

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 483 902**

51 Int. Cl.:

A61K 31/195 (2006.01)

A61K 38/39 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2008** **E 08836948 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014** **EP 2211851**

54 Título: **Laminina-1 para su uso para mejorar la regeneración muscular después de lesiones o para mejorar la cicatrización de heridas si se administra sistémicamente**

30 Prioridad:

09.10.2007 US 998320 P

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

08.08.2014

73 Titular/es:

**BOARD OF REGENTS OF THE NEVADA SYSTEM
OF HIGHER EDUCATION, ON BEHALF OF THE
UNIVERSITY OF NEVADA, (100.0%)
MAIL STOP 321 ROSS HALL 218
RENO, NEVADA, US**

72 Inventor/es:

**BURKIN, DEAN, J. y
ROONEY, JACHINTA, E.**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 483 902 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

Laminina-1 para su uso para mejorar la regeneración muscular después de lesiones o para mejorar la cicatrización de heridas si se administra sistémicamente

Declaración de soporte gubernamental

Esta invención se realizó con soporte del gobierno de los Estados Unidos bajo las subvenciones del National Institutes of Health (NIH), National Center for Research Resources, subvenciones núms. NCRR P20 RR018751-01, P20 RR15581-04; National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, subvención núm. NIAMS R01AR053697-01; y National Institute of Neurological Disorders and Stroke, subvención núm. NINDS R21NS058429-01. El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en la invención.

Campo

La presente descripción se relaciona con un método para proporcionar beneficio terapéutico a un sujeto mediante la administración al sujeto de laminina o una composición que incluye laminina. En una particular modalidad, la presente descripción proporciona un método para mejorar la regeneración muscular, tal como para tratar la distrofia muscular, en un sujeto mediante la administración de laminina o una composición de laminina.

Antecedentes

El músculo esquelético adulto exhibe una notable capacidad para repararse y regenerarse después de un traumatismo o lesión. La capacidad de regeneración del músculo esquelético se debe a un reservorio de células satélites localizadas bajo la lámina basal y en estrecha proximidad con el sarcolema de la miofibrilla. Estas células permanecen en reposo en el músculo sano no lesionado, pero se activan rápidamente en respuesta al daño muscular, ejercicio, o enfermedad.

Tras la activación, las células satélites proliferan y se diferencian por la vía miogénica y son capaces de reparar el músculo dañado. Los modelos sugieren una subpoblación de células satélites que permanecen como células madres para reemplazar las células activadas que han progresado por la vía de linaje miogénica. Durante el período de activación, las células satélites expresan los factores de transcripción Pax3, Pax7, MyoD, miogenina, y MRF4 a medida que progresan a través de un programa de desarrollo hacia la reparación muscular.

La distrofia muscular es un término usado para referirse a un grupo de trastornos genéticos que conducen a una debilidad muscular progresiva. La distrofia muscular puede resultar en debilidad del músculo esquelético y defectos en las proteínas del músculo esquelético, que conducen a una variedad de funciones fisiológicas defectuosas. No existe un tratamiento satisfactorio para la distrofia muscular. Los tratamientos existentes típicamente se enfocan en la atenuación de los efectos de la enfermedad y en mejorar la calidad de vida del paciente, tal como a través de la terapia física o a través de la provisión de dispositivos ortopédicos.

Los genes mutados asociados con la distrofia muscular son responsables de la codificación de un número de proteínas asociadas con la red de proteínas costaméricas. Tales proteínas incluyen laminina-2, colágeno, distroglicano, integrinas, caveolina-3, anquirina, distrofina, α -distrobrevina, vinculina, plectina, BPAG1b, proteínas LIM musculares, desmina, proteína LIM asociada a actinina, α -actina, titina, teletonina, cifer, miotilina, y el complejo sarcoglicano/sarcospan.

La forma más común de distrofia muscular, la distrofia muscular de Duchenne, está causada por una mutación en el gen responsable de la producción de distrofina. La distrofina es una proteína involucrada en la unión de células a la matriz extracelular, que incluye la membrana basal. Las distrofias musculares congénitas están causadas por mutaciones génicas que afectan la producción de otras proteínas costaméricas. Por ejemplo, en las poblaciones de ascendencia europea, la distrofia muscular congénita más frecuente es causada por una mutación que resulta en una carencia de expresión de la $\alpha 7\beta 1$ integrina. Al igual que la distrofina, la $\alpha 7\beta 1$ integrina está involucrada en la unión de células a la matriz extracelular.

En alguna medida, un defecto en el gen que codifica para una distrofina o una $\alpha 7\beta 1$ integrina se compensa frecuentemente por una expresión mejorada de la otra, u otra proteína costamérica, tal como la utrofina (un análogo de la distrofina). La distrofina, la $\alpha 7\beta 1$ integrina y la utrofina sirven todas como receptores para la laminina, que sirven como el enlace a la matriz extracelular. La producción defectuosa de laminina-2 en sí da lugar a distrofia muscular congénita por deficiencia de merosina (MCMD) o distrofia muscular congénita tipo 1A (MDC1A).

La laminina es un componente importante de la membrana basal. Se han identificado al menos quince trímeros de la proteína laminina, que incluye cada uno un heterotrímero de cadena α , β , y γ . La laminina se asocia con un número de funciones fisiológicas, que incluyen la adhesión celular, la expresión génica, la fosforilación de la tirosina de proteínas, la diferenciación celular, así como también la forma y el movimiento celular. Se conoce que la laminina se une a las membranas celulares a través de receptores de integrina. Adicionalmente, la laminina-2 se une a α -distroglicano como parte del complejo distrofina-glicoproteína.

La $\alpha 7 \beta 1$ integrina es un receptor de laminina importante expresado en el músculo esquelético. La $\alpha 7 \beta 1$ integrina juega un papel importante en el desarrollo de uniones neuromusculares y miotendinosas. En el adulto, la $\alpha 7 \beta 1$ integrina se concentra en los sitios de unión y se encuentra en regiones fuera de la unión donde media la adhesión de las fibras musculares a la matriz extracelular. Los ratones que carecen de la cadena $\alpha 7$ desarrollan distrofia muscular que afecta las uniones miotendinosas. La ausencia de la $\alpha 7$ integrina resulta en la deposición de la matriz defectuosa en la unión miotendinosa. La pérdida de la $\alpha 7$ integrina en ratones sarcoglicano- γ resulta en la patología muscular severa. La ausencia de la $\alpha 7$ integrina en ratones *mdx* resulta además en distrofia muscular severa, lo que confirma que la $\alpha 7 \beta 1$ integrina sirve como un modificador genético importante para las distrofias musculares Duchenne y otras.

Las mutaciones en el gen $\alpha 7$ son responsables de la distrofia muscular en humanos. Un tamizaje de 117 biopsias musculares de pacientes con enfermedad muscular indefinida reveló 3 que carecían de la cadena $\alpha 7$ de la integrina y tenían niveles reducidos de la cadena $\beta 1 D$ de la integrina. Estos pacientes exhibieron retrasos en los avances del desarrollo y movilidad defectuosa consistente con el papel de la $\alpha 7 \beta 1$ integrina en el desarrollo y función de la unión neuromuscular y miotendinosa.

Diversas líneas de evidencia sugieren que la $\alpha 7$ integrina puede ser importante para la regeneración muscular. Por ejemplo, durante el desarrollo embrionario, la $\alpha 7 \beta 1$ integrina regula la migración de mioblastos a regiones de formación de miofibrilla. Se ha encontrado que MyoD (proteína de determinación miogénica) transactiva la expresión génica de la $\alpha 7$ integrina *in vitro*, lo que aumentaría los niveles de $\alpha 7$ integrina en células satélites activadas. Las líneas celulares de mioblastos de humano, de ratón y de rata derivadas de células satélites expresan altos niveles de $\alpha 7$ integrina. Se detectan elevados el ARNm de la $\alpha 7$ integrina y la proteína en el músculo esquelético de ratones *mdx* de 5 semanas de edad, lo que se correlaciona con el periodo de máxima degeneración y regeneración muscular. Adicionalmente, la $\alpha 7 \beta 1$ integrina se asocia con la proteína de unión a $\alpha 1$ integrina específica de músculo (MIBP), que regula la deposición de laminina en mioblastos C2C12. La laminina proporciona un medio ambiente que apoya la migración y la proliferación de mioblastos. Finalmente, la expresión mejorada de la $\alpha 7$ integrina en músculo esquelético distrófico resulta en el número aumentado de células satélites.

Hasta la fecha, muchos esfuerzos para curar o atenuar la distrofia muscular involucran mejorar la expresión de varios componentes de la red costamérica. Sin embargo, estos enfoques, mientras que muestran alguna promesa *in vitro* o en animales transgénicos, típicamente no demuestran resultados eficaces en humanos ni proporcionan los métodos a través de los que podría lograrse la terapia en humanos. Tales rutas de terapia son notoriamente difíciles de implementar.

Sin embargo, además es bien conocido que es muy difícil la administración directa de las proteínas, particularmente las proteínas grandes. Por ejemplo, el gran tamaño, la alta carga, la corta vida media, la pobre estabilidad, la alta inmunogenicidad y la pobre permeabilidad de la membrana pueden limitar la biodisponibilidad de las proteínas administradas. Adicionalmente, en dependencia de la ruta de administración, los procesos fisiológicos naturales de un sujeto pueden atacar y degradar las proteínas administradas. Por ejemplo, aunque se conoce que la laminina juega un papel en la matriz extracelular, es una molécula particularmente grande (típicamente > 600 kD), altamente cargada y por consiguiente probablemente podrían haberse previsto dificultades en su administración a los pacientes. En consecuencia, hasta la fecha los esfuerzos se han enfocado en tratamientos más sofisticados, en lugar de la administración directa de sustancias terapéuticas.

Resumen

La presente invención se define por las reivindicaciones.

En un primer aspecto la invención proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de laminina-1 para su uso en la mejora de la regeneración o la reparación muscular en un sujeto, o para su uso en la prevención o la reducción del daño muscular en un sujeto, en donde la laminina-1 debe administrarse sistémicamente y en donde dicha regeneración muscular es después de un daño, lesión o enfermedad.

En un aspecto adicional la invención proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de laminina-1 para su uso en la promoción de la cicatrización de heridas en un sujeto, en donde la laminina-1 debe administrarse sistémicamente.

En varias modalidades, la presente descripción proporciona el tratamiento de un sujeto con laminina o una composición que incluye laminina. Por ejemplo, proporciona la mejora de la salud muscular, tal como la mejora de la regeneración, el mantenimiento, o la reparación muscular en un sujeto mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz de laminina o una composición que comprende laminina, que incluye fragmentos, derivados, o análogos de esta. En un ejemplo específico, la laminina es una proteína de laminina completa. En ejemplos adicionales, la laminina se selecciona de laminina-1, laminina-2, laminina-4, y combinaciones de estas. En ejemplos adicionales, la laminina o composición de laminina incluye una sustancia al menos sustancialmente homóloga a la laminina-1, laminina-2, o laminina-4. Aún en otras implementaciones, la laminina o composición de laminina comprende un polipéptido al menos sustancialmente homólogo a la cadena de laminina $\alpha 1$.

- En ejemplos adicionales, la laminina o composición de laminina consiste de laminina-1, laminina-2, laminina-4, y combinaciones de estas. En ejemplos adicionales, la laminina o composición de laminina consiste de una sustancia al menos sustancialmente homóloga a la laminina-1, laminina-2, o laminina-4. Aún en otras implementaciones, la laminina o composición de laminina consiste de un polipéptido al menos sustancialmente homólogo a la cadena de laminina $\alpha 1$. En un ejemplo específico, la laminina o composición de laminina no incluye un fragmento de laminina, tal como que incluye solamente una proteína de laminina completa.
- En aún otro ejemplo, la laminina o composición de laminina consiste esencialmente de laminina-1, laminina-2, laminina-4, y combinaciones de estas. En ejemplos adicionales, la laminina o composición de laminina consiste esencialmente de una sustancia al menos sustancialmente homóloga a la laminina-1, laminina-2, o laminina-4. Aún en otras implementaciones, la laminina o composición de laminina consiste esencialmente de un polipéptido al menos sustancialmente homólogo a la cadena de laminina $\alpha 1$. En un ejemplo específico, la laminina o composición de laminina no incluye un fragmento de laminina, tal como que esencialmente incluye solamente una proteína de laminina completa.
- Otras implementaciones del método descrito incluyen diagnosticar al sujeto que tiene una afección tratable mediante la administración de laminina o una composición que comprende laminina. En un ejemplo, se diagnostica que el sujeto padece de distrofia muscular, tal como una distrofia muscular congénita, distrofia muscular de Duchenne, o distrofia muscular de Limb-girdle. En otros casos, la afección se caracteriza por la falta de un sujeto, o la disminución de la capacidad del sujeto, para expresar una o más proteínas asociadas con la formación o mantenimiento de la matriz extracelular, tal como, producción defectuosa o sin producción de una laminina, una integrina, distrofina, utrofina, o distroglicano.
- En una modalidad específica, la presente descripción proporciona aumentar la regeneración muscular en un sujeto. Por ejemplo, los sujetos geriátricos, los sujetos que padecen de trastornos musculares, y los sujetos que padecen de una lesión muscular, que incluye lesión muscular inducida por la actividad, tal como la lesión causada por el ejercicio, pueden beneficiarse de esta modalidad.
- Aun en modalidades adicionales, la laminina -1 o composición de laminina -1 se administra de una manera preventiva, tal como para prevenir o reducir el daño o lesión muscular (tal como la lesión inducida por la actividad o el ejercicio). Por ejemplo, los sujetos geriátricos, los sujetos propensos al daño muscular, o sujetos en riesgo de lesión muscular, tales como los atletas, pueden tratarse con el objetivo de eliminar o atenuar el daño muscular, lesión, o enfermedad.
- Las implementaciones de la presente descripción pueden usarse además para promover la cicatrización de heridas. En algunos ejemplos, una laminina -1 o una composición que comprende laminina -1 se administra en o próxima a una herida. En ejemplos adicionales, la sustancia se administra de manera sistémica. Aunque la sustancia se aplica típicamente después de producirse la herida, la sustancia se aplica prospectivamente en algunos ejemplos.
- En una instancia adicional, el método de la presente descripción incluye la administración de la laminina o de composición de laminina con una o más sustancias farmacológicas adicionales, tal como un agente terapéutico. En algunos aspectos, el agente terapéutico adicional mejora el efecto terapéutico de la laminina o composición de laminina. En aspectos adicionales, el agente terapéutico proporciona un beneficio terapéutico independiente de la afección que se trata. En varios ejemplos, el agente terapéutico adicional es un componente de la matriz extracelular, tal como una integrina, una distrofina, un distroglicano, una utrofina, o un factor de crecimiento. En ejemplos adicionales, el agente terapéutico reduce o mejora la expresión de una sustancia que mejora la formación o mantenimiento de la matriz extracelular.
- En algunos ejemplos, la laminina o composición de laminina se aplica a un área particular del sujeto a tratar. Por ejemplo, la laminina o composición de laminina puede inyectarse en un área particular a tratar, tal como un músculo. En ejemplos adicionales, la laminina o composición de laminina se administra de manera que se distribuye a múltiples áreas del sujeto, tal como la administración sistémica o la administración regional.
- La laminina, o una composición que comprende laminina, puede administrarse por cualquier método adecuado, tal como en forma tópica, parenteralmente (por ejemplo, en forma intravenosa o en forma intraperitoneal), u oralmente. En la modalidad de la presente invención, la laminina -1 o composición de laminina -1 se administra sistémicamente, tal como a través de la administración parenteral, tal como la inyección estomacal o inyección peritoneal.
- Aunque los métodos descritos generalmente se han descrito con respecto a la regeneración muscular, los métodos descritos además pueden usarse para mejorar la reparación o el mantenimiento, o prevenir el daño a, otros tejidos y órganos. Por ejemplo, los métodos de la presente descripción pueden usarse para tratar los síntomas de la distrofia muscular que provienen de los efectos a las células o tejido distinto al músculo esquelético, tales como la función cerebral defectuosa o alterada, los músculos lisos, o los músculos cardíacos.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 son imágenes de inmunofluorescencia de miofibrillas aisladas de ratones transgénicos nestina-GFP mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha 7$ integrina.

La Figura 2 son fotografías del músculo tibialis anterior de ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina 4, 10, y 28 días después de la lesión inducida con cardiotoxina.

La Figura 3 proporciona un gráfico que ilustra la captación de colorante azul de Evan por los ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina.

La Figura 4 son microfotografías de tinciones por hematoxilina y eosina de secciones de tejido de ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina.

La Figura 5 proporciona un gráfico que ilustra el porcentaje de núcleos centralmente localizados en los ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina.

La Figura 6 proporciona un gráfico de la expresión de la cadena pesada de la miosina embrionaria en ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina.

La Figura 7 proporciona un gráfico del área de la sección transversal de la miofibrilla de ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina.

La Figura 8 proporciona un gráfico que ilustra la incorporación de BrdU en ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina.

La Figura 9 proporciona un gráfico que ilustra la expresión de Pax7 en ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina.

La Figura 10 proporciona un gráfico que ilustra la expresión de MyoD en ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina.

La Figura 11 son imágenes de inmunofluorescencia de miofibrillas aisladas de ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina tratados con laminina-1.

La Figura 12 son fotografías del músculo tibialis anterior de ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina tratados con laminina-1 4, 10, y 28 días después de la lesión inducida con cardiotoxina.

La Figura 13 proporciona un gráfico que ilustra la captación del colorante azul de Evan por ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina tratados con laminina-1.

