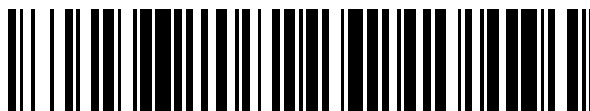


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 453**

51 Int. Cl.:

A61P 21/00 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2009** **E 09844652 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015** **EP 2431047**

54 Título: **Uso de G-CSF en el tratamiento de lesiones musculares**

30 Prioridad:

14.05.2009 JP 2009117795

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

31.08.2015

73 Titular/es:

FUKUDA, KEIICHI (100.0%)
3-2, Sakae-cho Nerima-Ku
Tokyo 176-0006, JP

72 Inventor/es:

YUASA, SHINSUKE;
HARA, MIE y
FUKUDA, KEIICHI

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 544 453 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

Uso de G-CSF en el tratamiento de lesiones musculares

5 Campo técnico

La presente divulgación se refiere a potenciadores de la reparación muscular. Los potenciadores de la reparación muscular contienen un factor estimulante de colonias granulocitos (G-CSF) como un principio activo.

10 Antecedentes de la técnica

El músculo esquelético adulto tiene sus propias células madre, denominadas células satélite, que son responsables de la generación de nuevo músculo en el estado patológico y fisiológico. Estos músculos tienen la posibilidad de regenerarse, pero su poder no es infinito (Documento no de patente 1). Hay muchas enfermedades incurables del músculo esquelético como la distrofia muscular esquelética, la miopatía, las lesiones graves y el síndrome del desuso (Documento no de patente 2). Por lo tanto, debe ser sumamente útil dilucidar el mecanismo de regeneración del músculo esquelético y usarlo para desarrollar una nueva terapia de regeneración. El desarrollo y la regeneración del músculo esquelético se regulan de manera exacta mediante una gran diversidad de factores de crecimiento y citocinas, pero la regeneración de las células del músculo esquelético no se puede controlar bien (Documento no de patente 3). Los presentes inventores seleccionaron previamente factores humorales y receptores durante la diferenciación de los cardiomiocitos de células madre embrionarias (ES) (Documento no de patente 4).

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) se identificó inicialmente como una citocina hematopoyética, y se ha usado para la movilización de células madre hematopoyéticas en el entorno clínico (Documentos no de patente 5, 6 y 7). Además, el G-CSF tiene varias funciones en la diferenciación, la proliferación y la supervivencia celular (Documento no de patente 8).

También se informó de que el G-CSF tenía una acción en la proliferación de células musculares en ratas sometidas a lesión del músculo esquelético para mejorar la recuperación muscular (Documento no de patente 9). Sin embargo, aunque el G-CSF participa en la regeneración del músculo esquelético, no hay informes sobre el mecanismo subyacente ni sobre el método apropiado, la frecuencia ni la dosis de la administración real de G-CSF como potenciador de la reparación muscular.

A continuación, se presenta la información de referencia de la técnica anterior relativa a la presente solicitud.

Lista de citas

Documentos no de patente

- Documento no de patente 1: Le Grand, F. y Rudnicki, M. A. "Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis". *Current Opinion in Cell Biology* 19, 628-633 (2007).
Documento no de patente 2: Shi, X. y Garry, D. J. "Muscle stem cells in development, regeneration, and disease". *Genes & Development* 20, 1692-1708, doi:10.1101/gad.1419406 (2006).
Documento no de patente 3: Buckingham, M. y Montarras, D. "Skeletal muscle stem cells". *Current Opinion in Genetics & Development* 18, 330-336 (2008).
Documento no de patente 4: Yuasa, S. *et al.* "Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells". *Nat Biotechnol* 23, 607-611 (2005).
Documento no de patente 5: Welte, K., Gahrilove, J., Bronchud, M. H., Platzer, E. y Morstyn, G. "Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years". *Blood* 88, 1907-1929 (1996).
Documento no de patente 6: Demetri, G. D. y Griffin, J. D. "Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor". *Blood* 78, 2791-2808 (1991).
Documento no de patente 7: Metcalf, D. "Hematopoietic cytokines". *Blood* 111, 485-491, doi:10.1182/blood-2007-03-079681 (2008).
Documento no de patente 8: Avalos, B. R. "Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor". *Blood* 88, 761-777 (1996).
Documento no de patente 9: Stratos, I. *et al.*, "Granulocyte-colony stimulating factor enhances muscle proliferation and strength following skeletal muscle injury in rats", *J. of Applied Physiology*, 103, 1857-1863 (2007).

