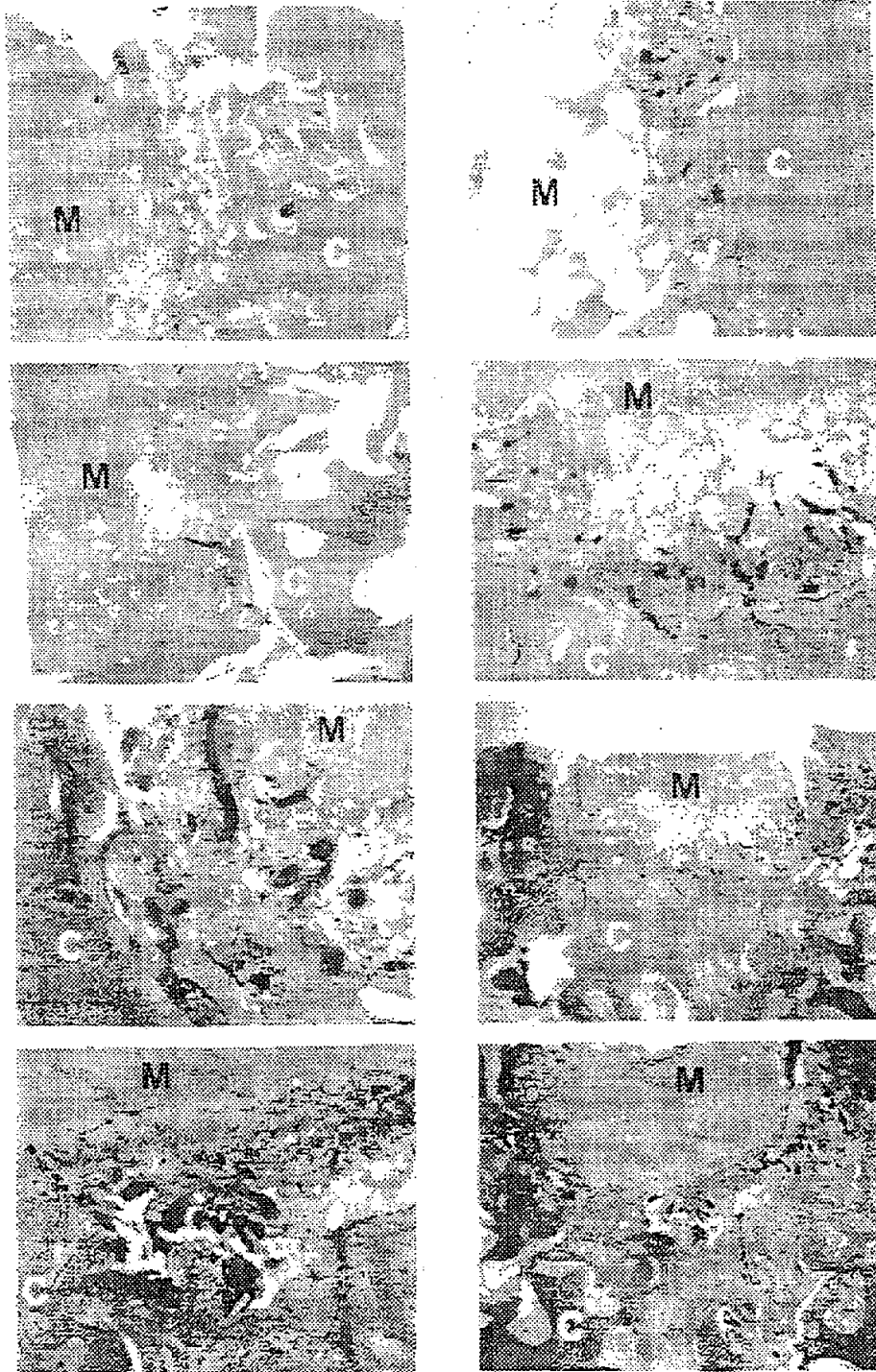


FIG. 11A



FIG. 11B



M= Músculo C= Cartilago

FIG. 13