La Figura 14 son microfotografías de tinciones por hematoxilina y eosina de secciones de tejido de ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina tratados con laminina-1.

La Figura 15 proporciona un gráfico que ilustra el porcentaje de núcleos centralmente localizados en los ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina tratados con laminina-1.

La Figura 16 proporciona un gráfico de la expresión de la cadena pesada de la miosina embrionaria en ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina tratados con laminina-1.

La Figura 17 proporciona un gráfico del área de la sección transversal de miofibrilla de ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina tratados con laminina-1.

La Figura 18 proporciona un gráfico que ilustra la incorporación de BrdU en ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina tratados con laminina-1.

La Figura 19 proporciona un gráfico que ilustra la expresión de Pax7 en los ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina tratados con integrina.

La Figura 20 proporciona un gráfico que ilustra la expresión de MyoD en los ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina tratados con laminina.

La Figura 21 es una imagen de la tinción con X-gal que demuestra que los mioblastos $\alpha 7\beta gal^{+/-}$ expresan β -galactosidasa (panel izquierdo) que aumenta tras la diferenciación a miotubos (panel derecho).

La Figura 22 es una imagen de un análisis Western de la expresión de $\alpha 7$ integrina y de β -galactosidasa en células $\alpha 7\beta gal^{+/-}$ diferenciadas de 0 - 72 horas.

La Figura 23 son gráficos de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) (logaritmo de la dispersión lateral contra la tinción con FITC (intensidad)) que demuestra que los mioblastos $\alpha 7\beta gal^{+/-}$ exhiben expresión β -galactosidasa aumentada después del tratamiento con LAM-111 100 nM.

La Figura 24 es una imagen de un análisis Western de la expresión de la $\alpha 7B$ integrina y Cox-1 en mioblastos de distrofia muscular C2Cl2 y Duchenne tratados con solución salina tamponada con fosfato y laminina-111.

La Figura 25 proporciona un gráfico (píxeles contra milímetros cuadrados) de la expresión de la $\alpha 7B$ integrina en mioblastos de distrofia muscular C2Cl2 y Duchenne tratados con solución salina tamponada con fosfato y laminina-111.

La Figura 26 son imágenes de inmunofluorescencia (barra de escala = 10 μm) del músculo tibialis anterior del control, tratado con solución salina tamponada con fosfato, y el músculo tratado con laminina-111, que ilustran la ausencia de distrofina en músculo *mdx* tratado con laminina-111 o solución salina tamponada con fosfato y que, mientras que el músculo silvestre y el *mdx* inyectado con solución salina tamponada con fosfato carecían de laminina-111, la laminina-111 se detectó en la matriz extracelular del músculo *mdx* inyectado con laminina-111.

La Figura 27 son fotomicrografías (barra de escala = 10 μm) de tinción por hematoxilina y eosina (paneles superiores) y captación de colorante azul de Evans (EBD) (paneles inferiores) por el músculo silvestre, el *mdx* inyectado con solución salina tamponada con fosfato, y el músculo *mdx* inyectado con laminina-111, que ilustra que el músculo inyectado con laminina-111 exhibió núcleos centralmente localizados y la captación de EBD reducidos en comparación con el músculo *mdx* inyectado con solución salina tamponada con fosfato.

La Figura 28 proporciona gráficos de la captación del colorante azul de Evan (gráfico de la izquierda, porcentaje de fibras positivas) y los núcleos centralmente localizados (derecha del gráfico, porcentaje de fibras positivas para núcleos centralmente localizados) para músculo silvestre, músculo *mdx* inyectado con solución salina tamponada con fosfato, y músculo *mdx* tratado con laminina-111.

La Figura 29 son imágenes de inmunofluorescencia (barra de escala = 10 μ m) de músculo silvestre, músculo *mdx* tratado con solución salina tamponada con fosfato, y músculo *mdx* tratado con laminina-111 que ilustran la presencia o la ausencia de la α 7 integrina, la utrofina, y la α -bungarotoxina.

La Figura 30 es una imagen de un análisis Western de la expresión de la distrofina, la utrofina, la α 7A integrina, la α 7B integrina, la β 1D integrina, y la Cox-1 en el músculo silvestre, el músculo *mdx* tratado con solución salina tamponada con fosfato, y el músculo *mdx* tratado con laminina-111.

La Figura 31 proporciona gráficos de la relación de α 7A integrina/Cox-1 (gráfico superior), α 7B integrin/Cox-1 (gráfico central) y utrofina/Cox-1 (gráfico inferior) para el músculo silvestre, el músculo *mdx* tratado con solución salina tamponada con fosfato, y el músculo *mdx* tratado con laminina-111.

La Figura 32 son imágenes de inmunofluorescencia (barra de escala = 10 μ m) del músculo silvestre, del músculo *mdx* tratado con solución salina tamponada con fosfato, y del músculo *mdx* tratado con laminina-111 que ilustran que una dosis individual de 1 mg/kg de la proteína laminina-111 administrada de forma intraperitoneal en ratones *mdx* resultó en la localización al corazón, al diafragma y al gastrocnemio.

La Figura 33 son imágenes de inmunofluorescencia del diafragma de los ratones *mdx* tratados con solución salina regulada con fosfato (imágenes de la izquierda) o laminina-111 (imágenes de la derecha), que ilustran que la laminina-111 se localizó por todo el diafragma de ratones *mdx* después de la inyección intraperitoneal con laminina-111.

La Figura 34 proporciona gráficos de los niveles de creatina (mg/dl) y nitrógeno de urea en sangre (mg/dl) para el músculo silvestre, el músculo *mdx* inyectado con solución salina regulada con fosfato y el músculo *mdx* tratado con laminina-111.

Descripción detallada de la invención

Abreviaturas

PBS - tampón fosfato salino

LAM-111 - laminina-1, que incluye las cadenas α 1 β 1 γ 1

NaCl - cloruro sódico

NaOH - hidróxido de sodio

HCl - ácido clorhídrico

MCMD, MDC1A - distrofia muscular congénita por deficiencia de merosina

DMSO - dimetilsulfóxido

EDTA - ácido etilendiaminotetraacético

eMyHC - cadena pesada de miosina embrionaria

BrdU - bromodeoxiuridina

TA - tibialis anterior

H&E - hematoxilina y eosina

GFP - proteína fluorescente verde

WT - silvestre

EBD - Colorante azul de Evan

DMD - Distrofia muscular de Duchenne

CLN - núcleos centralmente localizados

nmol - nanomol

nM - nanomolar

MyoD - proteína de determinación miogénica

MIBP - proteína de unión a α 1-integrina específica de músculo

FACS - clasificación de células activadas por fluorescencia

FITC -fluoresceína isotiocianato

Pax7 - gen 7 box apareado

Pax3 - gen 3 box apareado

Cox-1 - ciclooxigenasa-1

MRF4 - factor 6 miogénico

Términos

Para facilitar una comprensión de la descripción presentada, se proporciona las siguientes explicaciones.

A menos que se explique de cualquier otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el conocido comúnmente por el experto en la técnica a la que pertenece esta descripción. En caso de conflicto, la presente descripción, incluyendo las explicaciones de los términos, tendrá el control. Los términos singulares "uno", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto lo indique claramente de cualquier otra forma. Similarmente, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto lo indique claramente de cualquier otra forma. El término "que comprende" significa "que incluye;" por lo tanto, "que comprende A o B" significa que incluye A o B, o que incluye A y B. Todos los intervalos numéricos dados en la presente incluyen todos los valores, que incluyen

los puntos finales (a menos que se excluyan específicamente) y cualquiera de y todos los intervalos intermedios entre los puntos finales.

5 Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente pueden usarse en la práctica o para probar la presente descripción, en la presente se describen materiales y métodos adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos descritos son ilustrativos solamente y no pretenden ser limitantes.

10 "Músculo" se refiere a cualquier mioblasto, miocito, miofibrilla, miotubo u otra estructura compuesta de células musculares. Los músculos o miocitos pueden ser esqueléticos, lisos, o cardíacos. El músculo además puede referirse a, en implementaciones particulares de la presente descripción, células u otros materiales capaces de formar miocitos, tales como las células madres y las células satélites.

15 "Matriz extracelular" se refiere a la estructura extracelular de un tejido o una capa de este, que incluye la disposición, la composición, y las formas de uno o más componentes de la matriz, tales como proteínas, que incluyen proteínas estructurales tales como colágeno y elastina, proteínas tales como fibronectina y lamininas, y proteoglicanos. La matriz puede comprender colágeno fibrílico, que tiene una red de fibras. En algunos ejemplos, la matriz extracelular se conecta a las células a través de la red de proteínas costaméricas.

20 "Tejido" se refiere a un agregado de células, usualmente de un tipo particular, junto con su sustancia intercelular que forman uno de los materiales estructurales de un animal y que en animales incluyen tejido conectivo, epitelio, tejido muscular, y tejido nervioso.

25 "Sujeto" se refiere a un organismo, tal como un animal, al cual se le administran los tratamientos. Los sujetos incluyen mamíferos, tal como humanos, cerdos, ratas, vacas, ratones, perros, gatos, y primates.

30 "Laminina" se refiere a cualquiera de la familia de glicoproteínas que están involucradas típicamente en la formación y mantenimiento de las matrices extracelulares. La laminina es un heterotrímero formado a partir de una cadena α , una cadena β , y una cadena γ . Las diferentes cadenas de una laminina particular pueden afectar las propiedades de la molécula. En algunos aspectos de la presente descripción, los fragmentos, derivados, o análogos de varias lamininas pueden usarse, tal como lamininas con al menos una porción al menos de cadena sustancialmente homóloga a la cadena de laminina $\alpha 1$.

35 "Al menos sustancialmente homóloga," como se usa en la presente descripción, se refiere a un grado de homología suficiente para producir al menos una porción de la actividad de un material de referencia en la regeneración, mantenimiento o reparación muscular, o cicatrización de heridas. En algunos ejemplos, los materiales son al menos sustancialmente homólogos cuando estos son al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% homólogos a un material de referencia.

40 Un "fragmento," como se usa en la presente, se refiere a una porción de una sustancia, tal como la laminina. Un fragmento puede ser, en algunos ejemplos, un dominio o cadena particular de una proteína. Por ejemplo, modalidades particulares de la presente descripción involucran administrar un fragmento de laminina-1 que corresponde al menos a una porción de (o toda) la cadena de laminina $\alpha 1$. Los fragmentos pueden ser sintéticos o pueden derivarse de sustancias parentales más grandes.

45 Un "derivado", como se usa en la presente, se refiere a una forma de una sustancia, tal como una laminina o porción de esta, que tiene al menos un grupo funcional alterado, añadido, o retirado, en comparación con el compuesto parental.

50 "Grupo funcional" se refiere a un radical, distinto a un radical hidrocarburo, que añade una propiedad física o química a una sustancia.

Como se usa en la presente, un "análogo" se refiere a un compuesto que es suficientemente homólogo a un compuesto tal que tiene una actividad funcional similar para un propósito esperado como el compuesto parental. Los análogos incluyen polipéptidos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos en comparación con una sustancia particular.

55 En algunos aspectos, las lamininas pueden administrarse como una mezcla de lamininas, que incluyen fragmentos, análogos, y derivados de estas. Los métodos adecuados para preparar análogos de dominios de laminina se describen en la patente de Estados Unidos núm. 6,933,280.

60 Los materiales de laminina o composiciones de la presente descripción pueden administrarse como moléculas discretas o pueden formar un complejo con, o conjugarse a, otra sustancia. Por ejemplo, la laminina puede combinarse con un portador, tal como para ayudar en la administración de la laminina a un sitio de interés o para aumentar la captación o la incorporación fisiológica de la laminina.

65 En ejemplos específicos, la laminina administrada incluye o consiste de laminina-1 (LAM-111), que incluye las cadenas $\alpha 1\beta 1\gamma 1$. En ejemplos adicionales, la laminina administrada incluye o consiste de laminina-2, que incluye las cadenas

$\alpha 2\beta 1\gamma 1$. Aun en otros ejemplos adicionales, la laminina administrada incluye o consiste de laminina-4, que incluye las cadenas $\alpha 2\beta 2\gamma 1$.

5 Las lamininas pueden obtenerse a partir de cualquier fuente adecuada. Por ejemplo, la laminina-1 puede obtenerse a partir de tejido de la placenta o del sarcoma murino Engelbreth-Holm-Swarm. Los métodos adecuados para aislar varias lamininas se describen en la patente de los Estados Unidos núm. 5,444,158.

10 "Fuente biológica" se refiere a un organismo, tal como un animal, tal como un mamífero, o porción de este, a partir del cual pueden obtenerse materiales biológicos. Los ejemplos de tales materiales incluyen muestras de tejido, tales como material de la placenta o sarcoma; células, tales como células satélites; material extracelular, que incluye lamininas u otros componentes de este; u otro material orgánico o inorgánico que se encuentra en el organismo.

15 "Mejorar la salud muscular," se refiere a un mejoramiento en la salud muscular en comparación con un estado preexistente o en comparación con un estado que podría producirse en ausencia de tratamiento. Por ejemplo, mejorar la salud muscular puede incluir la mejora de la regeneración, mantenimiento, o reparación muscular. Mejorar la salud muscular puede incluir además tratar a un sujeto prospectivamente para prevenir o reducir el daño o lesión muscular.

20 "Regeneración" se refiere a la reparación de las células o tejidos, tales como células musculares o tejido (u órganos) que incluye células musculares, después de una lesión o daño para restaurar al menos parcialmente el músculo o el tejido a una condición similar a la que existía en las células o el tejido antes de que se produjera la lesión o el daño. La regeneración se refiere además a facilitar la reparación de las células o el tejido en un sujeto que tiene una enfermedad que afecta a dichas células o tejidos para eliminar o atenuar los efectos de la enfermedad. En ejemplos más específicos, la regeneración coloca a las células o al tejido en la misma condición o una condición fisiológica mejorada como antes de producirse la lesión o el daño o la condición que existiría en ausencia de la enfermedad.

25 "Mantenimiento" de células o tejido, tales como células musculares o tejido (u órganos) que incluye las células musculares, se refiere a mantener las células o el tejido en al menos sustancialmente la misma condición fisiológica, tal como mantener tal condición aun en presencia de los estímulos que normalmente causarían daño, lesión o enfermedad.

30 "Reparación" de células o tejido, tales como células musculares de músculo o tejido (u órganos) que incluye las células musculares, se refiere al proceso fisiológico de cicatrización de daños a las células o tejido después de daños u otro trauma.

35 "Administración" se refiere a proporcionar una o más sustancias a un sujeto tal que el sujeto pueda recibir un beneficio terapéutico de la sustancia. La laminina, composición de laminina, u otra sustancia terapéutica son generalmente administradas en forma tópica, en forma nasal, en forma intravenosa, oralmente, en forma intracraneal, en forma intramuscular, parenteralmente o como implantes, pero en principio aun es posible su uso rectal o vaginal. La laminina, o las composiciones de estas, pueden además administrarse a un sujeto usando una combinación de estas técnicas.

40 Las formas adecuadas de preparación farmacéuticas sólidas o líquidas son, por ejemplo, aerosoles, (micro)cápsulas, cremas, gotas, gotas o soluciones inyectables en forma de ampollita, emulsiones, gránulos, polvos, supositorios, suspensiones, jarabes, tabletas, tabletas recubiertas, y además preparaciones con liberación prolongada de compuestos activos, en cuya preparación se usan habitualmente excipientes y aditivos y/o auxiliares tales como aglutinantes, agentes de recubrimiento, agentes disgregantes, aromatizantes, lubricantes, solubilizantes, edulcorantes, o
45 agentes de hinchamiento como se describe anteriormente. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para su uso en una variedad de sistemas de administración de fármacos. Para una revisión breve de los varios métodos de administración de fármacos, ver Langer, "New Methods of Drug Delivery," Science 249:1527-1533 (1990).

50 La laminina, composiciones de laminina, u otros agentes terapéuticos de la presente descripción pueden formularse en composiciones farmacéuticas terapéuticamente activas que pueden administrarse a un sujeto parenteralmente u oralmente. Las rutas de administración parenteral incluyen, pero sin limitarse a inyección epidérmica, intraarterial, intramuscular (IM y depósito IM), intraperitoneal (IP), intravenosa (IV), intraesternal o técnicas de infusión, intranasal (inhalación), intratecal, inyección en el estómago, inyecciones subcutáneas (subcutánea (SQ y depósito SQ), transdérmica, tópica, y. oftálmica.

55 La laminina, composición de laminina, u otro agente terapéutico puede mezclarse o combinarse con unos excipientes adecuados farmacéuticamente aceptables para preparar composiciones farmacéuticas. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitarse a, alúmina, estearato aluminico, tampones (tales como fosfatos), glicina, intercambiadores de iones (tales como para ayudar a la liberación controlada de sustancias cargadas),
60 lecitina, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, sorbato potásico, proteínas de suero (tales como albúmina sérica humana), ácido sórbico, agua, sales o electrolitos tales como sustancias a base de celulosa, sílice coloidal, hidrogeno fosfato disódico, trisilicato magnésico, poliacrilatos, polialquilenglicoles, tales como polietilenglicol, polímeros de bloque polietileno-polioxipropileno, polivinilo pirrolidona, hidrógeno fosfato potásico, sulfato de protamina, sales de haluros del grupo 1 tales como cloruro sódico, carboximetilcelulosa sódica, ceras, grasa de lana,

y sales de cinc, por ejemplo. Las suspensiones liposomales además pueden ser portadores adecuados farmacéuticamente aceptables.