60 Sumario de la invención

Solución al problema

La presente invención tiene por objetivo proporcionar un factor estimulante de colonias de granulocitos para su uso en el tratamiento de la lesión muscular, donde el factor estimulante de colonias de granulocitos se va a administrar intramuscularmente en un período de 4 a 7 días posterior a la lesión muscular. En concreto, tiene por objetivo

dilucidar el efecto que G-CSF puede ejercer sobre el músculo dañado y el mecanismo mediante el cual se ejerce el efecto, así como determinar el método, la frecuencia y la dosis de administración apropiados de G-CSF como potenciador de la reparación muscular, de manera que se proporcionen potenciadores de la reparación muscular viables en la práctica que contengan G-CSF como principio activo.

5

Medios de resolución de los problemas

Los presentes inventores estudiaron el efecto que el G-CSF podría ejercer sobre el músculo dañado y el mecanismo mediante el cual ejercería el efecto. Como resultado de ello, encontraron que: se había expresado un receptor de G-CSF en los somitas de embrión de ratón y que se potenció la proliferación de los mioblastos al administrarse G-CSF; que el receptor de G-CSF se expresó enérgicamente a los 4 a 7 días después de la lesión del músculo esquelético; que al administrarse G-CSF por vía tópica en ese período, bastó con bajas dosis para potenciar notablemente el músculo esquelético. La presente invención se ha realizado basándose en dichos hallazgos.

10

15 Así pues, la presente divulgación proporciona lo siguiente.

[1] Un potenciador de la reparación muscular para la administración tópica que contiene un factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) como principio activo.

20

[2] El potenciador de la reparación muscular expuesto en 1 anterior, donde la administración tópica es administración intramuscular.

[3] El potenciador de la reparación muscular expuesto en 1 o 2 anterior, que se va a administrar a los 2 a 10 días después de la lesión muscular.

[4] El potenciador de la reparación muscular expuesto en uno cualquiera de 1 a 3 anteriores, que se va a administrar en un intervalo de 4 días.

25

[5] El potenciador de la reparación muscular expuesto en 3 o 4 anterior, que se va a administrar a una dosis total de 0,2 a 50 µg/kg en el período de 2 a 10 días después de la lesión muscular.

Efecto ventajoso de la invención

30 Los potenciadores de la reparación muscular mostraron un efecto potenciador de la reparación muscular sumamente destacado a dosis bajas tras la administración tópica, en particular, tras la administración intramuscular. Los potenciadores de la reparación muscular son eficaces para el tratamiento de diversos tipos de lesión muscular.

Breve descripción de las figuras

35

La Figura 1 es un conjunto de fotografías que muestran que el G-CSFR se expresa en los somitas en desarrollo a mediados de la gestación;

a. Hibridación *in situ* en todo el portaobjetos para *c-met*, *pax3*, *myod*, *mrf4* y *csf3r*, así como la tinción con LacZ de embrión E10.5 con introducción de *myf5*. *csf3r* se expresó en los somitas en E10.5. b. Inmunotinción para G-CSFR y DAPI en embriones de ratón E8.5, E9.5, E10.5 y E11.5 (sección horizontal). G-CSFR (verde) se expresó claramente durante E9.5 a E10.5 en los somitas. c. Tinciones inmunofluorescentes triples para Pax3, Pax7 y G-CSFR en el embrión E10.5. Se muestran G-CSFR (verde), Pax3, Pax7 (rojo) y los núcleos (DAPI, azul). d. Se muestran tinciones inmunofluorescentes triples para MyoD, y miogenina, desmina y G-CSFR en el embrión E10.5. e. Se muestran inmunotinciones triples para G-CSF (verde), Pax3, Pax7 (rojo) y núcleos (DAPI, azul). f. Se muestran tinciones inmunofluorescentes triples para MyoD, y miogenina, desmina y G-CSF (verde) en el embrión E10.5. Cabe señalar que tanto G-CSF como G-CSFR se expresaron en la misma célula.