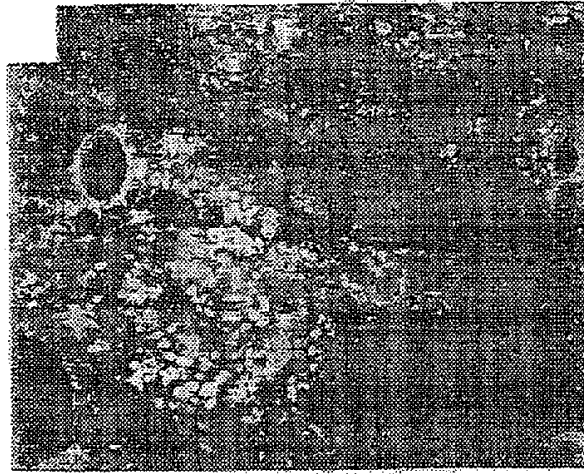


FIG. 14A

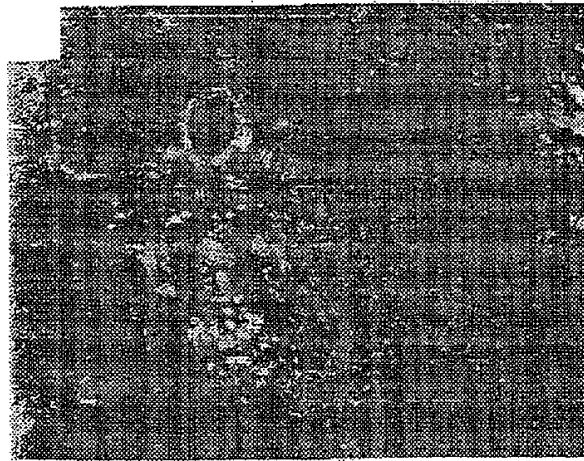


FIG. 14B



FIG. 14C