5 Tras la mezcla o adición de la laminina, composición de laminina, u otro agente terapéutico, la mezcla resultante puede ser un sólido, una solución, una suspensión, una emulsión, o similar. Estos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por el experto en la técnica. La forma de la mezcla resultante depende de un número de factores, que incluyen el modo de administración pretendido y la solubilidad del agente en el portador seleccionado.

10 Los portadores farmacéuticos adecuados para la administración de la laminina, composición de laminina, u otro agente terapéutico incluyen cualquiera de tales portadores conocidos por ser adecuados para el modo particular de administración. Adicionalmente, la laminina, composición de laminina, u otra sustancia terapéutica puede mezclarse además con otros materiales inactivos o activos que no perjudiquen la acción esperada, o con materiales que complementan la acción esperada, o tienen otra acción.

15 Los métodos para la solubilización pueden usarse cuando los agentes exhiben una solubilidad insuficiente en un portador. Tales métodos son conocidos e incluyen, pero sin limitarse a, la disolución en bicarbonato sódico acuoso, mediante el uso de disolventes tales como dimetilsulfóxido (DMSO), y mediante el uso de surfactantes tales como el TWEEN® (ICI Americas, Inc., Wilmington, DE).

20 La laminina, composición de laminina, u otro agente terapéutico puede prepararse con portadores que los protegen contra la eliminación rápida en el cuerpo, tales como formulaciones de liberación prolongada o de recubrimientos. Tales portadores incluyen formulaciones de liberación controlada, tales como, pero sin limitarse a, sistemas de administración microencapsulados. La laminina, composición de laminina, u otro agente terapéutico se incluye en el portador farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil, típicamente en una cantidad para evitar efectos secundarios no esperados, en el sujeto tratado. La concentración terapéuticamente eficaz puede determinarse empíricamente mediante la prueba de los compuestos en los sistemas modelos conocidos *in vitro* e *in vivo* para la afección tratada. Por ejemplo, los modelos de ratón de distrofia muscular pueden usarse para determinar las cantidades o concentraciones eficaces que pueden después traducirse a otros sujetos, tales como los humanos, como es conocido en la técnica.

30 Las soluciones o suspensiones inyectables pueden formularse, usando diluyentes o solventes no tóxicos adecuados, parenteralmente aceptables, tales como 1,3-butanodiol, solución isotónica de cloruro sódico, manitol, solución de Ringer, solución salina, o agua; o dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión, tales como aceites fijos esteriles, suaves, que incluyen mono- o diglicéridos sintéticos, y ácidos grasos, que incluyen ácido oleico; un aceite vegetal de origen natural tal como aceite de nuez de coco, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, y similares; glicerina; polietilenglicol; propilenglicol; u otro disolvente sintético; agentes antimicrobianos tales como alcohol bencílico y metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico y bisulfito sódico; tampones tales como acetatos, citratos, y fosfatos; agentes quelante tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); agentes para el ajuste de tonicidad tales como cloruro sódico y dextrosa; y combinaciones de estas. Las preparaciones parenterales pueden encerrarse en ampollas, jeringas desechables, o viales de múltiples dosis hechos de vidrio, plástico, u otro material adecuado. Los amortiguadores, conservantes, antioxidantes, y similares se pueden incorporar según se requiera. Cuando se administra por vía intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, solución salina tamponada con fosfato (PBS), y soluciones que contienen agentes espesantes y solubilizantes tales como glucosa, polietilenglicol, polipropilenglicol, y mezclas de estos. Las suspensiones liposomales, que incluyen liposomas dirigidos al tejido, pueden además ser portadores adecuados farmacéuticamente aceptables.

50 Para la aplicación tópica, la laminina, composición de laminina, u otro agente terapéutico puede fabricarse en una crema, loción, ungüento, solución, o suspensión en un portador adecuado acuoso o no acuoso. La aplicación tópica puede lograrse además mediante parches transdérmicos o vendajes que incluyen la sustancia terapéutica. Los aditivos pueden incluirse además, por ejemplo, tampones tales como metabisulfito de sodio o edetato disódico; conservantes tales como agentes bactericidas y fungicidas, que incluyen, acetato o nitrato fenil mercurio, cloruro de benzalconio, o clorhexidina; y agentes de espesamiento, tal como hipromelosa.

55 Si la laminina, composición de laminina, u otro agente terapéutico se administra oralmente como una suspensión, las composiciones farmacéuticas pueden prepararse de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica y pueden contener un agente de suspensión, tal como ácido algínico o alginato sódico, agente de carga, tal como celulosa microcristalina, un mejorador de viscosidad, tal como metilcelulosa, y agentes edulcorantes/aromatizantes. Las preparaciones líquidas orales pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, por ejemplo, gelatina, jarabe de maíz, grasas comestibles hidrogenadas, metilcelulosa, sorbitol, y jarabe; agentes emulsificantes, por ejemplo, acacia, lecitina, o monooleato de sorbitán; portadores no acuosos (que incluyen, aceites comestibles), por ejemplo, aceite de almendras, aceite de nuez de coco fraccionado, ésteres aceitosos tales como glicerina, propilenglicol, o alcohol etílico; conservantes tales como metil o propil p-hidroxibenzoato o ácido sórbico; y, si se desea, agentes aromatizantes o colorantes convencionales. Cuando se formula como tabletas de liberación inmediata, estas composiciones pueden contener fosfato dicálcico, lactosa, estearato magnésico, celulosa microcristalina, y almidón y/u otros aglutinantes, diluyentes, disgregantes, excipientes, diluyentes, y lubricantes.

Si se desea la administración oral, la laminina, composición de laminina, u otra sustancia terapéutica puede proporcionarse en una composición que la protege del medio ambiente ácido del estómago. Por ejemplo, la laminina, composición de laminina, u otro agente terapéutico puede formularse con un recubrimiento entérico que mantiene su integridad en el estómago y libera el compuesto activo en el intestino. La laminina, composición de laminina, u otro agente terapéutico puede formularse además en combinación con un antiácido u otro de tal ingrediente.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible y pueden comprimirse en tabletas o encerrarse en cápsulas de gelatina. Para el propósito de la administración terapéutica oral, la laminina, composición de laminina, u otra sustancia terapéutica puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de cápsulas, tabletas, o trociscos. Los agentes de unión o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles pueden incluirse como parte de la composición.

Las cápsulas, píldoras, tabletas, trociscos, y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como, pero sin limitarse a, acacia, almidón de maíz, gelatina, goma de tragacanto, polivinilpirrolidona, o sorbitol; una carga tal como fosfato cálcico, glicina, lactosa, celulosa microcristalina, o almidón; un agente desintegrante tal como, pero sin limitarse a, ácido algínico y almidón de maíz; un lubricante tal como, pero sin limitarse a, estearato magnésico, polietilenglicol, sílice, o talco; un agente de deslizamiento tal como, pero sin limitarse a, dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; desintegrantes tal como almidón de papa; agentes dispersantes o humectantes tales como laurilsulfato sódico; y un agente aromatizante tal como yerbabuena, salicilato de metilo, o aromatizante de fruta.

Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, ésta puede contener, además del material del tipo anterior, un portador líquido, tal como un aceite graso. Adicionalmente, las formas de dosificación unitaria pueden contener varios de otros materiales que modifican la forma física de la unidad de dosificación por ejemplo, revestimientos de azúcar y otros agentes entéricos. La laminina, composición de laminina, u otro agente terapéutico puede administrarse además como un componente de un elixir, suspensión, jarabe, galleta, té, goma de mascar, o similar. Un jarabe puede contener, adicionalmente a los compuestos activos, sacarosa o glicerina como un agente edulcorante y ciertos conservantes, colorantes y tintes, y sabores.

Cuando se administran oralmente, los compuestos pueden administrarse en formas de dosificación usuales para la administración oral. Estas formas de dosificación incluyen las formas usuales de dosificación unitaria sólida de tabletas y cápsulas, así como también formas de dosificación líquidas tales como soluciones, suspensiones, y elixires. Cuando se usan las formas de dosificación sólidas, ellas pueden ser del tipo de liberación sostenida de manera que los compuestos necesitan administrarse con menor frecuencia.

Como se explica en otra parte en la presente descripción, sorprendentemente y contrario a las expectativas anteriores, se ha determinado que la laminina se absorbe fácilmente por los sujetos y se hace disponible fisiológicamente. Por ejemplo, se ha demostrado que la laminina inyectada en el estómago de un sujeto se incorpora sistémicamente en el sujeto, tal como en diversos grupos musculares. La inyección intraperitoneal produjo además la distribución sistémica de la laminina, que incluye la distribución de la laminina al diafragma, los músculos gastrocnemios, y los músculos cardíacos. En ejemplos adicionales, cuando la administración se produce por inyección intramuscular, se ha encontrado que la laminina permea a los grupos musculares cercanos. En consecuencia, se cree que la administración de la laminina puede no padecer de algunos de los problemas severos de administración que han plagado a otras proteínas, particularmente a las proteínas grandes. Los ejemplos de métodos y composiciones para la administración de sustancias terapéuticas que incluyen proteínas incluyen los descritos en Banga, *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems* 2 ed. (2005); Mahato, *Biomaterials for Delivery and Targeting of Proteins and Nucleic Acids* (2004); McNally, *Protein Formulation and Delivery*, 2 ed. (2007); y Kumar y otros, "Novel Delivery Technologies for Protein and Peptide Therapeutics," *Current Pharm. Biotech.*, 7:261-276 (2006).

"Inhibir" una enfermedad o afección se refiere a inhibir el desarrollo de una enfermedad o afección, por ejemplo, en un sujeto que está en riesgo de una enfermedad o que tiene una enfermedad particular. Los métodos particulares de la presente descripción proporcionan métodos para inhibir la distrofia muscular. "Tratamiento" se refiere a una intervención terapéutica que atenúa un signo o síntoma de una enfermedad o afección después de que ha comenzado a desarrollarse. Como se usa en la presente, el término "atenuación", con referencia a una enfermedad o afección, se refiere a cualquier efecto beneficioso observable del tratamiento. El efecto beneficioso puede evidenciarse, por ejemplo, por un retraso en la aparición de los síntomas clínicos de la enfermedad o afección en un sujeto susceptible, una reducción en la severidad de algunos o todos los síntomas clínicos de la enfermedad o afección, una progresión más lenta de la enfermedad o afección, una reducción en el número de recaídas de la enfermedad o afección, una mejora en el estado general de salud o bienestar del sujeto, por otros parámetros bien conocidos en la técnica que son específicos a la enfermedad o afección particular, y combinaciones de tales factores.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz para la disminución, la atenuación, la eliminación, la prevención, o la inhibición de al menos un síntoma de una enfermedad, trastorno, o afección tratada y puede determinarse empíricamente. En varias modalidades de la presente descripción, una "cantidad terapéuticamente eficaz"

es una "cantidad que promueve la regeneración muscular," una cantidad suficiente para lograr una promoción estadísticamente significativa regeneración de tejido o celular, tal como la regeneración de células musculares, comparado con un control.

5 Particularmente, los indicadores de salud muscular, tales como la regeneración, el mantenimiento o la reparación de células musculares, pueden evaluarse a través de varios medios, que incluyen los marcadores de monitoreo de la regeneración muscular, tales como los factores de transcripción tales como Pax7, Pax3, MyoD, MRF4 y miogenina. Por ejemplo, la expresión aumentada de tales marcadores puede indicar que la regeneración muscular se produce o se produjo recientemente. Los marcadores de regeneración muscular, tales como la expresión de la cadena pesada de la miosina embrionaria (eMyHC), pueden usarse además para medir la extensión de la regeneración, mantenimiento, o
10 reparación muscular. Por ejemplo, la presencia de eMyHC puede indicar que la regeneración muscular ocurrió recientemente en un sujeto.

15 La regeneración, el mantenimiento, o la reparación celular muscular pueden monitorearse además mediante la determinación de la circunferencia, o el área media de la sección transversal, de células musculares o la densidad de las fibras musculares. Los indicadores adicionales de la afección muscular incluyen el peso muscular y el contenido de proteínas musculares. El índice mitótico (tal como mediante la medición de la incorporación de BrdU) y la miogénesis pueden usarse además para evaluar la extensión de la regeneración muscular.

20 En ejemplos particulares, la mejora en la condición del músculo, tal como la regeneración, comparado con un control es al menos aproximadamente 10%, tal como al menos aproximadamente 30%, o al menos aproximadamente 50% o más.

En algunas implementaciones, la cantidad eficaz de laminina o composición de laminina se administra en una dosis individual por un periodo de tiempo, tal como cada tres o cuatro meses, mes, semana, o día, o puede dividirse en al menos dos dosificaciones unitarias para la administración durante un período. El tratamiento puede continuar por un periodo tan largo como fuera necesario hasta lograr los resultados esperados. Por ejemplo, el tratamiento puede continuar durante aproximadamente 3 o 4 semanas hasta aproximadamente 12 - 24 meses o más, incluyendo el tratamiento en curso. El compuesto puede administrarse además intermitentemente en diversas dosis, tal como cada pocos días (por ejemplo, al menos aproximadamente cada dos, tres, cuatro, cinco, o diez días) o cada pocas semanas (por ejemplo al menos aproximadamente cada dos, tres, cuatro, cinco, o diez semanas).
25 30

Los regímenes de dosificación particulares pueden adaptarse a un sujeto en particular, afección a tratar, o resultado esperado. Por ejemplo, cuando se usan los métodos de la presente descripción para tratar la distrofia muscular o afecciones similares, un régimen de tratamiento inicial puede aplicarse para detener la afección. Tal régimen de tratamiento inicial puede incluir administrar una dosificación mayor de la laminina o composición de laminina, o administrar tal material más frecuentemente, tal como diariamente. Después de haberse obtenido un resultado terapéutico esperado, tal como un nivel esperado de la regeneración muscular, un segundo régimen de tratamiento puede aplicarse, tal como administrar una dosificación menor de laminina o composición de laminina o administrar tal material menos frecuentemente, tal como mensualmente, bimensualmente, trimestralmente o semestralmente. En tales casos, el segundo régimen puede servir como un "reforzador" para restaurar o mantener un nivel esperado de regeneración muscular. Regímenes de tratamiento similares pueden usarse para otros sujetos con capacidad de regeneración muscular reducida o defectuosa, tales como los sujetos geriátricos.
35 40

Cuando se usan métodos particulares de la presente descripción para prevenir o mitigar el daño muscular, tal como el daño causado por el esfuerzo o la lesión, el sujeto se trata típicamente en un período de tiempo suficiente antes de que el esfuerzo o la lesión con el objetivo de proporcionar efecto terapéutico. Por ejemplo, el sujeto puede tratarse al menos aproximadamente 24 horas antes de la actividad esperada o lesión potencial, tal como al menos aproximadamente 48 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente tres semanas, o aproximadamente 4 semanas o más antes.
45 50

Cuando se usan modalidades del método de la presente descripción para promover la cicatrización de heridas, la laminina-1, composición de laminina-1, pueden aplicarse directamente a, o próximamente a, el área a tratar. Por ejemplo, la sustancia puede inyectarse en o cerca del área. En ejemplos adicionales, la sustancia puede aplicarse en forma tópica al área a tratar. El tratamiento suele iniciarse antes de la lesión hasta diversas semanas después de la lesión. En implementaciones más específicas, el tratamiento se inicia entre aproximadamente 12 y aproximadamente 72 horas después de la lesión, tal como entre aproximadamente 24 y aproximadamente 48 horas después de la lesión. En algunos casos, una administración individual de la sustancia es eficaz para proporcionar el efecto terapéutico esperado. En ejemplos adicionales las administraciones adicionales se proporcionan con el objetivo de lograr el efecto terapéutico esperado.
55 60

Las cantidades eficaces para varios tratamientos terapéuticos de la presente descripción pueden, por supuesto, depender de la severidad de la enfermedad y del peso y estado general del sujeto, así como también las velocidades de absorción, inactivación, y excreción del compuesto terapéuticamente activo o componente, el programa de dosificación, y la cantidad administrada, así como también de otros factores conocidos por los expertos en la técnica. Además debería ser evidente para un experto en la técnica que la dosificación y frecuencia exactas de administración
65

5 dependerán de la laminina particular, composición de laminina, u otra sustancia terapéutica que se administre, la afección particular que se trata, la severidad de la afección que se trata, la edad, el peso, la condición física general del sujeto en particular, y de otra medicación que el sujeto pueda estar tomando. Típicamente, las dosificaciones usadas *in vitro* pueden proporcionar una guía útil en las cantidades útiles para la administración *in vivo* de la composición farmacéutica, y los modelos animales pueden usarse para determinar las dosificaciones eficaces para el tratamiento de trastornos particulares. Por ejemplo, los modelos de ratón de distrofia muscular pueden usarse para determinar las dosificaciones eficaces que después pueden traducirse a la cantidad de dosificación para otros sujetos, tales como los humanos, como se conoce en la técnica. Varias consideraciones en la determinación de la dosificación se describen, por ejemplo, en Gilman y otros, eds., Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8va ed., Pergamon Press (1990); y Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ma ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1990).

15 En ejemplos específicos, la laminina o composición de laminina se administra a un sujeto en una cantidad suficiente para proporcionar una dosificación de laminina de entre aproximadamente 10 nmol/g y aproximadamente 500 nmol/g, tal como entre aproximadamente 2 nmol/g y aproximadamente 20 nmol/g o entre aproximadamente 2 nmol/g y aproximadamente 10 nmol/g. En ejemplos adicionales, la laminina o composición de laminina se administra a un sujeto en una cantidad suficiente para proporcionar una dosificación de laminina de entre aproximadamente 0.01 µg/kg y aproximadamente 1000 mg/kg o entre aproximadamente 0.1 mg/kg y aproximadamente 1000 mg/kg, en ejemplos particulares esta cantidad se proporciona por día o por semana. En otro ejemplo, la laminina o composición de laminina se administra a un sujeto en una cantidad suficiente para proporcionar una dosificación de laminina de entre aproximadamente 0.2 mg/kg y aproximadamente 2 mg/kg. En ejemplos adicionales, la laminina o composición de laminina se administra a un sujeto en una cantidad suficiente para proporcionar una concentración de laminina en el material administrado de entre aproximadamente 5 nM y aproximadamente 500 nM, tal como entre aproximadamente 50 nM y aproximadamente 200 nM, o aproximadamente 100 nM.