40

45

La Figura 2 muestra el aumento en la proliferación de células de mioblastos debido a G-CSF;

a. Fotografía de contraste de fases y fotografía de inmunofluorescencia para G-CSFR y α -actinina de células C2C12 antes y después de la diferenciación. b. Análisis de transferencia Western de las células C2C12 en diversos puntos temporales tras la diferenciación. La expresión de α -actinina aumentó gradualmente, mientras que el G-CSFR se fue regulando negativamente progresivamente tras la diferenciación. c. Efecto de G-CSF en la proliferación de células C2C12. Se encontró que G-CSF aumentó el número de células C2C12 de una forma dependiente de la dosis. d. Efecto de G-CSF en la absorción de BrdU en las células C2C12. e. Efecto del anticuerpo bloqueante anti-G-CSF sobre la proliferación inducida por el suero de células C2C12. Los anticuerpos bloqueantes anti-G-CSF inhibieron la proliferación mediada por el suero de una manera dependiente de la dosis. f. Análisis de transferencia Western de la fosforilación de las moléculas de señalización representativas tales como STAT3, AKT, ERK, JNK y p38MAPK en las células C2C12. G-CSF indujo la fosforilación de STAT3, AKT, ERK, JNK y p38MAPK de una manera dependiente del tiempo. g. G-CSF activó la actividad de la luciferasa APRE en las células C2C12 de una manera dependiente de la dosis.

55

60

La Figura 3 muestra que el receptor de G-CSF se expresa en miocitos esqueléticos regenerantes de adulto;

a. Modelo de lesión por cardiotoxina y momento del análisis histológico. b. Análisis histológico del músculo esquelético lesionado con cardiotoxina. La tinción con HE del recto femoral. Se muestran claramente la lesión del músculo esquelético y su proceso de regeneración. c, d. Se muestran inmunotinciones triples del músculo esquelético no lesionado (c, Día 0) y lesionado (d, Día 5) para G-CSFR (verde), laminina (rojo) y los núcleos (DAPI, azul). G-CSFR no se expresó el Día 0, mientras que los miocitos pequeños, de forma redonda y regeneradores nucleares centrales expresaron enérgicamente G-CSFR a los 5 días de la lesión. e. Evolución

65

temporal de la expresión de G-CSFR en los miocitos esqueléticos regenerantes. Se muestra la tinción de inmunofluorescencia del músculo esquelético lesionado en el Día 1, 5, 8 y 14. **f.** Se contaron las células positivas en G-CSFR y las células centronucleares. Se contó el porcentaje de células positivas en G-CSFR frente a las células centronucleares. Se observaron las células del músculo esquelético regenerantes positivas en G-CSFR a las 3 a 8 días de la lesión.

La Figura 4 muestra que el G-CSF tanto intrínseco como extrínseco aumenta la regeneración del músculo esquelético; **a.** Efecto de la administración intravenosa (i.v.) o intramuscular (i.m.) de G-CSF en la lesión del músculo esquelético inducida por cardiotoxina. Se muestran tinciones con HE del recto femoral lesionado a los 7 días de la inyección de cardiotoxina. Un número de células de músculo esquelético centrales nucleares aumentó bastante, y la regeneración fue potenciada por la administración de G-CSF extrínseco. La administración i.m. fue más eficaz que la administración i.v. **b.** Se cuantificó el número de células nucleares centrales. G-CSF aumentó significativamente los miocitos esqueléticos nucleares centrales regenerados. **c.** Se midió el diámetro del recto femoral regenerado. La administración intramuscular de G-CSF fue eficaz para la regeneración. **d.** Medición de la fuerza de agarre de los miembros anteriores tras la lesión con cardiotoxina. G-CSF mejoró significativamente la fuerza muscular del músculo esquelético lesionado por cardiotoxina. **e.** Papel de la señal de G-CSF intrínseco en la regeneración del músculo esquelético. Se muestran tinciones con HE del recto femoral lesionado en el Día 7. La administración del anticuerpo neutralizante anti-G-CSF en el Día 3 deteriora la regeneración espontánea de los miocitos esqueléticos de un modo dependiente de la dosis. **f.** Se contó el número de células nucleares centrales. El anticuerpo anti-G-CSF neutralizante redujo significativamente los miocitos esqueléticos nucleares centrales regenerados. **g.** El diámetro del recto femoral lesionado también se redujo significativamente con el anticuerpo neutralizante anti-G-CSF.