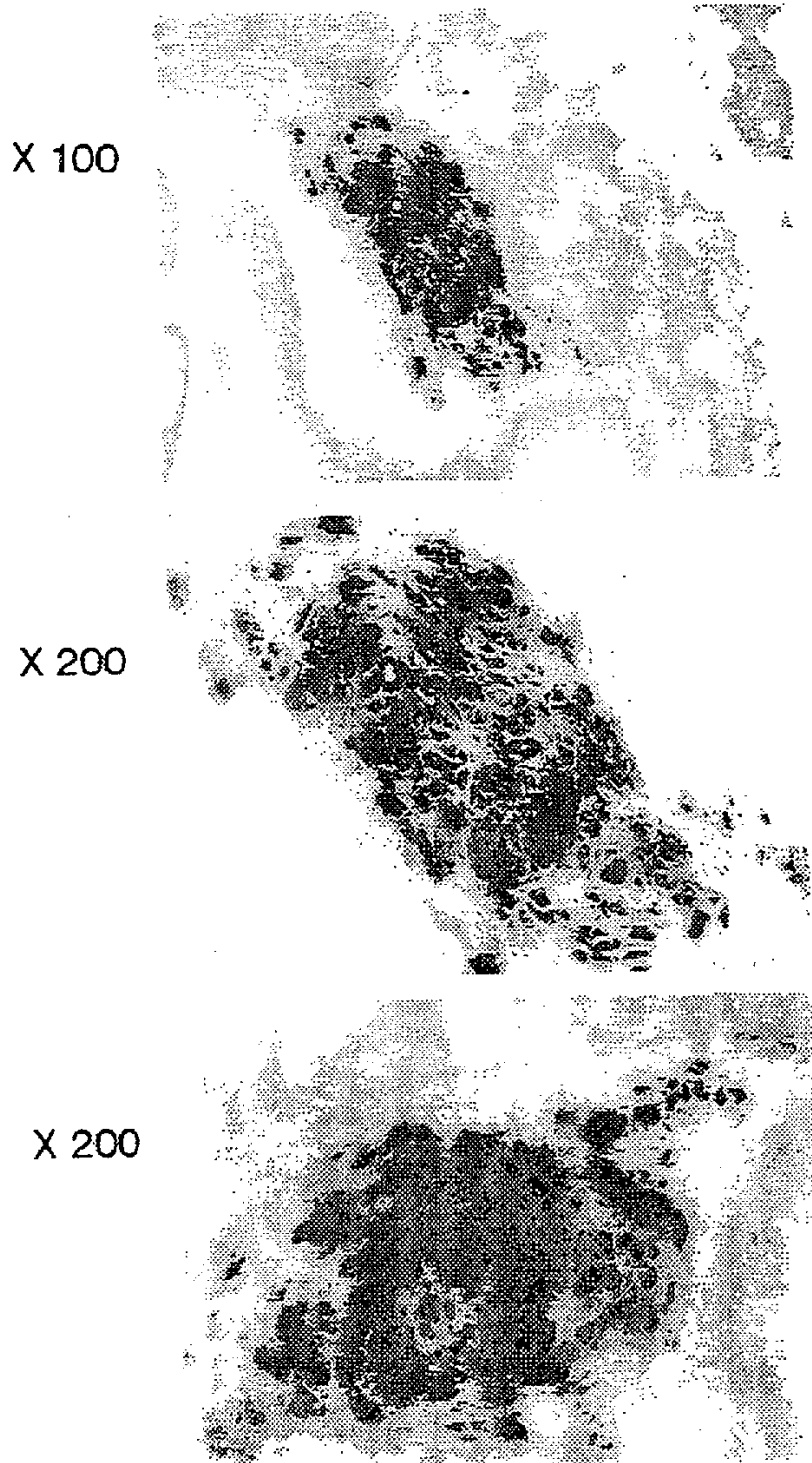


FIG. 15A

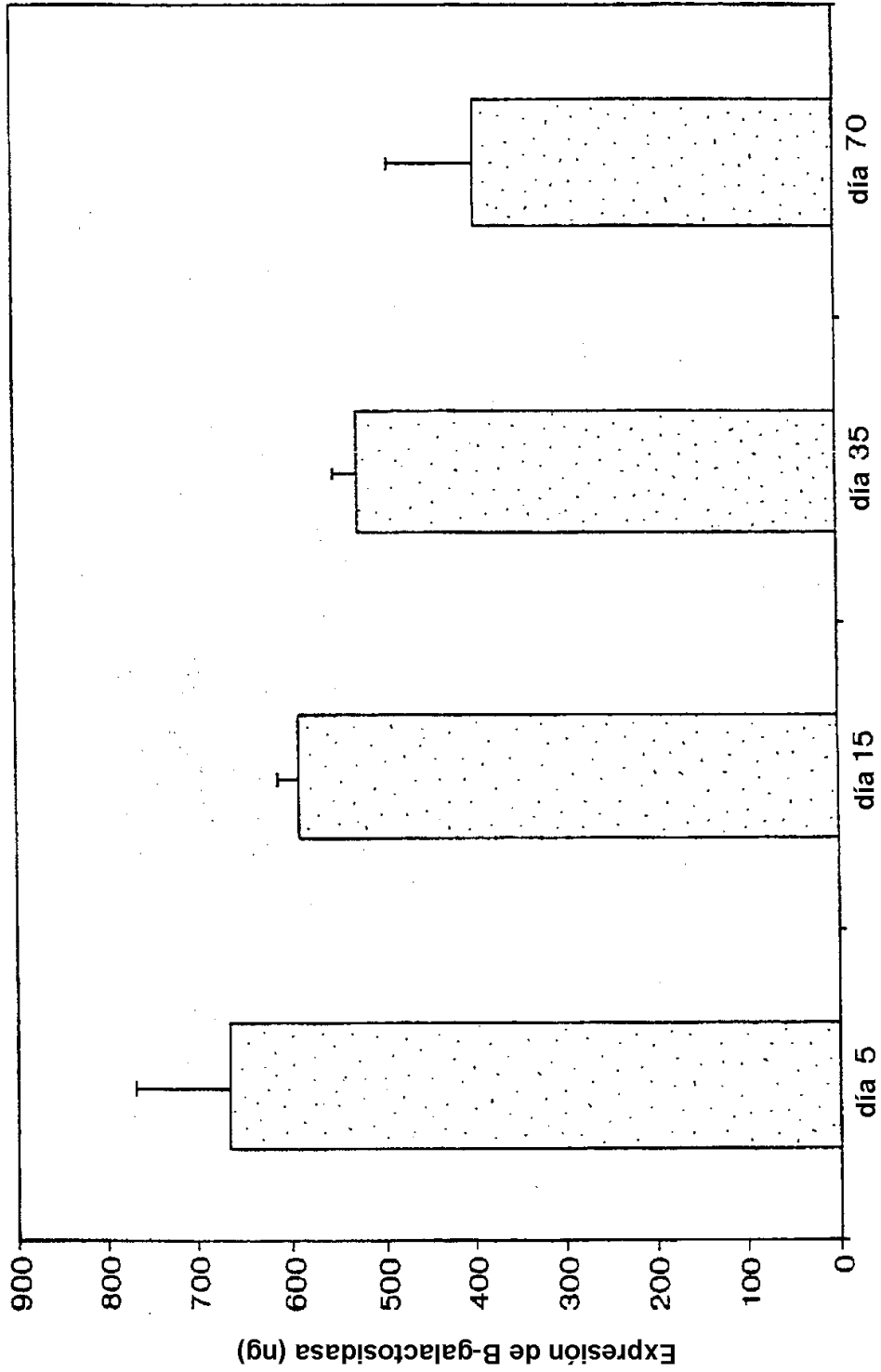


FIG. 15B



FIG. 15C