25 Descripción

Generalmente, la presente descripción proporciona una composición para mejorar la reparación, regeneración, o mantenimiento de tejidos o células, incluyendo el tratamiento prospectivo contra la lesión posterior, daño o enfermedad. En varias modalidades, la presente descripción proporciona métodos de tratamiento de la distrofia muscular, mejora de la reparación muscular después de lesiones o daños, o la reducción de la gravedad de la lesión muscular o daños. Otras modalidades proporcionan un método para mejorar la cicatrización de heridas.

35 En algunas modalidades el método incluye administrar una cantidad eficaz de laminina-1 o una composición que incluye una cantidad eficaz de laminina-1.

Sin pretender limitarse a un mecanismo de acción particular, se cree que la laminina ayuda a la regeneración muscular mediante la activación de las células satélite para proliferar y diferenciarse a nuevas células musculares y miotubos. En consecuencia, la reparación muscular puede mejorarse en comparación con la condición nativa del sujeto.

40 Particularmente cuando se usan los métodos para tratar la distrofia muscular, y de nuevo sin estar unido a una teoría de operación, la laminina puede ayudar además en la unión de los componentes de la matriz extracelular, tales como la unión a la distrofina o a la $\alpha\beta 1$ integrina. Por ejemplo, en la distrofia muscular de Duchenne, cantidades aumentadas de laminina pueden ayudar en la formación de conexiones con la membrana basal a través de la unión de la $\alpha\beta 1$ integrina u otro receptor, tal como la utrofina, que es homóloga a la distrofina. La administración de laminina puede además regular positivamente la expresión de uno o más componentes de la red costamérica, tales como la utrofina o la $\alpha\beta 1$ integrina, lo que proporciona potencialmente puntos de enlace adicionales entre la matriz extracelular y el resto del costámero. La laminina puede proporcionar además un medio ambiente estructural para mejorar la integridad del tejido.

50 En modalidades adicionales, la presente descripción proporciona métodos para promover la regeneración muscular. La regeneración muscular puede beneficiar, por ejemplo, a poblaciones geriátricas u otras de pacientes con capacidad de reparación muscular reducida, o simplemente acelerar el proceso de reparación muscular para los pacientes de cualquier otra forma fisiológicamente no defectuosos. En implementaciones particulares, la administración de laminina puede ayudar a la reparación muscular, o a la reducción del daño muscular, en atletas u otros que tienen una lesión o daño muscular inducido por la actividad. Aún en otras implementaciones, la reparación muscular en pacientes que padecen de daño muscular, tales como a través de un accidente o lesión, puede aumentarse mediante la administración de laminina.

60 En diversos ejemplos de la presente descripción, la laminina o composición de laminina se administra con uno o más de otros componentes, tales como componentes de la matriz extracelular. Por ejemplo, la sustancia adicional puede incluir agregano, angiostatina, cadherinas, colágenos (que incluyen, colágeno I, colágeno III, o colágeno IV), decorina, elastina, enactina, endostatina, fibrina, fibronectina, osteopontina, tenascina, trombospondina, vitronectina, y combinaciones de estas. Biglicanos, glicosaminoglicanos (tal como, heparina), glicoproteínas (tal como distroglicano), proteoglicanos (tal como sulfato de heparán), y combinaciones de estas pueden administrarse, además. Una laminina particular puede administrarse con otras formas de laminina, análogos de laminina, derivados de laminina, o un fragmento de cualquiera de los anteriores.

Pueden añadirse estimulantes del crecimiento junto con la laminina o composición de laminina. Los ejemplos de estimulantes del crecimiento incluyen citocinas, polipéptidos, y factores de crecimiento tales como factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), CNF (factor neurotrófico ciliar), EGF (factor de crecimiento epidérmico), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), factor de crecimiento glial (GGF), factor de maduración glial (GMF), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), insulina, factores de crecimiento similares a la insulina, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotropina-3 y 4, PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y combinaciones de estos.

Pueden añadirse agentes terapéuticos adicionales para mejorar el efecto terapéutico de la laminina o composición de laminina. Por ejemplo, puede añadirse una fuente de células musculares para ayudar en la regeneración y la reparación muscular. En algunos aspectos de la presente descripción, las células satélites se administran a un sujeto en combinación con la terapia de laminina. La publicación de patente de los Estados Unidos 2006/00 14287, proporciona métodos para enriquecer una recolección de células en células miogénicas y administrar esas células a un sujeto.

En aspectos adicionales, las células madre, tales como las células madre derivadas adiposas, se administran al sujeto. Los métodos adecuados para preparar y administrar células madre derivadas adiposas se describen en la publicación de patente de los Estados Unidos 2007/0025972. En algunos ejemplos pueden administrarse materiales celulares adicionales, tales como fibroblastos.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar elementos y/o modalidades particulares.

Ejemplo 1

Materiales y Métodos

Animales

Los ratones silvestres (C57BL/6), los $\alpha 7$ integrina nulos (C57BL/6 de fondo), y los nestina-GFP (C57BL/6 de fondo) usados en estos estudios se sacrificaron de acuerdo con los protocolos aprobados por los Comités Institucionales de Uso y Cuidado Animal de la Universidad de Nevada, Reno y la Universidad de Washington, Seattle.

Histología

Los músculos tibialis anteriores (TA) se embebieron en Temperatura Óptima de Corte (OCT) (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance, California, Estados Unidos) y se cortaron criosecciones de 10 μm (separados a $\geq 50 \mu\text{m}$) mediante el uso de un criostato Leica CM1850 y se colocaron sobre portaobjetos de microscopio Surgipath (Surgipath Medical Industries, Richmond, IL). Las secciones de tejido se tiñeron mediante el uso de hematoxilina y eosina (H&E) como se describió previamente en Rooney y otros, "Severe muscular dystrophy in mice that lack dystrophin and alpha7 integrin," J. Cell Sci. 119:2185-2195 (2006), incorporada como referencia en la presente en la medida que no sea inconsistente con la presente descripción. Se contaron los mionúcleos centrales en los músculos en regeneración a un aumento de 630X mediante microscopía de campo claro. El número de núcleos centrales por fibra muscular se determinó mediante el conteo de un mínimo de 1000 fibras musculares por animal. Al menos se analizaron cinco animales de cada genotipo. Adicionalmente, el área de la sección transversal se examinó en un mínimo de 5000 fibras musculares por grupo por punto de tiempo. Los resultados se reportaron como el área promedio de la sección transversal de la fibra.

Inmunofluorescencia

Los músculos TA se embebieron en el compuesto Temperatura Óptima de Corte de Tissue-TEK (Sakura Finetek Estados Unidos Inc., Torrance, CA). Se cortaron secciones a 10 μm mediante el uso de un criostato Leica CM1850 y se colocaron sobre portaobjetos de microscopio Surgipath (Surgipath Medical Industries, Richmond, IL). La cadena $\alpha 2$ de la laminina se detectó con una dilución 1:500 de anticuerpo policlonal de conejo anti-laminina $\alpha 2$ (2G) (un amable regalo de Peter Yurchenco, Robert Wood Johnson Medical School, Departamento de Patología, Piscataway, NJ). La cadena $\alpha 1$ de la laminina se detectó mediante el uso de un anticuerpo anti-laminina $\alpha 1$ (sc-5582, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Los anticuerpos primarios de conejo se detectaron con una dilución 1:500 de anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Para los anticuerpos monoclonales de ratón, la inmunoglobulina de ratón endógena se bloqueó con un kit ratón-en-ratón (MOM) (Vector Laboratories, Burlingame, CA). La expresión de MyoD y Pax7 se detectó mediante el uso de anti-MyoD y anti-Pax7 a 5 $\mu\text{g/ml}$ (Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), Iowa City, IA). eMyHC se detectó como se describió previamente (Rooney y otros, 2006). Se usó una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ de aglutinina de germen de trigo (WGA) conjugada con tetrametilrodamina (Molecular Probes, Eugene, OR) para definir las fibras musculares. La fluorescencia se observó con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop 2 Plus y las imágenes se capturaron con una cámara digital Zeiss AxioCam HRC y el programa informático Axiovision 4.1 (todos disponibles de Carl Zeiss

MicroImaging, Thornwood, NY). Se analizaron múltiples secciones adyacentes en 20 campos microscópicos aleatorios no superpuestos, por animal a un aumento de 630X.

5 Las miofibrillas individuales se aislaron a partir del músculo extensor largo de los dedos de ratones transgénicos nestina-GFP de 10 semanas de edad después de la digestión con colagenasa y se cultivaron individualmente en pocillos recubiertos con Matrigel como se describió previamente (Shefer, y otros, "Skeletal muscle satellite cells can spontaneously enter an alternative mesenchymal pathway," J. Cell Sci.117:5393-5404 (2004); Shefer, y otros, "Isolation and culture of skeletal muscle myofibers as a means to analyze satellite cells," Methods Mol. Biol. 290:281-304 (2005); cada uno de los cuales se incorpora como referencia en la presente en la medida en que no sean inconsistentes con la presente descripción). Las miofibrillas individuales adherentes se fijaron en paraformaldehído al 4% y se incubaron con una dilución 1:1000 de anticuerpo monoclonal de rata anti- $\alpha 7$ integrina (CA5.5) (Sierra BioSource, Morgan Hill, CA). El anticuerpo de rata anti- $\alpha 7$ integrina se detectó mediante el uso de un anticuerpo secundario anti-rata marcado con rodamina. Tanto la fluorescencia de rodamina y GFP se detectaron mediante el uso de un microscopio de fluorescencia invertida (Nikon eclipse, TE2000-S, Nikon Instruments, Inc., Melville, NY) y las imágenes fueron adquiridas con una cámara CCD monocromática CoolSNAP^{ES} (Princeton Instruments Inc., Trenton, NJ) controlada por el sistema de imágenes MetaVue (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA).

Colorante azul de Evan

20 Los ratones se inyectaron de forma intraperitoneal con 50 μ l de una solución a 10 mg/ml de solución estéril de colorante azul de Evan (EBD) por 10 g de peso corporal. Después de 3 horas, el músculo TA se cosechó y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido. Se colocaron criosecciones de 10 μ m sobre portaobjetos de microscopio y se fijaron en paraformaldehído al 4%. Las fibras musculares se esbozaron mediante la incubación de secciones de tejido con aglutinina de germen de trigo conjugada con Oregon Green-488 (2 μ g/ml, Molecular Probes, Eugene, OR). Se contó un mínimo de 1000 fibras por animal para determinar el porcentaje de fibras musculares positivas para EBD. Al menos se analizaron cuatro animales de cada genotipo. Las imágenes se capturaron y el conteo se realizó a un aumento de 630X.

Incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU)

30 La BrdU (500 mg/kg) se inyectó de forma intraperitoneal a las 72 horas, 48 horas y 24 horas antes de la cosecha del músculo. Las criosecciones de músculo se fijaron en etanol al 95% por 1 minuto. Después las secciones se enjuagaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se trataron con ácido clorhídrico (HCl) 2N por 20 minutos. Las secciones se neutralizaron en cloruro sódico (NaCl) 50 mM por 20 minutos, seguido de incubación en Tris-HCl 100 mM por 20 minutos y se enjuagaron en PBS. El tejido se incubó con el anticuerpo anti-BrdU (G3G4, 1:1000, Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), Iowa City, IA) por 1 hora, se lavó en PBS y se montó en Vectashield (Vector Labs, Burlingame, CA).

Lesión muscular inducida por cardiotoxina

40 Los ratones se anestesiaron con avertina (0.25 μ l/g de peso corporal) y se inyectaron 100 μ l de una solución de cardiotoxina 10 μ m (C3987, Sigma, St. Louis, MO) en PBS en el músculo TA izquierdo de ratones macho silvestres y $\alpha 7^{-/-}$ de 5 semanas de edad. Los músculos TA derechos se inyectaron con 100 μ l de PBS y se usaron como controles. Los ratones se sacrificaron y los músculos se cosecharon a los 4, 7, 10, y 28 días después de la inyección de cardiotoxina para el análisis.

Inyecciones de laminina-111

50 Tres días antes de la inyección de cardiotoxina se inyectó laminina de ratón natural (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 100 nM en PBS en el músculo TA izquierdo de ratones silvestres y $\alpha^{-/-}$ anestesiados. Los músculos TA derechos se inyectaron con 100 μ l de PBS y sirvieron como controles. Los músculos se cosecharon en los 0, 4, 7, 10 y 28 días posteriores a la inyección de cardiotoxina para el análisis.

Análisis Estadístico

55 Todos los datos promediados se reportan como la media $\pm$ la desviación estándar. Las comparaciones entre los múltiples grupos se realizaron mediante análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) para los datos paramétricos o análisis unidireccional de la varianza o de rangos de Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos mediante el uso del programa informático SigmaStat 1.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA). $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

Expresión de integrina en células satélites en reposo

60 Para confirmar que la $\alpha 7$ integrina se expresa en las células satélites, las miofibrillas aisladas a partir de ratones transgénicos nestina-GFP se sometieron a inmunofluorescencia mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha 7$ integrina (Figura 1). La nestina-GFP se expresa específicamente en las células satélites en reposo. Todas las células

positivas para nestina-GFP en la superficie de la miofibrilla fueron positivas además para la $\alpha 7$ integrina (Figura 1). El análisis de la imagen indicó la localización más fuerte de la $\alpha 7$ integrina en la superficie basal de las células satélite. Estos datos confirman que las células satélite en reposo expresan la $\alpha 7$ integrina y la localización está enriquecida en la superficie basal orientada a las miofibrillas musculares.

Reparación muscular en ratones nulos para integrina

Estudios recientes sugieren que la $\alpha 7$ integrina juega un papel en la activación y/o la proliferación de las células satélite. Para examinar si la $\alpha 7\beta 1$ integrina se requiere para la reparación muscular, el músculo tibialis anterior (TA) de ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina se sometió a la lesión inducida por cardiotoxina y se examinó 4, 10 y 28 días más tarde (Figura 2). Cuatro días después de la lesión por cardiotoxina, el músculo TA silvestre pareció sano y esta apariencia persistió por 28 días. En contraste, el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina exhibió grandes regiones blancas de músculo dañado a los 4 y 10 días posteriores a la lesión. A los 28 días, las regiones de daño muscular eran todavía evidentes en el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina. Estos datos sugieren que la pérdida de la $\alpha 7$ integrina en el músculo esquelético resulta en un retraso profundo en la regeneración muscular.

La pérdida de la $\alpha 7$ integrina resulta en la disminución de la integridad de la membrana después de la lesión

Para examinar la integridad de la membrana después del tratamiento con cardiotoxina, se inyectaron ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina con colorante azul de Evan (EBD). La captación de EBD estuvo ausente en ambos grupos antes de la inyección de cardiotoxina (Figura 3). Aunque el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina fue negativo para la captación de EBD antes de la inyección de cardiotoxina, 7 veces más miofibrillas fueron positivas para EBD en el día 4 en comparación con las silvestres. En el día 4 posterior a la lesión, 8.5% de las miofibrillas silvestres y 66% de las nulas para $\alpha 7$ integrina fueron positivas para EBD. Después de 10 días, menos de 4% de las miofibrillas silvestres fueron positivas para la captación de EBD, mientras que 40% de las miofibrillas deficientes en $\alpha 7$ integrina fueron positivas para EBD. A los 28 días posteriores a la inyección de cardiotoxina, 17% de las fibras musculares nulas para $\alpha 7$ integrina todavía eran positivas para EBD, mientras que no se observó EBD en el músculo silvestre ($P < 0.05$), (Figura 3). Estos resultados indican que la pérdida de $\alpha 7$ integrina resulta en el aumento de la fragilidad del sarcolema después de la lesión inducida por cardiotoxina.

Reparación muscular reducida en ratones nulos para $\alpha 7$ integrina

Se usó la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) para examinar el infiltrado de células mononucleares y los núcleos centralmente localizados después de la lesión inducida por cardiotoxina (Figura 4, la barra de escala indica 10 μ m). Cuatro días después de la lesión por cardiotoxina, el músculo silvestre exhibió infiltrado de células mononucleares y miofibrillas que contienen núcleos centralmente localizados (Figura 4). En el día 10, el músculo silvestre exhibió poco infiltrado mononuclear y la mayoría de las miofibrillas contenía núcleos centralmente localizados. A los 28 días en el músculo silvestre, la reparación era completa y la mayoría de las miofibrillas contenía núcleos centralmente localizados y era evidente poco infiltrado de células mononucleares. En contraste, después de 4 días posteriores al daño inducido por cardiotoxina, el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina exhibió un extenso infiltrado de células mononucleares y fibras musculares hipotróficas lo que se extendió a 10 días posteriores a la lesión por cardiotoxina (Figura 4). A los 28 días, el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina exhibió miofibrillas hipotróficas que contenían núcleos centralmente localizados e infiltrado de células mononucleares.