La Figura 5 muestra el desarrollo y la regeneración del músculo esquelético deteriorado en ratón *csf3r^{-/-}*; **a.** Se muestra la tinción con HE del recto femoral de ratones de tipo silvestre y *csf3r^{-/-}*. Cada sección de miocitos de los ratones *csf3r^{-/-}* tenía un diámetro superior al del tipo silvestre. **b.** Se realizó el análisis cuantitativo de la superficie de la sección de los miocitos esqueléticos en ratones de tipo silvestre y *csf3r^{-/-}*. **c.** Se muestra el diámetro del recto femoral. Los ratones *csf3r^{-/-}* muestran una reducción significativa del tamaño del recto femoral. **d.** Tinción con HE del músculo esquelético con lesión inducida por cardiotoxina en el Día 7 y 14 en ratones de tipo silvestre y *csf3r^{-/-}*. La regeneración muscular se retardó notablemente en los ratones *csf3r^{-/-}*. **e.** Medición del número de miocitos nucleares centrales en la regeneración del músculo esquelético en el Día 7 o 14 en ratones de tipo silvestre y *csf3r^{-/-}*. La regeneración muscular se vio notablemente obstaculizada en los ratones *csf3r^{-/-}*. **f.** Efecto de la administración de G-CSF extrínseco en la lesión muscular inducida por cardiotoxina en ratones de tipo silvestre y *csf3r^{-/-}*. La tinción con HE del músculo esquelético lesionado en el Día 7 después de la inyección de cardiotoxina. **g.** Efecto de la administración de G-CSF extrínseco sobre la lesión de miocitos esqueléticos inducida por cardiotoxina, medido por el número de miocitos nucleares centrales. No se observó una aceleración de la regeneración muscular debida al G-CSF extrínseco en los ratones *csf3r^{-/-}*. **h.** También se midió la fuerza de agarre de los miembros anteriores en ratones *csf3r^{-/-}* inyectados con cardiotoxina con o sin tratamiento con G-CSF. El G-CSF no mejoró la recuperación funcional en los ratones *csf3r^{-/-}*.

La Figura 6 muestra el papel de las células hematopoyéticas que expresan G-CSFR en la regeneración del músculo esquelético. **a.** Modelo experimental usando trasplante de médula ósea 1. Se aisló la médula ósea de ratones transgénicos-GFP y se trasplantó a ratones *csf3r^{-/-}*. Se inyectó cardiotoxina en el recto femoral y se administró G-CSF en el Día 4 y 6. **b.** Se analizó el quimerismo de las células hematopoyéticas antes (izquierda) y después (derecha) del trasplante de las células de médula ósea mediante FACS. **c.** **d.** Efecto de G-CSF en la fuerza de agarre de los miembros anteriores (**c**) y el diámetro del recto femoral (**d**) tras la lesión de miocitos esqueléticos inducida por cardiotoxina en ratones *csf3r^{-/-}* trasplantados con la médula ósea de tipo silvestre (ratones GFP-Tg). **e.** Modelo experimental para el trasplante de médula ósea 2. Se aisló la médula ósea de ratones *csf3r^{-/-}* y se trasplantó en ratones de tipo silvestre (*csf3r^{+/+}*). **f.** **g.** Efecto de G-CSF en la fuerza de agarre de los miembros anteriores (**f**) y diámetro del recto femoral (**g**) tras la lesión de miocitos esqueléticos inducida por cardiotoxina en los ratones de tipo silvestre trasplantados con la médula ósea de ratones *csf3r^{-/-}* (ratones GFP-Tg).

La potenciación de la reparación muscular pretende significar la potenciación del aumento y/o la división de los mioblastos en un músculo lesionado, con el resultado bien de la regeneración del músculo para funcionar de una manera que se asemeja a o supera los niveles inherentes o de la reducción del dolor muscular. Las funciones del músculo son la contractilidad, la flexibilidad, el rendimiento catabólico y la acumulación de glucógeno.

La lesión muscular que se va a tratar con los potenciadores de la reparación muscular no se limita a una en particular, y puede incluir la distensión muscular, la rotura muscular, la contusión, la laceración o el mordisco extendido hasta el músculo, el dolor muscular grave (dolor muscular retardado) y la lesión muscular por irritación producida por fármacos. La distensión muscular es una enfermedad caracterizada por la contracción brusca de un músculo, dañando parcialmente una fascia o fibra muscular. Las lesiones mencionadas anteriormente se tratarán independientemente de si se producen en las células musculares, en el tejido muscular o en los mioblastos.

Los sitios específicos de aplicación incluyen vientre, espalda, cuello, dedos, muñeca, parte superior del brazo, hombro, lomo, pecho, extremidades inferiores, rodilla, muslo, isquiotibiales, pantorrilla, etc. Los músculos por tratar incluyen bíceps, tríceps, músculo femoral, trapecio, músculo glúteo mayor, cuádriceps, isquiotibiales, gemelos, músculo extensor de la pierna, músculo extensor del pulgar, supraespinoso, músculo recto abdominal, músculo

aductor del muslo, músculo extensor de los dedos, etc.

Los potenciadores de la reparación muscular contienen un factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) como principio activo.

- 5 El G-CSF usado como principio activo de los potenciadores de la reparación muscular puede ser cualquier G-CSF, pero preferentemente G-CSF muy purificado, más específicamente G-CSF de mamífero, especialmente que tenga actividad biológica sustancialmente idéntica a la del G-CSF humano. La fuente de la que se obtiene el G-CSF no se limita a una en particular, pudiéndose usar G-CSF de origen natural o G-CSF modificado genéticamente,
- 10 preferentemente G-CSF modificado genéticamente. El G-CSF modificado genéticamente puede tener una secuencia de aminoácidos idéntica a la del G-CSF de origen natural, o puede contener una eliminación, sustitución, adición u otra modificación de uno o más aminoácidos de dicha secuencia de aminoácidos, siempre que tenga actividad biológica similar a la del G-CSF de origen natural. La eliminación, sustitución, adición u otra modificación de aminoácidos se pueden realizar mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, los
- 15 expertos en la materia pueden preparar un polipéptido funcionalmente comparable a G-CSF mediante la introducción de una variación de aminoácidos en el G-CSF según sea apropiado usando mutagénesis dirigida (Gotoh, T. *et al.* (1995) "Gene" 152, 271-275; Zoller, M. J. y Smith, M. (1983) *Methods Enzymol.* 100, 468-500; Kramer, W. *et al.* (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456; Kramer, W. y Fritz, H. J. (1987) *Methods Enzymol.* 154, 350-367; Kunkel, T. A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 82, 488-492; Kunkel (1988) *Methods Enzymol.* 85, 2763-
- 20 2766) u otras técnicas. Las variaciones de aminoácidos también se producen en la naturaleza. En general, se sustituye un resto de aminoácido preferentemente con otro aminoácido donde se conserve la propiedad de la cadena lateral de aminoácidos. Por ejemplo, las propiedades de las cadenas laterales de aminoácidos incluyen aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas (G, A, V, L, I, P), aminoácidos que tienen cadenas laterales que
- 25 contienen grupos hidroxilo (S, T, Y), aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre (C, M), aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen carboxilato y amida (D, N, E, Q), aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen bases (R, K, H) y aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen grupos aromáticos (H, F, Y, W) (los ejemplos se muestran por códigos de aminoácidos de una letra dentro de cada conjunto entre paréntesis). Ya se sabe que los polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos modificada mediante la
- 30 eliminación, adición y/o sustitución de uno o más restos de aminoácidos conservan su actividad biológica (Mark, D. F. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. (1984) 81, 5662-5666; Zoller, M. J. y Smith, M. *Nucleic Acids Research* (1982) 10, 6487-6500; Wang, A. *et al.*, *Science* 224, 1431-1433; Dalbadie-McFarland, G. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. (1982) 79, 6409-6413).
- 35 También se pueden usar las proteínas de fusión de G-CSF y otra proteína. Las proteínas de fusión se pueden preparar, por ejemplo, ligando el ADN que codifica G-CSF en marco con el ADN que codifica otra proteína, insertando el producto de la ligadura en un vector de expresión y expresándolo en un hospedador. La segunda proteína que se fusiona con G-CSF en el presente documento no se limita a una en particular.
- 40 También se puede usar G-CSF modificado químicamente. Los ejemplos de G-CSF modificado químicamente incluyen G-CSF manipulado para que tenga un cambio de configuración, o la adición o supresión de cadenas de oligosacáridos, y G-CSF conjugado con polietilenglicol, la vitamina B12 o un compuesto tal como un compuesto inorgánico u orgánico.
- 45 El G-CSF usado se puede preparar mediante cualquier proceso, por ejemplo, mediante el cultivo de una célula tumoral humana o una línea celular de un hibridoma productor de G-CSF humano, y la extracción y el aislamiento/la purificación de G-CSF mediante diversos métodos de la célula cultivada o mediante la producción de G-CSF por técnicas de ingeniería genética en *E. coli*, levadura, células de ovario de hámster chino (células CHO), células C127, células COS, células de mieloma, células BHK, células de insecto o similar, y la extracción y el aislamiento/la
- 50 purificación por diversos métodos. El G-CSF usado es preferentemente G-CSF preparado mediante técnicas de ingeniería genética, preferentemente usando células de mamífero (especialmente, células CHO) (por ejemplo, véase JPB HEI 1-44200, JPB HEI 2-5395, JPA SHO 62-129298, JPA SHO 62-132899, JPA SHO 62-236488 y JPA SHO 64-85098).
- 55 Si se desea, los potenciadores de la reparación muscular pueden contener agentes de suspensión, solubilizantes, estabilizantes, agentes isotónicos, conservantes, inhibidores de la adsorción, tensioactivos, diluyentes, excipientes, modificadores del pH, agentes calmantes, tampones, agentes reductores que contienen azufre, antioxidantes, etc., según proceda en función del modo de administración o de la forma de dosificación.
- 60 Los ejemplos de agentes de suspensión incluyen metilcelulosa, polisorbato 80, polisorbato 20, hidroxietilcelulosa, goma árabe, goma de tragacanto en polvo, carboximetilcelulosa de sodio, monolaurato de polioxietilensorbitán, etc.
- Los solubilizantes incluyen aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno, polisorbato 80, polisorbato 20, amida de ácido nicotínico, Macrogols, ésteres etílicos de ácidos grasos de aceite de ricino, etc.