Para cuantificar la reparación muscular, se calculó el porcentaje de miofibrillas con núcleos centralmente localizados (Figura 5). En los ratones silvestres, 81.8% de las fibras musculares contenía núcleos centralmente localizados a los 4 días posteriores a la lesión por cardiotoxina. En contraste sólo 28.1% de las fibras musculares en el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina fueron positivas para núcleos centralmente localizados ($P < 0.05$). A los 10 y 28 días, 95.5% y 97.5% de las fibras musculares, respectivamente, en los ratones silvestres mostraron núcleos centralmente localizados. En los días 10 y 28, 82% y 95.5% de las fibras musculares en el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina, respectivamente, exhibieron núcleos centralmente localizados que fueron inferiores a los silvestres ($P < 0.05$). Estos resultados indican que la pérdida de la $\alpha 7$ integrina resulta en el retraso de la regeneración muscular.

La cadena pesada de la miosina embrionaria (eMyHC) se expresa transitoriamente después de la reparación muscular y se usa como un marcador de la regeneración muscular reciente. En el día 0 hubo una ausencia de eMyHC en ambos ratones silvestre y nulo para $\alpha 7$ integrina (Figura 6). A los 4 y 10 días posteriores al tratamiento con cardiotoxina, se detectó expresión de eMyHC en más de 99% de las fibras musculares silvestres (Figura 6). En fuerte contraste, sólo 2.2% y 9.9% de las fibras musculares nulas para $\alpha 7$ integrina expresaron eMyHC a los 4 y 10 días respectivamente después de la lesión por cardiotoxina (Figura 6). En el día 28, sólo 11.3% de las miofibrillas nulas para $\alpha 7$ integrina fueron positivas para eMyHC, mientras que 18.5% del músculo silvestre fue positivo para eMyHC ($*P < 0.001$). Estos resultados confirman que la pérdida de la $\alpha 7$ integrina resulta en la reparación muscular defectuosa como se midió mediante la expresión transitoria de eMyHC.

La lesión por cardiotoxina resulta en fibras musculares hipotróficas en ratones nulos para $\alpha 7$ integrina

Para determinar si la pérdida de la $\alpha 7$ integrina afectó la reparación muscular después de la lesión, se midió el área de la sección transversal de las miofibrillas (Figura 7). Las fibras musculares en regeneración en ratones silvestres eran 31% más grandes que las fibras musculares nulas para $\alpha 7$ integrina 4 días posteriores a la lesión por cardiotoxina (Figura 7). En el día 10, las miofibrillas silvestres en regeneración eran 45.1% más grandes en comparación con las fibras musculares deficientes en $\alpha 7$ integrina (Figura 7). En el día 28, el músculo silvestre mostró variación del tamaño de la fibra muscular. Sin embargo esto estuvo en contraste con el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina que continuó mostrando áreas de sección transversal pequeñas, con la gran mayoría de las fibras en el intervalo de 100 - 600 μm^2 . Estos resultados indican que la pérdida de la $\alpha 7$ integrina resulta en la capacidad de regeneración reducida, lo que da lugar a fibras musculares hipotróficas.

La proliferación y la diferenciación de células satélite se reducen en el músculo deficiente en $\alpha 7$ integrina después de la lesión

Para determinar si la proliferación de células satélite disminuyó en los ratones nulos para $\alpha 7$ integrina, se cuantificó la incorporación de BrdU en los núcleos de las células satélite (Figura 8). A los 4 días posteriores a la lesión, el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina contenía 3 veces menos núcleos positivos para BrdU en comparación con los animales silvestres (Figura 8). Sin embargo, los núcleos positivos para BrdU aumentaron en los ratones nulos para $\alpha 7$ integrina en los días 10 y 28 en comparación con los silvestres (Figura 8). Estos resultados muestran que la proliferación de células satélite se retrasa en el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina después de la lesión inducida por cardiotoxina.

Para examinar si el programa de desarrollo que regula la reparación muscular se afectó por la pérdida de la $\alpha 7\beta 1$ integrina, se examinó la expresión de Pax7 y MyoD (Figuras 9 & 10). Pax7 se expresa en células satélite en reposo y activadas, mientras que MyoD se expresa sólo en mioblastos diferenciados. En comparación con el músculo silvestre, los ratones nulos para $\alpha 7$ integrina exhibieron 2 a 3 veces menos células positivas para Pax7 en comparación con los silvestres a los 4 y 10 días posteriores a la lesión por cardiotoxina (Figura 9). En el día 28, se observaron números similares de células positivas para Pax7 en ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina.

El análisis de la expresión de MyoD mostró que el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina contenía 28 y 50 veces menos mioblastos positivos para MyoD en comparación con el músculo silvestre a los 4 y 10 días posteriores al daño inducido por cardiotoxina, respectivamente (Figura 10). En el día 28 se observaron números similares de células positivas para MyoD en ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina.

En conjunto estos resultados indican que la pérdida de la $\alpha 7$ integrina resulta en menos células satélite activadas en el músculo esquelético lesionado y una respuesta retrasada en el programa de desarrollo que regula la diferenciación miogénica.

Tratamiento con laminina de ratones nulos para $\alpha 7$ integrina

El tratamiento con laminina-111 restaura la integridad del sarcolema en ratones nulos para $\alpha 7$ integrina

Estudios recientes han mostrado que la pérdida de la $\alpha 7$ integrina resulta en la expresión de laminina reducida. Para explorar si la deposición de laminina reducida podría explicar el fenotipo de regeneración muscular defectuosa observado en ratones nulos para $\alpha 7$ integrina, el músculo TA se inyectó con laminina-111 tres días antes de la lesión por cardiotoxina.

La laminina-111 se inyectó en el músculo TA de cachorros silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina de 2 semanas de edad y el tejido se analizó por inmunofluorescencia mediante el uso de un anticuerpo anti-laminina $\alpha 1$. El músculo inyectado con PBS solo no contenía laminina-111. En el día 4, la laminina-111 era abundante en la matriz extracelular que rodea las fibras musculares y persistió por más de 28 días. La titulación de laminina-111 en miofibrillas cultivadas reveló el aumento de la toxicidad a concentraciones de 200 nM y más altas (datos no mostrados).

Sorprendentemente, la laminina-111 inyectada penetró rápidamente a todo el músculo TA en 24 - 72 horas (Figura 11 y datos suplementarios) y se mantuvo por todo el músculo por al menos 31 días (Figura 11). En todos los puntos de tiempo después de la lesión por cardiotoxina, el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina tratado con laminina-111 pareció externamente idéntico al músculo silvestre (Figura 12).

El análisis de la captación de EBD después de la lesión inducida por cardiotoxina no reveló diferencia en el porcentaje de miofibrillas positivas para EBD entre el músculo silvestre o el nulo para $\alpha 7$ integrina tratado con laminina en todos los puntos de tiempo (Figura 13). Estos resultados demuestran que la inyección de laminina-111 antes de la lesión inducida por cardiotoxina restauró la integridad del sarcolema en el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina.

Regeneración muscular mediada por laminina en ratones nulos para $\alpha 7$ integrina

Para examinar la capacidad de la laminina-111 de mejorar la regeneración muscular, los músculos TA silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina de 5 semanas de edad se inyectaron con laminina y se sometieron a lesión inducida por cardiotoxina.

Las secciones musculares se tiñeron con H&E y se examinaron para infiltrado de células mononucleares y núcleos centralmente localizados (Figura 14). No se observó diferencia en el tamaño de las miofibrillas, los núcleos centralmente localizados o el infiltrado de células mononucleares en los músculos silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina tratados con laminina-111 a los 4, 10 o 28 días después de la lesión (Figura 14).

La cuantificación de los núcleos centralmente localizados confirmó que el tratamiento con laminina-111 restauró la regeneración muscular a los niveles silvestres (Figura 15). En todos los puntos de tiempo, los porcentajes de núcleos centralmente localizados en ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina tratados con laminina analizados no fueron significativamente diferentes entre sí. Estos resultados indican que la laminina-111 restauró la reparación muscular en el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina a los niveles silvestres.

La capacidad de la laminina-111 de restaurar la capacidad de regeneración del músculo nulo para $\alpha 7$ integrina se examinó mediante el ensayo de expresión de eMyHC (Figura 16). En el día 0, 7.3% de las fibras silvestres y 9.7% de las fibras nulas para $\alpha 7$ integrina eran positivas para eMyHC como resultado de la inyección con laminina (Figura 16). A los 4 y 10 días después del tratamiento con cardiotoxina, los músculos silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina exhibieron niveles similares de expresión de eMyHC (Figura 16). A los 28 días posteriores a la lesión, eMyHC sólo estaba presente en cantidades insignificantes en el músculo silvestre mientras que 34.4% de las miofibrillas en el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina eran positivas para eMyHC (Figura 16). Estos resultados demuestran que la inyección de laminina-111 mejoró en gran medida la capacidad de regeneración del músculo nulo para $\alpha 7$ integrina.

La terapia con laminina restaura el área de la miofibrilla en ratones nulos para $\alpha 7$ integrina

El área de la sección transversal de la miofibrilla se examinó en ratones silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina tratados con laminina antes y después de la lesión inducida por cardiotoxina (Figura 17). A los 4 días posteriores a la lesión, se encontró que el área de la sección transversal de las miofibrillas musculares en ratones silvestres era sólo 13% más grande en comparación con el músculo deficiente en $\alpha 7$ integrina (Figura 17). En los días 10 y 28 posteriores a la lesión por cardiotoxina, el área de la sección transversal de las miofibrillas en el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina fue similar a la de los animales silvestres (Figura 17). En conjunto estos datos indican que el tratamiento con laminina-111 restauró la reparación muscular y el tamaño de las miofibrillas en el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina.

La laminina promueve la proliferación de células satélite en músculo nulo para $\alpha 7$ integrina lesionado

Para examinar si el tratamiento con laminina mejoró la proliferación de células satélite, se midió la incorporación de BrdU después de la lesión muscular (Figura 18). A los 0, 4 y 10 días posteriores a la lesión por cardiotoxina, no se observó ninguna diferencia en el número de células satélite positivas para BrdU en músculo silvestre y nulo para $\alpha 7$ integrina (Figura 18). A los 28 días posteriores a la lesión, hubo significativamente más células satélite positivas para BrdU en músculo $\alpha 7$ integrina nulo en comparación con el silvestre (Figura 18). Estos resultados indican que el tratamiento con laminina restauró la proliferación de células satélite a los niveles silvestres.

El tratamiento con laminina restaura la diferenciación de mioblastos en músculo nulo para $\alpha 7$ integrina

Para examinar si el tratamiento con laminina-111 restaura el programa de reparación miogénica en el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina, se examinó la expresión de Pax7 y MyoD (Figuras 19 & 20). Antes de la lesión por cardiotoxina, los músculos silvestres y $\alpha 7$ integrina nulos exhiben unas pocas células positivas para Pax7, que podrían atribuirse a los daños menores por la inyección de laminina (Figura 19). A los 4 días posteriores a la lesión por cardiotoxina, hubo 20% menos células positivas para Pax7 en músculo nulo para $\alpha 7$ integrina tratado con laminina en comparación con el silvestre (Figura 19). A los 10 y 28 días posteriores a la lesión por cardiotoxina los niveles de células positivas para Pax7 en el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina fueron similares a los del silvestre (Figura 19).

El análisis de MyoD reveló unas pocas células positivas en músculos TA silvestres y nulos para $\alpha 7$ integrina tratados con laminina en el día 0 (Figura 20). En los días 4 y 10 posteriores a la lesión por cardiotoxina, el número de células positivas para MyoD en el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina tratado con laminina fue de aproximadamente 20 a 25% menor que en el silvestre (Figura 20). Sin embargo en el día 28, ambos músculos silvestre y nulo para $\alpha 7$ integrina tenían un número similar de células positivas para MyoD (Figura 20). Estos datos indican que el tratamiento con laminina restauró sustancialmente el número de células miogénicas y promovió la activación del programa miogénico involucrado en la reparación muscular en el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina.

Discusión

Este ejemplo demuestra que los ratones nulos para $\alpha 7$ integrina exhiben regeneración defectuosa del músculo esquelético después de una lesión inducida por cardiotoxina. El tratamiento con laminina corrigió el fenotipo de reparación defectuosa. Aunque algunos aspectos del programa de desarrollo miogénico se han dilucidado durante la regeneración del músculo esquelético, los mecanismos por los cuales la matriz extracelular y los receptores de integrina de la superficie celular participan en la reparación miogénica generalmente no se comprenden bien.

Al daño muscular le sigue la activación rápida de las células satélites. Tras la activación, estas células proliferan y activan programas de desarrollo miogénicos para reparar el músculo dañado. Los modelos sugieren que una subpoblación de células satélites permanece como células madre para reemplazar las células que han progresado por la vía del linaje miogénico. Durante la activación las células satélites expresan los factores de transcripción Pax3, Pax7, MyoD, miogenina y MRF4.

Este ejemplo demuestra que la pérdida de la $\alpha 7$ integrina conduce a la proliferación de células satélites reducida como se determina por la reducción de la incorporación de BrdU y de la expresión de Pax7 en el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina tratado con cardiotoxina. Adicionalmente, la diferenciación de mioblastos se redujo significativamente en músculo deficiente en $\alpha 7$ integrina lesionado como se midió mediante la expresión de MyoD. Estos datos indican que la $\alpha 7\beta 1$ integrina regula una transición temprana clave en la regeneración muscular en la que las células satélites se activan para proliferar y diferenciarse en células miogénicas capaces de reparar el músculo.

Los resultados presentados en este ejemplo demuestran una reducción significativa en la presencia de núcleos centralmente localizados y retraso en la expresión de eMyHC en miofibrillas nulas para $\alpha 7$ integrina lesionadas. La presencia de núcleos centralmente localizados y la expresión de eMyHC sugieren que los mioblastos deficientes en $\alpha 7$ integrina son capaces de fusionarse *in vivo*. Estas observaciones apoyan los estudios *in vitro* que demuestran que los mioblastos primarios nulos para $\alpha 7$ integrina pueden fusionarse para formar miotubos en cultivo celular. En conjunto estas observaciones sugieren que el retraso en la reparación muscular *in vivo* se debe principalmente a los defectos en la proliferación y diferenciación de los mioblastos que conducen a menos células miogénicas capaces de reparar el músculo dañado.

Dado que la capacidad de regeneración del músculo esquelético depende de una compleja interacción entre las células satélites y la matriz extracelular, la ausencia de la $\alpha 7$ integrina puede resultar en la pérdida de un microambiente óptimo rico en laminina requerido para la reparación miogénica. Para determinar si la deposición de laminina disminuida contribuye al fenotipo de regeneración muscular reducida observado en ratones nulos para $\alpha 7$ integrina, se inyectó laminina-111 en el músculo de los ratones antes de la lesión. La laminina se produce normalmente en las células del músculo esquelético y se secreta a la lámina basal circundante. Curiosamente, en 48 - 72 horas la proteína laminina-111 inyectada se dispersó por todo el músculo TA y persistió por más de 31 días en la lámina basal. La inyección del músculo con la proteína laminina-111 antes de la lesión inducida por cardiotoxina restauró la regeneración muscular en ratones nulos para $\alpha 7$ integrina a los niveles silvestres. Estos datos demuestran que la pérdida del microambiente de laminina en el músculo esquelético deficiente en $\alpha 7$ integrina es la causa subyacente del defecto en la reparación muscular observado en estos animales.

Mientras que la laminina-211 y la laminina-221 se expresan en el músculo adulto, la laminina-111 sólo está presente en el músculo esquelético embrionario. Una posible explicación para la regeneración muscular mejorada en el músculo nulo para $\alpha 7$ integrina tratado con laminina es que la inyección de laminina-111 puede recapitular un programa miogénico embrionario en el músculo esquelético adulto. La activación de este programa embrionario puede resultar en la mejora de la activación y proliferación de mioblastos y de la reparación muscular. Sin embargo la inyección de laminina-111 en el músculo esquelético silvestre no aumentó la capacidad de regeneración lo que sugiere que la laminina-111 actuó para reemplazar la laminina-211/221 en el músculo esquelético deficiente en $\alpha 7$ integrina. Estos resultados sugieren que otros receptores de laminina se expresan en células satélites que interactúan normalmente con laminina para promover la reparación miogénica o pueden actuar para compensar la pérdida de $\alpha 7$ integrina en mioblastos.

Este ejemplo sugiere que los sujetos con mutaciones de $\alpha 7$ integrina padecen de miopatía congénita como resultado de la capacidad de regeneración muscular reducida debida a la deposición reducida de laminina-211/221. Estos datos demuestran además que la inyección directa de la proteína laminina-111 purificada puede servir como una terapia potencial para los pacientes con miopatía congénita por deficiencia de $\alpha 7$ integrina. Dado que la pérdida de la capacidad de regeneración se ha implicado en una variedad de distrofias musculares que incluyen MDC1A y DMD, la terapia con proteína laminina-111 puede ser beneficiosa en otras formas de distrofia muscular.

Ejemplo 2

Materiales y Métodos

Animales

En estos estudios se usaron las cepas de ratones C57BL/10ScSn (silvestre) y C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J (*mdx*) (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) de acuerdo con un protocolo animal aprobado por el Comité de Uso y Cuidado Animal de la Universidad de Nevada, Reno.

Aislamiento de mioblastos $\alpha 7\beta gal^{+/-}$

Se retiraron los músculos gastrocnemios de ratones $\alpha 7\beta gal^{+/-}$ de 10 días de edad y el tejido se picó con tijeras. Las células se disociaron enzimáticamente con colágeno de tipo II 1.25 mg/ml (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ) por 1 h a 37 °C. La suspensión acuosa se trituró suavemente y se filtró a través de una malla de nailon. Las células se separaron a partir de fragmentos de fibra muscular mediante centrifugación diferencial y se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 100 mm. Los mioblastos se mantuvieron en medio de proliferación (medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (FBS) 10%, extracto de embrión de pollo 0.5%, L-glutamina 1% y penicilina/estreptomicina 1%).