Los estabilizantes incluyen dextrano 40, metilcelulosa, gelatina, sulfito de sodio, metasulfito de sodio, etc.

Los agentes isotónicos incluyen, por ejemplo, D-manitol, sorbitol, etc.

- 5 Los conservantes incluyen, por ejemplo, paraoxibenzoato de metilo, paraoxibenzoato de etilo, ácido sórbico, fenol, cresol, clorocresol, etc.

Los inhibidores de la adsorción incluyen, por ejemplo, albúmina de suero humano, lecitina, dextrano, copolímeros de óxido de etileno/óxido de propileno, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno, polietilenglicol, etc.

10

Los ejemplos típicos de tensioactivos incluyen:

15

tensioactivos no iónicos tales como los que tienen valores de HLB de 6-18, por ejemplo, ésteres de ácidos grasos de sorbitán tales como monocaprilato de sorbitán, monolaurato de sorbitán, monopalmitato de sorbitán; ésteres de ácidos grasos de glicerina tales como monocaprilato de glicerina, monomiristato de glicerina, monoestearato de glicerina; ésteres de ácidos grasos de poliglicerina tales como monoestearato de decaglicerilo, diestearato de decaglicerilo, monolinoleato de decaglicerilo; ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán tales como monolaurato de polioxietilensorbitán, monooleato de polioxietilensorbitán, monoestearato de polioxietilensorbitán, monopalmitato de polioxietilensorbitán, trioleato de polioxietilensorbitán, triestearato de polioxietilensorbitán; ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitol tales como tetraestearato de polioxietilensorbitol, tetraoleato de polioxietilensorbitol; ésteres de ácidos grasos de polioxietilenglicerina tales como monoestearato de polioxietilenglicerilo; ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol tales como diestearato de polietilenglicol; éteres alquílicos de polioxietileno tales como polioxietilenaureiléter; éteres alquílicos de polioxietilen-polioxipropileno tales como polioxietilen-polioxipropilen-glicoléter, polioxietilen-polioxipropilen-propiléter, polioxietilen-polioxipropilen-cetiléter; feniléteres alquílicos de polioxietileno tales como polioxietilen-nonilfeniléter; aceites de ricino endurecidos con polioxietileno tales como aceite de ricino de polioxietileno, aceite de ricino endurecido con polioxietileno (aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno); derivados de cera de abeja de polioxietileno tales como cera de abeja de polioxietilensorbitol; derivados de lanolina de polioxietileno tales como lanolina de polioxietileno; amidas de ácidos grasos de polioxietileno tales como amida de ácido polioxietileneotáico;