Tinción de β -galactosidasa

Los mioblastos o miotubos se fijaron en paraformaldehído al 4% por 5 minutos, se lavaron con PBS 1X y se permeabilizaron con una mezcla de desoxicolato sódico/NP40 por 30 minutos. Se añadió X-gal (ferrocianuro potásico 50 mM, ferricianuro potásico 50 mM, $MgCl_2$ 1 M, y X-gal 100 mg/ml) a las placas y se incubó a 37 °C por 2 horas. Las placas se lavaron en PBS. Las imágenes se capturaron con un microscopio de disección y una cámara digital Spot.

Clasificación de Células Activadas por Fluorescencia (FACS)

Se sembraron aproximadamente 1×10^6 mioblastos $\alpha 7\beta gal^{+/-}$ en placas de cultivo celular de 100 mm recubiertas con gelatina 0.1% y se incubaron durante la noche a 37 °C. El medio de crecimiento se retiró y las células se trataron por 16 - 24 horas con LAM-111 100 nM en PBS. Las células se tripsinizaron, se contaron, se sedimentaron y se añadieron 30 μ l de medio de crecimiento DMEM que contiene FBS 20%. Se añadieron 30 μ l de FDG 200 nM (Molecular Probes, Eugene, OR) a las células y se incubaron a 37 °C por 1 minuto. Para detener la reacción se añadieron 600 μ l de medio de crecimiento helado a cada muestra y se incubaron en hielo por 20 minutos. Las muestras se procesaron en el citómetro de flujo Beckman Coulter XL/MCI y se analizaron mediante el uso del programa informático FlowJo.

Inyecciones de laminina-111

Se inyectó laminina de ratón natural (Invitrogen) a 100 nM en PBS en el músculo tibialis anterior (TA) izquierdo de ratones *mdx* de 10 días. El músculo TA derecho contralateral se inyectó con PBS y sirvió como control. Los ratones se sacrificaron y el músculo se cosechó a las 5 semanas de edad. Para la administración sistémica se inyectó 1 mg/kg de laminina-111 en PBS de forma intraperitoneal a los 10 días y los tejidos se cosecharon para el análisis a las 5 semanas de edad. Los ratones *mdx* controles se inyectaron con el mismo volumen de PBS.

Captación de colorante azul de Evan

Los ratones se inyectaron de forma intraperitoneal con 50 μ l por 10 g de peso corporal con una solución de colorante azul de Evan estéril (10 mg/ml). Después de 3 horas, el músculo TA se cosechó y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido. Se colocaron criosecciones de 10 μ m sobre portaobjetos de microscopio y se fijaron en paraformaldehído al 4%. Para esbozar las fibras musculares, las secciones de tejido se incubaron con aglutinina de germen de trigo (WGA) conjugada con Oregon Green-488 a 2 μ g/ml (Molecular Probes, Eugene, OR). Se contó un mínimo de 1000 fibras por animal para determinar el porcentaje de fibras musculares positivas para la captación de colorante azul de Evan. Al menos se analizaron cinco animales de cada genotipo. Las imágenes se capturaron y se contó a un aumento de 630X.

Química sanguínea

La sangre se recogió a las 5 semanas de edad y se permitió coagular a temperatura ambiente por un mínimo de 30 minutos. Después de la centrifugación a 3000 rpm, se recogió el suero. El suero se envió al Laboratorio de patología comparativa de la Universidad de California, Davis para ensayar la creatina quinasa, creatina y nitrógeno de urea en sangre (BUN).

Inmunofluorescencia

Los tejidos se embebieron en el compuesto Temperatura Óptima de Corte de Tissue-TEK (Sakura Finetek Estados Unidos Inc., Torrance, CA). Mediante el uso de un criostato Leica CM1850 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), se colocaron secciones de 10 micras sobre portaobjetos de microscopio Surgipath (Surgipath Medical Industries, Richmond, IL). La $\alpha 7$ integrina se detectó con una dilución 1:1000 de anticuerpo monoclonal de rata anti-CA5.5 (Sierra Biosource, Morgan Hill, CA) seguida de una dilución 1:1000 de un anticuerpo secundario anti-rata conjugado con FITC. La $\beta 1D$ integrina se detectó con una dilución 1:500 de anticuerpo policlonal de conejo seguida de una dilución 1:500 de anticuerpo anti-conejo conjugado con FITC. La laminina $\alpha 1$ se detectó con una dilución 1:500 de MAB 1903 (Chemicon International, Temecula, CA). La distrofina se detectó con el anticuerpo monoclonal de ratón Dys2 (Novacastra Laboratories, Ltd, Newcastle upon Tyne, Reino Unido) y la utrofina se detectó con el anticuerpo monoclonal 7F3 MANCH07 contra la utrofina (Glenn Morris, Centro de Enfermedades Neuromusculares Hereditarias, Shropshire, Reino Unido) a una dilución de 1:200. Los anticuerpos monoclonales de ratón se usaron junto con un kit de inmunodetección ratón-en-ratón (MOM) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) para bloquear la inmunoglobulina de ratón y una dilución 1:500 de anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC. Los receptores de acetilcolina se detectaron con α -

bungarotoxina marcada con rodamina a 1:1000 (Molecular Probes, Eugene, OR). La fluorescencia se observó con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop 2 Plus y las imágenes se capturaron con una cámara digital Zeiss AxioCam HRc y el programa informático Axiovision 4.1 (todos disponibles de Carl Zeiss MicroImaging, Thornwood, NY).

5 Histología

Las secciones de tejido se fijaron en etanol helado al 95% por 2 minutos seguido de etanol al 70% por 2 minutos y después se rehidrataron en agua corriente por 5 minutos. Las secciones se tiñeron con hematoxilina de Gill (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) y se enjuagaron en agua por 5 minutos. Las secciones se colocaron en solución de Scott (NaHCO₃ 0.024 M, MgSO₄ 0.17 M) por 3 minutos y se enjuagaron en agua por 5 minutos. Después las secciones se tiñeron con eosina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) por 2 minutos. Las secciones se deshidrataron progresivamente en etanol helado al 70% y al 95% por 30 segundos cada uno, seguido de etanol al 100% por 2 minutos y se aclararon en xileno por 5 minutos antes de montarlas con medio de montaje DePeX (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA). Los mionúcleos centrales en los músculos en regeneración se contaron a un aumento de 630X mediante microscopía de campo claro. El número de núcleos centrales por fibra muscular se determinó mediante el conteo de un mínimo de 1000 fibras musculares por animal. Al menos se analizaron cinco animales de cada genotipo.

Inmunoelctrotransferencia

20 Para analizar la $\alpha 7$ integrina, la proteína se extrajo mediante el uso de octil- β -D-glucopiranosido 200 mM (Sigma Aldrich, St Louis, MO), Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, PMSF 2 mM y una dilución 1:200 del cóctel inhibidor de proteasa Conjunto III (Calbiochem, EMD Biosciences, San Diego, CA). El lisado se recogió y se centrifugó por 15 minutos a 10,000 x g, y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. La proteína se cuantificó mediante el ensayo de Bradford y se separaron 40 μ g de proteína total en geles de SDS-PAGE al 7.5% bajo condiciones no reducidas, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon en tampón de bloqueo Odyssey (LiCor Biosciences, Lincoln, NE) que se diluyó 1:1 en solución salina tamponada con fosfato (PBS). La $\alpha 7$ integrina se detectó con una dilución 1:500 de anticuerpo policlonal de conejo anti- $\alpha 7$ B (B2 347). Las transferencias se incubaron con una dilución 1:5000 de IgG de cabra anti-conejo acoplada a Alexa Fluor 680 (Molecular Probes, Eugene, OR) para detectar el anticuerpo primario.

30 Para examinar la expresión de utrofina, la proteína se extrajo del músculo tibialis anterior *mdx* y silvestre inyectado con PBS y LAM-111 con tampón RIPA (Hepes 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 10 mM, Tritón X-100 0.5%, NP40 0.5%, glicerol 10%, PMSF 2 mM y una dilución 1:200 de cóctel inhibidor de proteasa Conjunto III) y se cuantificó mediante ensayo de Bradford (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA). Se separaron 80 μ g de proteína total en un gel de SDS-PAGE al 7.5% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se incubó con una dilución 1:200 de anticuerpo monoclonal de ratón anti-utrofina (MANCHO3 8A4, un amable regalo de Glenn Morris, Centro de Enfermedades Neuromusculares Hereditarias, Shropshire, Reino Unido) seguida de una dilución 1:50,000 de anticuerpo secundario de cabra anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). La banda de utrofina de 395 kDa se detectó mediante quimiluminiscencia y se normalizó para la carga de proteína mediante el sondeo de la misma transferencia con anticuerpo anti-Cox-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Las intensidades de las bandas se cuantificaron mediante el uso del programa informático ImageQuant TL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Análisis Estadístico

45 Todos los datos promediados se reportan como la media $\pm$ la desviación estándar. Las comparaciones entre los múltiples grupos se realizaron mediante análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) para los datos paramétricos o análisis unidireccional de la varianza o de rangos de Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos mediante el uso del programa informático SigmaStat 1.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA). $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

50 Discusión

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad neuromuscular devastadora causada por mutaciones en el gen que codifica la distrofina. La $\alpha 7\beta 1$ integrina y la utrofina son proteínas de unión a laminina reguladas positivamente en el músculo de pacientes con DMD y en el modelo de ratón *mdx*. La sobreexpresión transgénica de utrofina o $\alpha 7$ integrina en ratones distróficos alivia la enfermedad muscular al hacer a estos genes objetivos para la intervención farmacológica. Para determinar si la laminina regula la expresión de la $\alpha 7$ integrina, mioblastos cultivados de ratón y humanos se trataron con laminina y se ensayaron para la expresión de la $\alpha 7$ integrina. Este ejemplo demuestra que la laminina-111, una forma de laminina altamente expresada durante el desarrollo embrionario, aumentó la expresión de $\alpha 7$ integrina en mioblastos cultivados a partir de ratones y pacientes con DMD. La inyección intramuscular de laminina-111 en ratones *mdx* aumentó la expresión de $\beta 7$ integrina y de utrofina, estabilizó el sarcolema y previno la patología muscular. La terapia sistémica con proteína laminina-111 restauró los niveles de creatina quinasa en suero en ratones *mdx* al intervalo normal. Estos hallazgos demuestran que la laminina-111 es una terapéutica proteica altamente potente y novedosa para el modelo de ratón de DMD y representa un paradigma

novedoso para la administración sistémica de proteínas de la matriz extracelular como una terapia para las enfermedades genéticas.

- 5 La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es la enfermedad ligada al cromosoma X más común que afecta a 1 de cada 3,500 nacimientos de machos. Los pacientes con DMD exhiben atrofia muscular severa y progresiva con síntomas que se detectan primero a los 2 a 5 años de edad. A medida que la enfermedad progresa, los pacientes se confinan a sillas de ruedas, requieren asistencia con ventilador y mueren en su segunda o tercera década de vida. Hasta la fecha no existe un tratamiento eficaz o una cura para esta enfermedad neuromuscular devastadora.
- 10 Los pacientes con DMD y los ratones *mdx* (el modelo de ratón para DMD) tienen mutaciones en el gen que codifica la distrofina, lo que resulta en una pérdida de la proteína distrofina. La distrofina es una proteína de 427 kDa localizada en la membrana citoplasmática interna de las fibras musculares. A través de sus repeticiones del dominio de varilla N-terminal, la distrofina interactúa con la F-actina del citoesqueleto de la célula. La región C-terminal de la distrofina interactúa con un complejo transmembrana compuesto de α y β -dystroglicanos, dystrobrevinas, α y β -sintrofina y
- 15 sarcoglicanos. El complejo de glicoproteína con distrofina proporciona un enlace transmembrana entre el citoesqueleto de la célula y la laminina en la matriz extracelular del músculo. La pérdida de distrofina resulta en una falta en la formación de este crítico complejo de unión a laminina, lo que conduce al daño y a la debilidad muscular progresivos.
- 20 En ausencia de distrofina, dos complejos de unión a laminina-adicionales, los complejos de glicoproteína con $\alpha 7 \beta 1$ integrina y con utrofina, están regulados positivamente en el músculo esquelético de pacientes con DMD y ratones *mdx*. La mejora transgénica de utrofina o $\alpha 7$ integrina en el músculo esquelético alivia la enfermedad muscular en ratones distrofos. Por otro lado, la pérdida de utrofina o $\alpha 7$ integrina en ratones *mdx* resulta en fenotipos más severos y viabilidad reducida. En conjunto estos resultados indican que la utrofina y la $\alpha 7 \beta 1$ integrina son modificadores genéticos de la progresión de la enfermedad y objetivos para las terapias a base de fármacos que refuerzan su expresión.
- 25 Se desarrolló un ensayo a base de células musculares, por si moléculas particulares aumentan la expresión de la $\alpha 7$ integrina. Se produjo un ratón nulo para $\alpha 7$ integrina en el que el exón 1 del gen que codifica la $\alpha 7$ integrina se reemplazó por el gen reportero LacZ. En estos ratones, se retienen todos los elementos reguladores de la transcripción lo que permite que la actividad del promotor de la $\alpha 7$ integrina sea reportada por la β -galactosidasa. Los mioblastos primarios (designados $\alpha 7 \beta gal^{+/}$) se aislaron a partir de cachorros $\alpha 7^{+/}$ de 10 días de edad. Los mioblastos $7 \beta gal^{+/}$ expresaron β -galactosidasa que aumentó tras la diferenciación (Figuras 21 y 22), consistente con el patrón de expresión de $\alpha 7$ integrina en mioblastos y miotubos. La actividad del promotor de la $\alpha 7$ integrina se midió mediante el clivaje por la β -galactosidasa del compuesto no fluorescente fluoresceína di- β -D-galactopiranosido (FDG) a fluoresceína.
- 30 Varias líneas de evidencia sugieren retroalimentación positiva en la regulación de la expresión de laminina y $\alpha 7$ integrina. Las mutaciones en el gen que codifica la laminina $\alpha 2$ resulta en la distrofia muscular congénita tipo 1A (MDC1A). Los pacientes MDC 1A y los ratones deficientes en laminina $\alpha 2$ tienen niveles de $\alpha 7$ integrina dramáticamente reducidos los que pueden contribuir a la patología muscular severa. Adicionalmente, la laminina $\alpha 2$ está disminuida en el músculo esquelético nulo para $\alpha 7$ integrina. Para determinar la relación entre la expresión de laminina y $\alpha 7$ integrina, se expusieron mioblastos $\alpha 7 \beta gal^{+/}$ a varias concentraciones de laminina-111 desde 0 - 200 nM por 24 horas. Los estudios sugieren que la laminina-111 es funcionalmente similar a la laminina-211 e interactúa con la $\alpha 7 \beta 1$ integrina. El análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) reveló la máxima actividad del promotor de $\alpha 7$ integrina a 100 nM de laminina-111 (Figura 23).
- 35 Se cuantificó la proteína $\alpha 7$ integrina en mioblastos de ratón C2C12 y mioblastos primarios de DMD tratados con laminina-111. Los extractos proteicos de mioblastos tratados con laminina se sometieron a análisis Western para detectar la integrina $\alpha 7 B$. La laminina-111 produjo un aumento de 2 veces en $\alpha 7 B$ integrina en mioblastos de C2C12 y DMD (Figuras 24 y 25). Estos datos indican que la laminina-111 aumenta la expresión de $\alpha 7$ integrina en las células musculares humanas y de ratón.
- 40 Se cuantificó la proteína $\alpha 7$ integrina en mioblastos de ratón C2C12 y mioblastos primarios de DMD tratados con laminina-111. Los extractos proteicos de mioblastos tratados con laminina se sometieron a análisis Western para detectar la integrina $\alpha 7 B$. La laminina-111 produjo un aumento de 2 veces en $\alpha 7 B$ integrina en mioblastos de C2C12 y DMD (Figuras 24 y 25). Estos datos indican que la laminina-111 aumenta la expresión de $\alpha 7$ integrina en las células musculares humanas y de ratón.
- 45 Después se determinó si los resultados *in vitro* anteriores con laminina-111 se podían traducir *in vivo* para aumentar la expresión de $\alpha 7$ integrina en el músculo esquelético. Los músculos tibialis anteriores (TA) izquierdos de ratones *mdx* de 10 días de edad se inyectaron con 100 μ l de laminina-111 100 nM, mientras que el músculo TA derecho se inyectó con 100 μ l de PBS y sirvió como control contralateral. A las 5 semanas de edad los ratones se sacrificaron y los músculos TA se cosecharon. La laminina-111 no se expresa normalmente en el músculo adulto y la proteína inyectada se detectó con un anticuerpo anti-laminina $\alpha 1$. La inmunofluorescencia reveló que la proteína laminina-111 inyectada se depositó por toda la lámina basal del músculo TA de ratones *mdx* de 5 semanas de edad (Figura 26). Las imágenes confirman además que la distrofina estaba presente en el músculo silvestre, pero ausente en ambos músculos *mdx* tratados con PBS y laminina-111.
- 50 Para determinar si la laminina-111 previno la patología muscular en ratones *mdx*, se realizó la captación del colorante azul de Evan (EBD) y la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) en criosecciones de músculos TA inyectados con PBS y laminina-111 (Figura 27). El análisis reveló que los músculos *mdx* inyectados con laminina-111 tenían una reducción de 12 veces en el porcentaje de fibras positivas para EBD en comparación con los controles contralaterales (Figura 28, *P < 0.05, **P < 0.001, n = 5 ratones/grupo). Adicionalmente, los músculos *mdx* inyectados con laminina-111 mostraron
- 55
- 60
- 65

una disminución de 4 veces en el porcentaje de fibras musculares con núcleos centralmente localizados (Figura 28, *P < 0.05, **P < 0.001, n = 5 ratones/grupo). Estos resultados indican que la terapia con la proteína laminina-111 aumentó dramáticamente la integridad del sarcolema y redujo la necesidad de reparación muscular.

- 5 Para determinar el mecanismo por el cual la terapia con la proteína laminina-111 protegió al músculo deficiente en distrofina del daño, se hicieron análisis de inmunofluorescencia de utrofina y $\alpha 7$ integrina. Los resultados revelaron un aumento de la expresión y la localización fuera de la unión de la $\alpha 7$ integrina y la utrofina en los músculos de ratones *mdx* tratados con laminina-111 en comparación con los controles (Figura 29).
- 10 Para confirmar y cuantificar estas observaciones, los músculos *mdx* tratados con PBS y laminina-111 se sometieron a análisis Western (Figura 30). Se observó un aumento de 1.6 y 2.6 veces en las isoformas de integrina $\alpha 7A$ y $\alpha 7B$ respectivamente en los músculos *mdx* tratados con laminina-111 en comparación con los controles (Figura 31, *P = < 0.05, **P = < 0.001, n = 5 ratones/grupo). La carga de proteína se normalizó a la ciclooxigenasa-1 (cox-1). Adicionalmente, se observó un aumento de 1.3 veces en la utrofina en los músculos tratados con laminina-111 (Figura 31, *P = < 0.05, **P = < 0.001, n = 5 ratones/grupo). No se observaron cambios significativos en los niveles de $\beta 1D$ integrina, consistente con los resultados reportados en los ratones $\alpha 7$ integrina transgénicos. Estos resultados indican que la laminina-111 aumentó la expresión de $\alpha 7$ integrina y utrofina, dos proteínas conocidas por aliviar la patología muscular cuando se sobreexpresan transgénicamente en el músculo distrófico.
- 15
- 20 Los pacientes con DMD padecen de atrofia muscular generalizada. Por lo tanto una terapia eficaz debe dirigirse a todos los músculos, que incluyen el corazón y el diafragma. Después se determinó si la proteína laminina-111 podría administrarse sistémicamente a estos músculos. Se inyectaron cachorros *mdx* de diez días de edad de forma intraperitoneal con una dosis de laminina-111 a 1 mg/kg y los tejidos se analizaron a las 5 semanas de edad. El análisis de inmunofluorescencia reveló la presencia de laminina $\alpha 1$ por toda la lámina basal de los músculos del diafragma y gastrocnemio de ratones inyectados con laminina-111, mientras que los controles fueron negativos (Figuras 32 y 33). El análisis del músculo cardíaco mostró laminina-111 que rodea a los cardiomiocitos (Figura 32).
- 25
- 30 Para determinar si la administración sistémica de laminina-111 es terapéutica, se recogió suero a las 3 semanas después de las inyecciones de laminina-111 y se midieron los niveles de creatina quinasa. La creatina quinasa en suero está altamente elevada en los pacientes con DMD debido al daño muscular, y los niveles de creatina quinasa se usan para propósitos de diagnóstico y pronóstico. Este ejemplo demuestra que la terapia con laminina-111 resultó en una reducción de 2.6 veces en los niveles de creatina quinasa en suero en comparación con el control de PBS (Figura 34, *P < 0.05, n = 5 ratones/grupo). Estos niveles no fueron estadísticamente diferentes de los niveles de creatina quinasa en ratones silvestres. Estos resultados demuestran que la proteína laminina-111 puede administrarse sistémicamente a los sistemas musculares importantes en los ratones *mdx* para prevenir la patología distrófica.
- 35
- 40 Dado que la proteína laminina-111 es relativamente grande y podría afectar de manera adversa a la función renal, se midieron la creatina en suero y el nitrógeno de urea en sangre (BUN). El análisis reveló que la creatina y el BUN no fueron estadísticamente diferentes entre los ratones *mdx* tratados con laminina-111 y los controles (Figura 34, *P < 0.05, n = 5 ratones/grupo). Estos datos indican que la terapia con la proteína laminina-111 no tuvo efectos adversos sobre la función renal.
- 45 Este ejemplo demuestra por primera vez que una dosis sistémica individual de la proteína laminina-111 previene la aparición de la enfermedad muscular por al menos tres semanas en ratones destinados genéticamente para desarrollar distrofia muscular. En conjunto estos hallazgos demuestran que la laminina-111 puede ser una terapéutica proteica novedosa, altamente potente para la distrofia muscular de Duchenne. Adicionalmente, la terapia con la proteína laminina-111 puede ser eficaz en el tratamiento de otras enfermedades musculares que incluyen la distrofia muscular congénita tipo 1A, la distrofia muscular de Limb-Girdle y la miopatía congénita por deficiencia de $\alpha 7$ integrina. La eficacia de las inyecciones de la proteína laminina-111 en ratones distróficos representa un paradigma novedoso que demuestra que la administración sistémica de proteínas de la matriz extracelular podría explorarse como una terapia para las enfermedades genéticas.
- 50

REIVINDICACIONES

1. Una cantidad terapéuticamente eficaz de laminina-1 para su uso en la mejora de la regeneración muscular o la reparación en un sujeto, o para su uso en la prevención o la reducción del daño muscular en un sujeto, en donde la laminina-1 debe administrarse sistémicamente y en donde dicha regeneración muscular es después de un daño, lesión o enfermedad.
2. La laminina-1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene distrofia muscular.
3. La laminina-1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene miopatía congénita por deficiencia de $\alpha 7$ integrina.
4. La laminina-1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene distrofia muscular de Duchenne (DMD).
5. La laminina-1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene distrofia muscular congénita tipo 1A.
6. La laminina-1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene distrofia muscular de Limb-Girdle.
7. La laminina-1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la laminina-1 se prepara para la administración con un agente terapéutico adicional, en donde el agente terapéutico adicional se selecciona de una proteína costamérica, células satélites, células madre derivadas adiposas, y miocitos.
8. La laminina-1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la laminina-1 se prepara para la administración al sujeto antes de que el paciente experimente la enfermedad o daño muscular.
9. Una cantidad terapéuticamente eficaz de laminina-1 para usar para promover la cicatrización de heridas en un sujeto, en donde la laminina-1 se administra sistémicamente.
10. La laminina-1 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la laminina-1 se prepara para la administración en una cantidad de 0.01 $\mu\text{g/kg}$ a 1000 mg/kg del peso del sujeto, preferentemente en una cantidad de 0.1 mg/kg a 1000 mg/kg del peso del sujeto o en una cantidad de 0.2 mg/kg a 2 mg/kg del peso del sujeto.