20

25

30

35

tensioactivos aniónicos, por ejemplo, sulfatos de alquilo que tienen un grupo alquilo C₁₀₋₁₈ tales como cetilsulfato de sodio, laurilsulfato de sodio, oleilsulfato de sodio; alquiléteresulfatos de polioxietileno que tienen un número medio de moles de óxido de etileno añadidos de 2-4 y un grupo alquilo C₁₀₋₁₈, tales como laurilsulfato de polioxietileno sódico; sales de ésteres de ácido alquilsulfosuccínico que tienen un grupo alquilo C₈₋₁₈, tales como laurilsulfosuccinato de sodio; y tensioactivos naturales, por ejemplo, lecitina; glicerofosfolípidos; esfingofosfolípidos tales como esfingomielina; ésteres de ácidos grasos de sacarosa de ácidos grasos C₁₂₋₁₈.

40

Las formulaciones pueden contener uno de estos tensioactivos o más de uno en combinación. Los tensioactivos preferidos son ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán, tales como polisorbato 20, 40, 60 o 80, especialmente polisorbatos 20 y 80. También se prefieren los polioxietilen-polioxipropilen-glicoles tipificados por poloxámeros (por ejemplo, Pluronic F-68®).

45

Los agentes reductores que contienen azufre incluyen, por ejemplo, *N*-acetilcisteína, *N*-acetilhomocisteína, ácido tióctico, tioglicol, tioetanolamina, tioglicerol, tiosorbitol, ácido tioglicólico y sales de los mismos, tiosulfato sódico, glutatona y compuestos que contienen sulfhidrilo tales como ácido tioalcanoico que tiene de 1 a 7 átomos de carbono.

50

Los antioxidantes incluyen, por ejemplo, ácido eritórlico, dibutilhidroxitolueno, butilhidroxianisol, α -tocoferol, acetato de tocoferol, ácido L-ascórbico y sales de los mismos, palmitato de L-ascorbilo, estearato de L-ascorbilo, bisulfito de sodio, sulfito de sodio, galato de triamilo, galato de propilo o agentes quelantes tales como tetraacetato de etilendiamina disódico (EDTA), pirofosfato de sodio y metafosfato de sodio.

55

También pueden contener otros componentes comúnmente añadidos, por ejemplo, sales inorgánicas tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, fosfato de sodio, fosfato de potasio y bicarbonato de sodio; y sales orgánicas tales como citrato de sodio, citrato de potasio y acetato de sodio.

60

Los potenciadores de la reparación muscular se pueden administrar en una forma de dosificación adecuada como inyectables para la administración intramuscular. Se prefiere particularmente la administración intramuscular.

65

Para preparar inyectables, se disuelven los componentes descritos anteriormente en un tampón acuoso conocido en el campo de las formulaciones en solución, tal como un tampón de fosfato (preferentemente, sistema de monohidrógeno-fosfato de sodio - dihidrógeno-fosfato de sodio) y/o un tampón de citrato (preferentemente, tampón de citrato de sodio) y/o un tampón de acetato para preparar de esa manera una formulación de solución. La concentración del tampón es normalmente de 1-500 mM, preferentemente de 5-100 mM, más preferentemente de

10-20 mM. Los inyectables pueden ser formulaciones en solución o formulaciones liofilizadas.

El momento de la administración de los potenciadores de la reparación muscular que contienen G-CSF como principio activo puede ser determinado según lo apropiado por los expertos en la materia teniendo en cuenta la afección del paciente que se vaya a tratar, pero los potenciadores se administran preferentemente a los 4-7 días de la lesión muscular.

Los potenciadores de la reparación muscular se administran preferentemente en un intervalo de 4 días, más preferentemente en un intervalo de 3 días, y lo más preferentemente en un intervalo de 2 días.