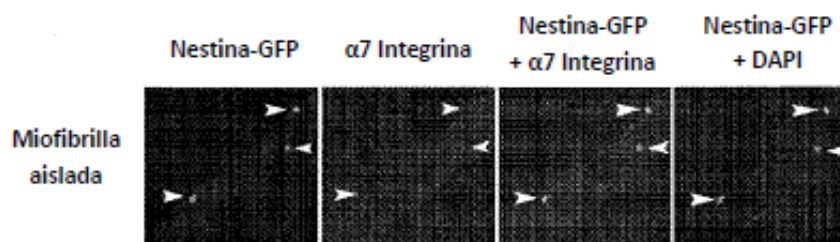


FIG. 1

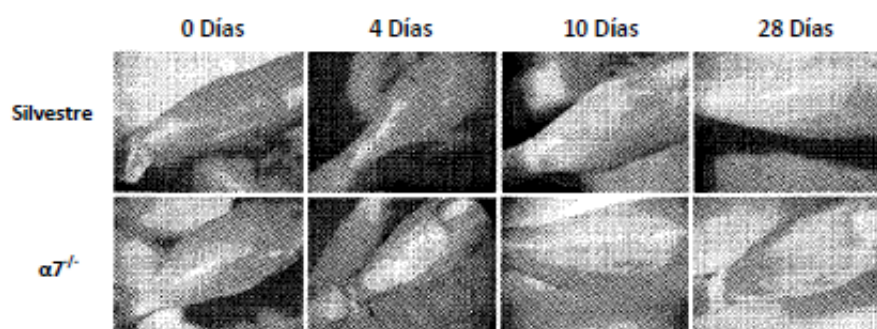


FIG. 2

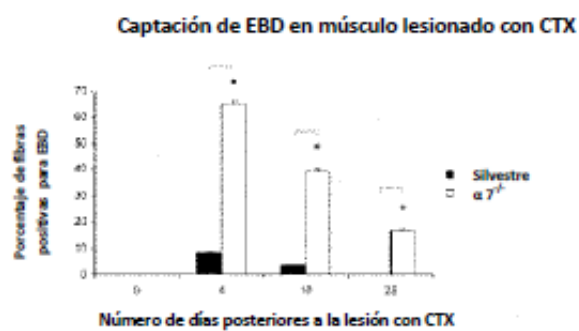


FIG. 3

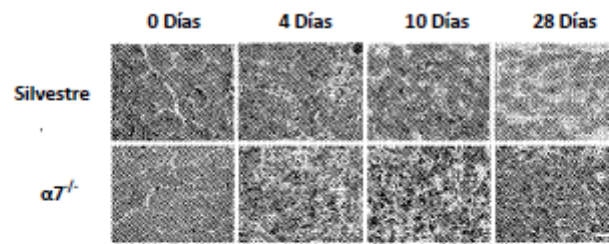


FIG. 4



FIG. 5

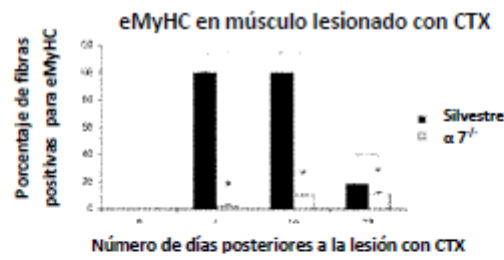


FIG. 6

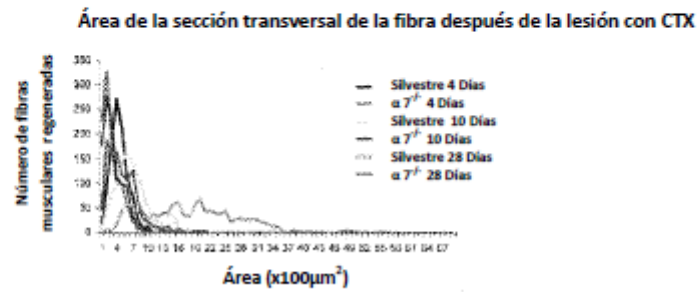


FIG. 7

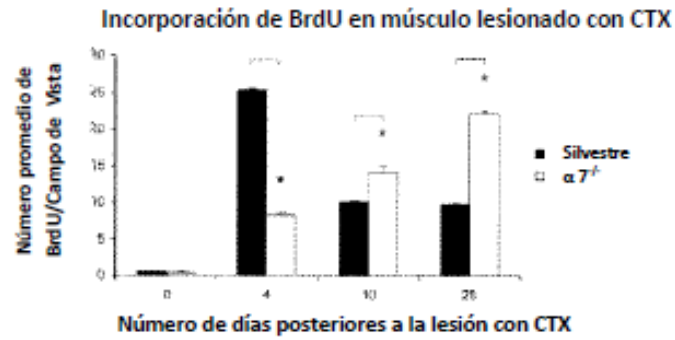


FIG. 8

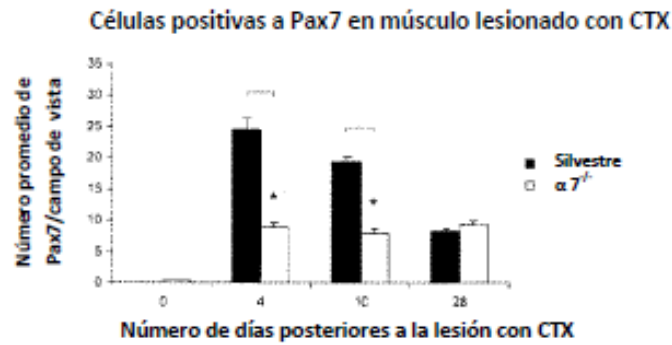


FIG. 9

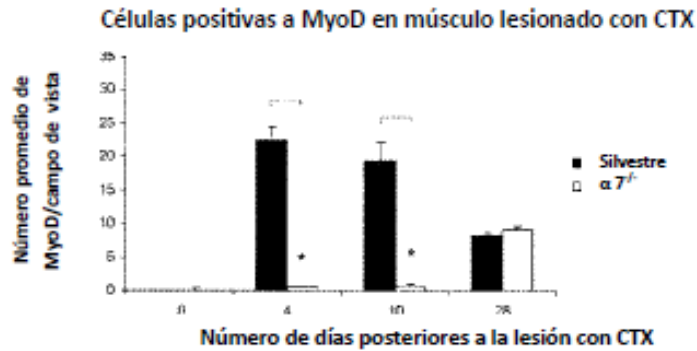


FIG. 10

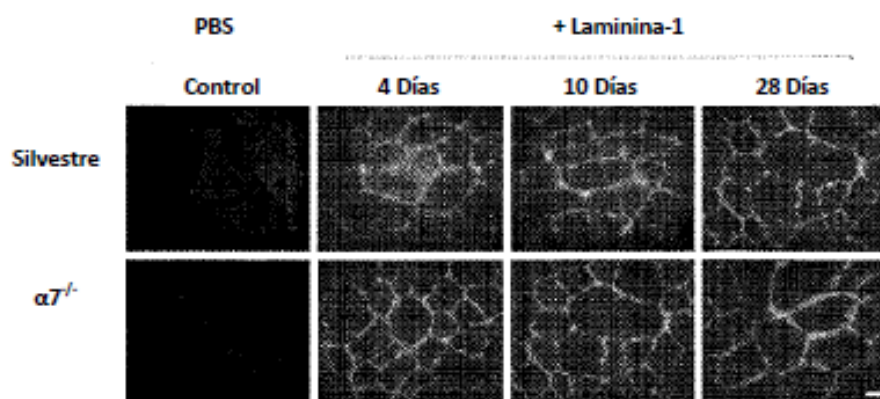


FIG. 11

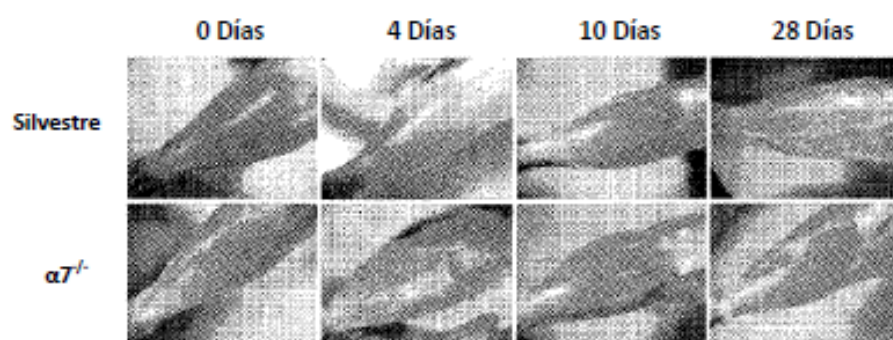


FIG. 12

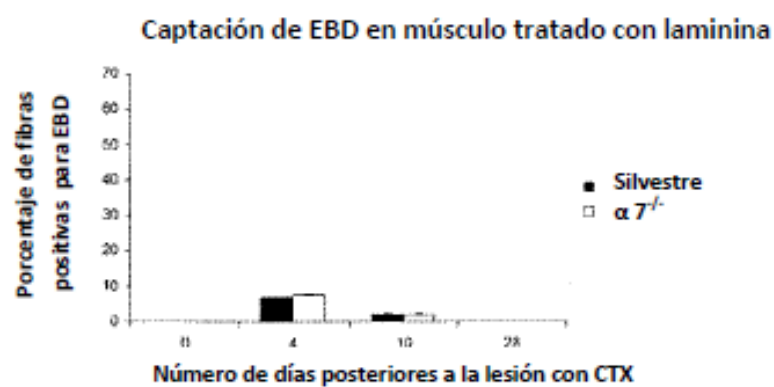


FIG. 13

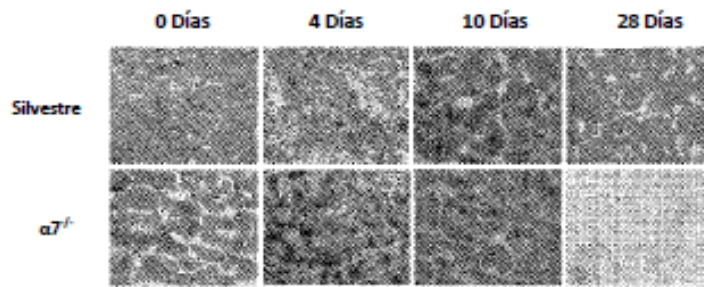


FIG. 14

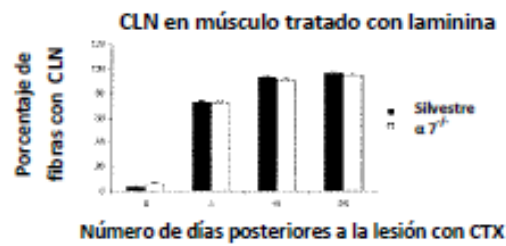


FIG. 15

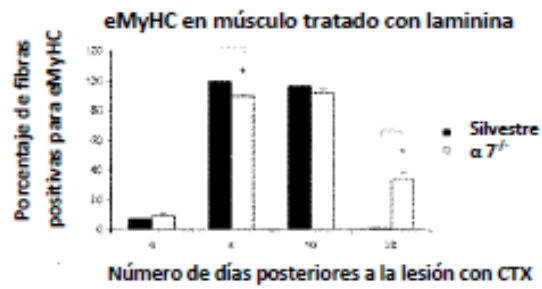


FIG. 16

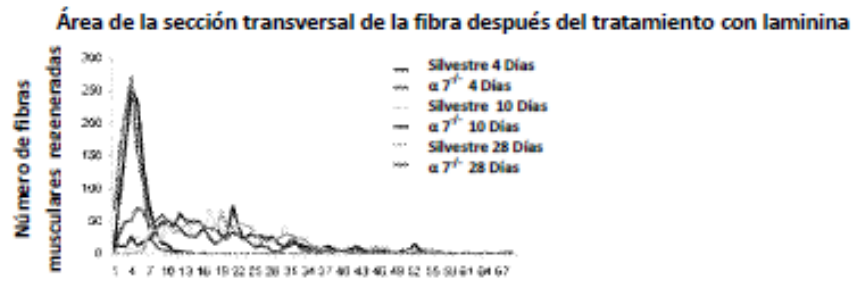


FIG. 17

Incorporación de BrdU en músculo tratado con laminina

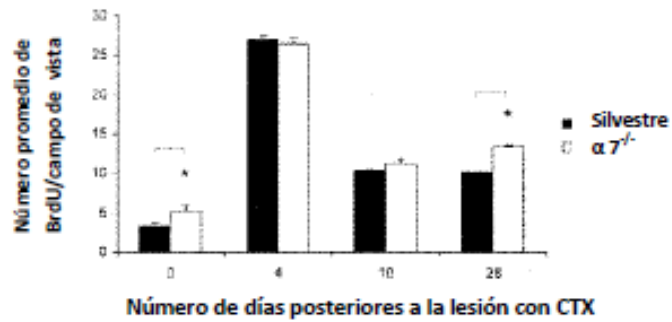


FIG. 18

Células positivas a Pax7 en músculo tratado con laminina

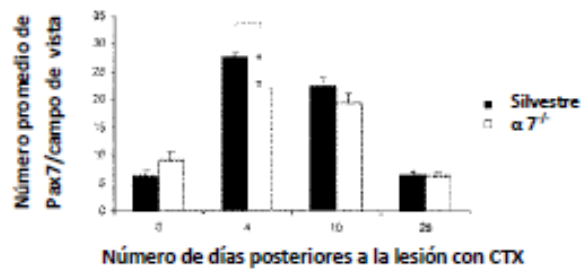


FIG. 19

Células positivas a MyoD en músculo tratado con laminina

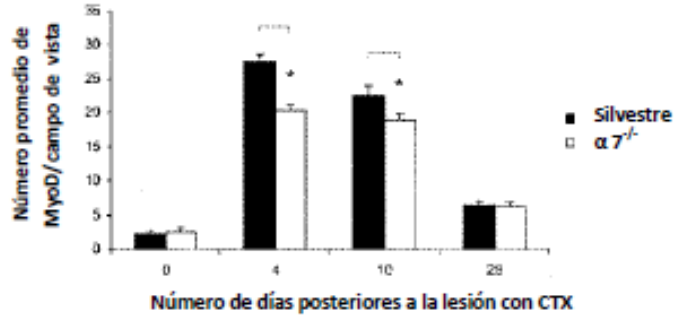


FIG. 20

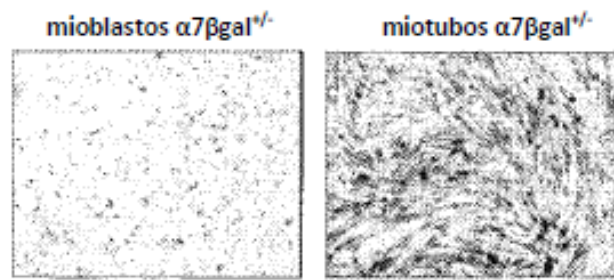


FIG. 21

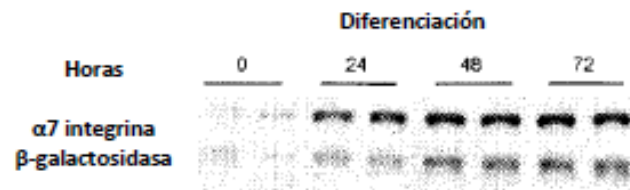


FIG. 22

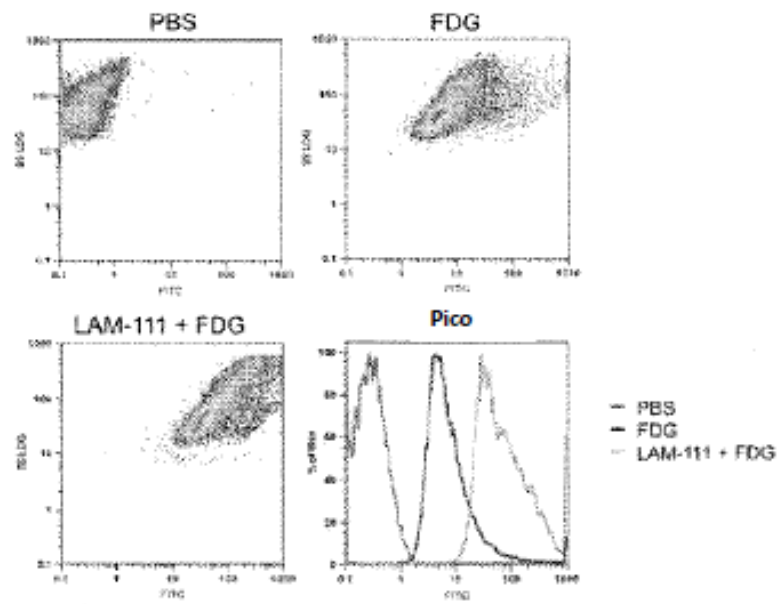


FIG. 23

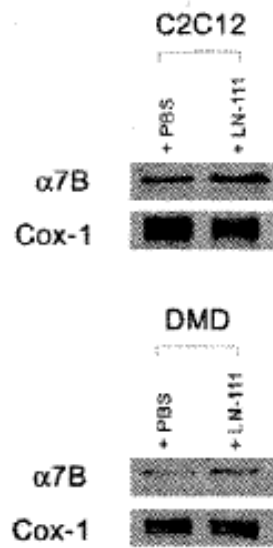


FIG. 24

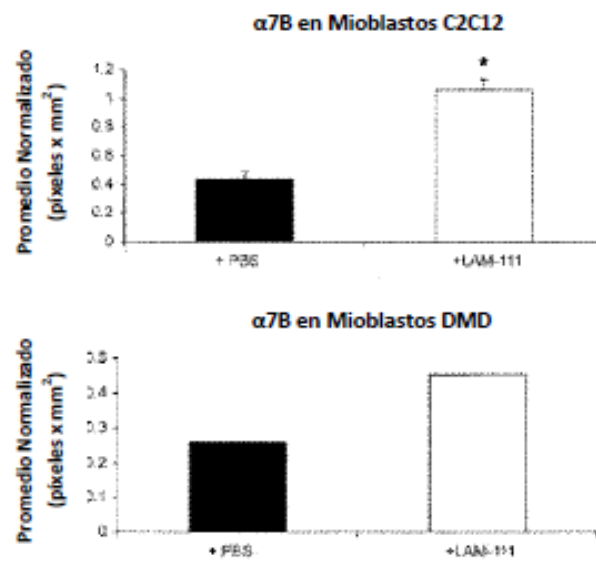


FIG. 25

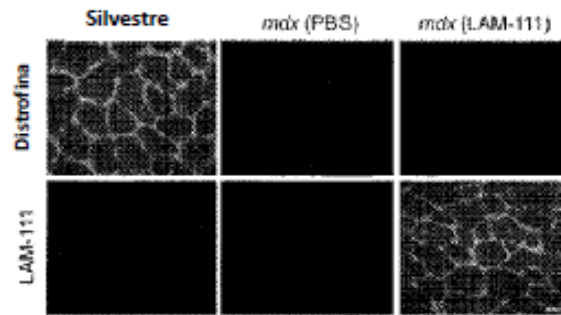


FIG. 26

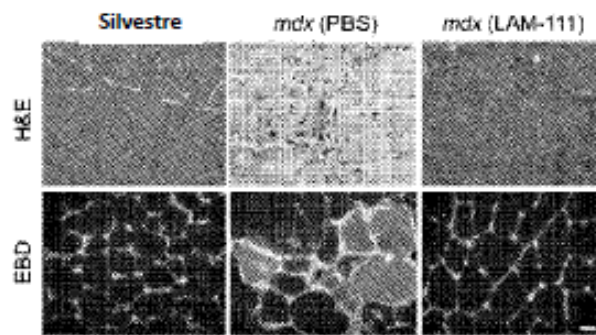


FIG. 27

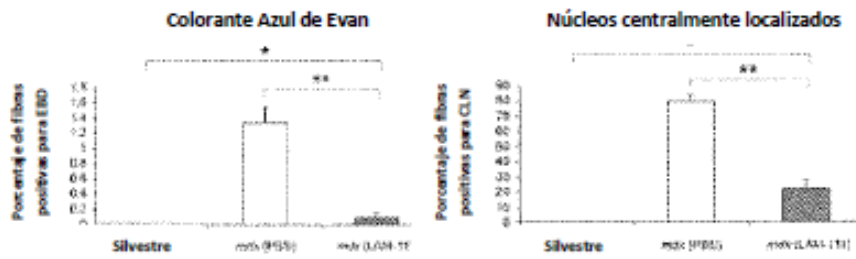


FIG. 28

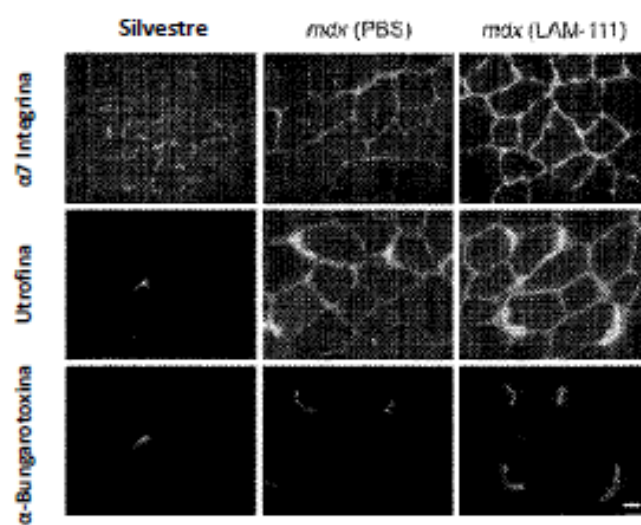


FIG. 29

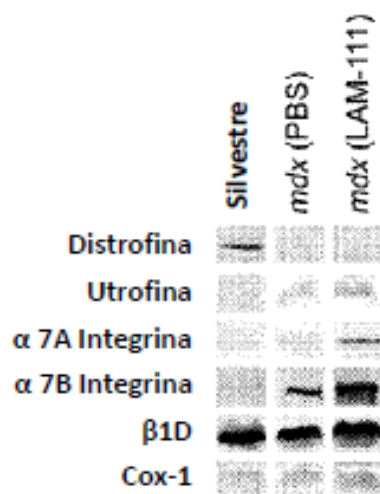


FIG. 30

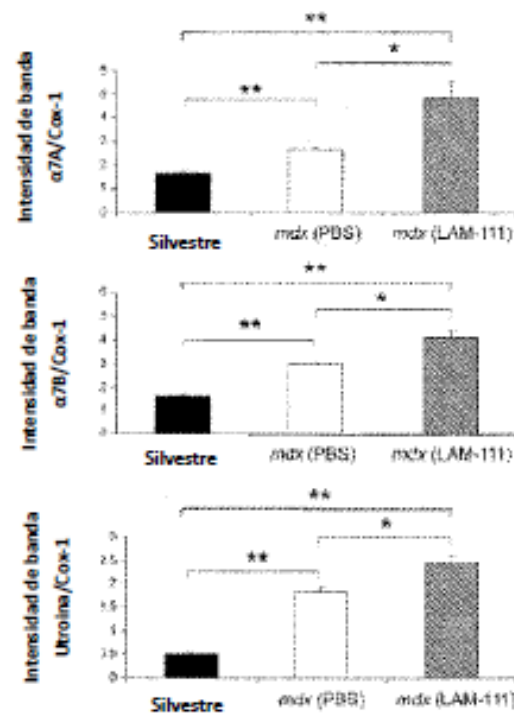


FIG. 31

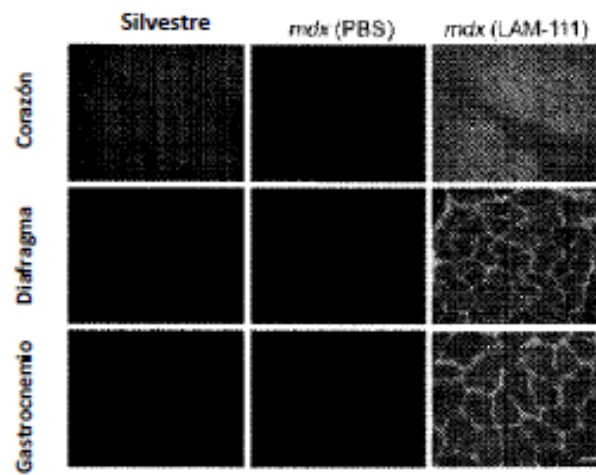


FIG. 32

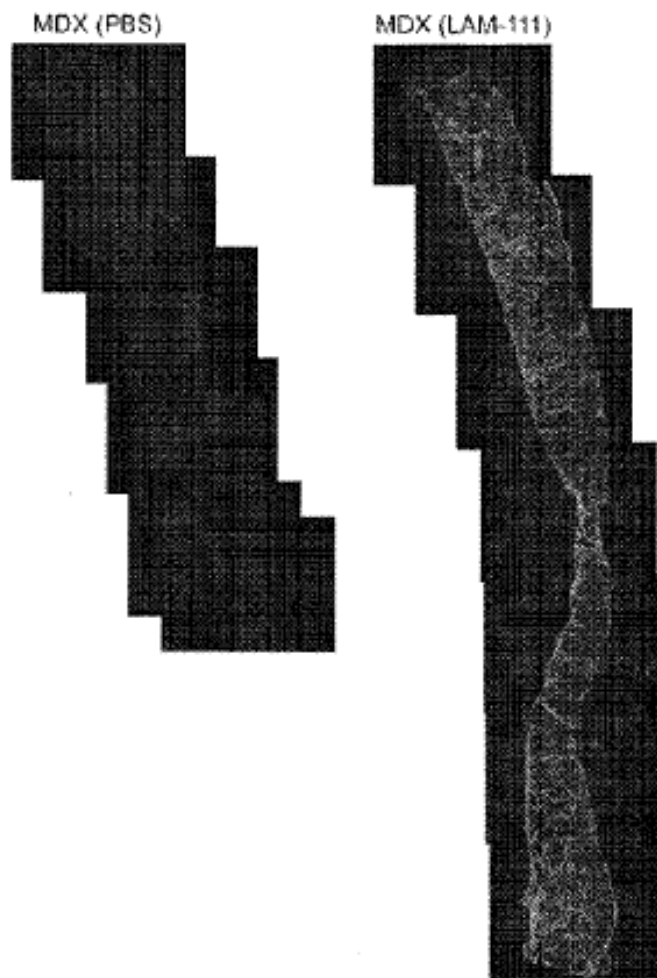


FIG. 33

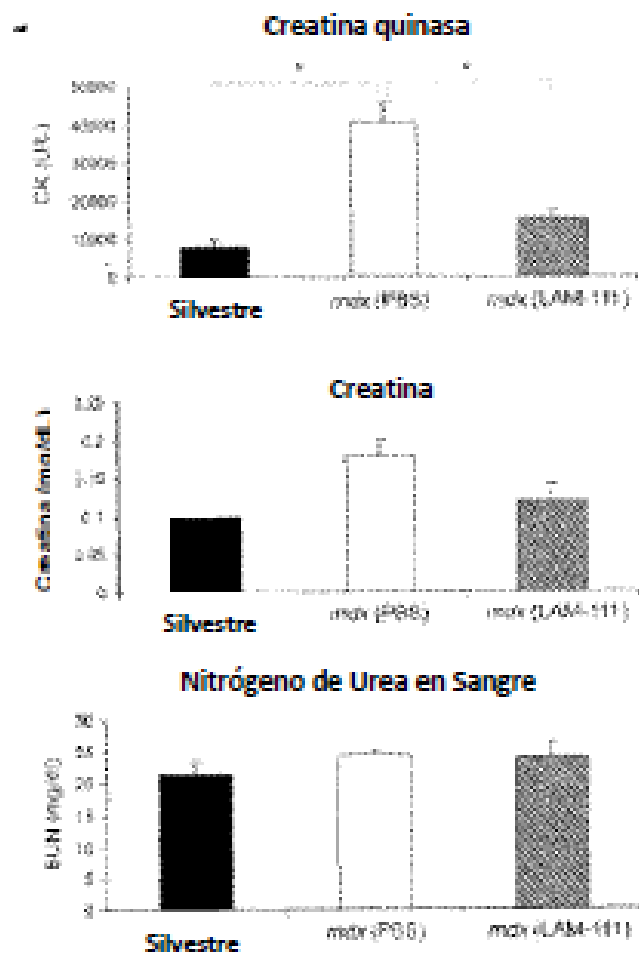


FIG. 34