Se comprobó que los potenciadores de la reparación muscular fueran adecuadamente eficaces en ratones tras la administración tópica, incluso a dosis tan bajas como de 0,5 µg/cuerpo (aprox. 21 µg/kg) (Ejemplo 5). En general, el efecto del G-CSF humano en seres humanos es aproximadamente 20 veces superior que en el ratón. Por ejemplo, se sabe que en los seres humanos, las células madre son reclutadas y que los glóbulos blancos también aumentan cuando se administra G-CSF humano de forma continua a una dosis de 10 µg/kg (Br J Hematol Watts 1997 98 474-479). En los ratones, por otro lado, se confirmó que el número de neutrófilos periféricos aumentó al administrar G-CSF humano a una dosis de 200 µg/kg durante 5 días ("Blood" 89:2736, 1997), mientras que los glóbulos blancos aumentaron cuando los ratones recibieron G-CSF humano a una dosis de 250 µg/kg durante 5 días ("Blood", mayo de 1997, 1:89 (9):3186-91). Por lo tanto, para que los potenciadores de la reparación muscular alcancen el efecto deseado de reparación muscular provocando a la vez menos efectos secundarios en seres humanos, la dosis de una sola administración es preferentemente de 0,1-10 µg/kg, más preferentemente de 0,5-5 µg/kg y lo más preferentemente de 1-2,5 µg/kg. La dosis total por administrar durante el período prescrito anteriormente es preferentemente de 0,2-50 µg/kg, más preferentemente de 1,0-25 µg/kg, y lo más preferentemente de 2,0-12,5 µg/kg.

Sin embargo, se ha de tener en cuenta que la presente divulgación no se limita, bajo ningún concepto, a la dosificación de G-CSF humano.

Los potenciadores de la reparación muscular se pueden usar en combinación con otros fármacos.

Consideración del mecanismo subyacente

Aún sin el deseo de quedar vinculados a teoría alguna, los presentes inventores consideran el mecanismo subyacente de la siguiente manera.

Se ha confirmado que, en el desarrollo y en la regeneración de los miocitos esqueléticos, G-CSF y G-CSFR tienen un papel fundamental al estar mediados por la proliferación de los mioblastos. Curiosamente, este mecanismo se conserva entre el desarrollo de los miocitos esqueléticos embrionarios y la regeneración de los miocitos esqueléticos adultos. G-CSFR se expresa transitoriamente, pero de manera energética, en los mioblastos que proliferan en los somitas en desarrollo. Los ratones con G-CSFR desactivado experimentaron una reducción del diámetro del músculo recto femoral, lo que significa que la señalización de G-CSF y de G-CSFR es esencial para el desarrollo adecuado del músculo esquelético. G-CSFR también se expresa en miocitos adultos regenerantes. G-CSF estimula estos mioblastos que expresan G-CSFR y potencia la regeneración del músculo esquelético tras la lesión del músculo esquelético. Los ratones con G-CSFR desactivado experimentaron un deterioro de la regeneración del músculo esquelético que es espontánea. G-CSF es una conocida citocina hematopoyética, y puede reclutar células hematopoyéticas. Con el fin de excluir la posible participación de los efectos de las células hematopoyéticas en la regeneración del músculo esquelético tras la inyección de G-CSF, se trasplantó médula ósea de tipo silvestre a ratones con G-CSFR desactivado. En estos ratones, los miocitos esqueléticos no expresaron G-CSFR, mientras que las células hematopoyéticas expresaron G-CSFR y mostraron una respuesta normal al G-CSF. Si las células hematopoyéticas contribuyeran a la regeneración del músculo esquelético, estos ratones mostrarían las capacidades normales de regeneración. Sin embargo, estos ratones con G-CSFR desactivado con trasplante de médula ósea no mostraron ninguna mejora en la regeneración del músculo esquelético tras la administración de G-CSF.

El G-CSF recluta células hematopoyéticas de la médula ósea a la circulación periférica. La contribución de las células de la médula ósea en la regeneración muscular se ha documentado (por ejemplo, Ferrari, G. *et al.* "Muscle Regeneration by Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors". *Science* 279, 1528-1530, doi:10.1126/science.279.5356.1528 (1998)). Por lo tanto, los presentes inventores realizaron un estudio para determinar si G-CSF sería dependiente de las células de médula ósea en el proceso de regeneración del músculo esquelético, y se demostró claramente que las médulas óseas con expresión de G-CSF trasplantadas en ratones con G-CSFR desactivado no contribuyeron, de ninguna manera, a la regeneración del músculo esquelético. Como resultado de ello, los presentes inventores confirmaron que el efecto de G-CSF en el músculo esquelético fue una acción directa sobre las células del músculo esquelético. Clínicamente, el G-CSF se usa en pacientes con neutropenia producida como consecuencia de la quimioterapia inmunosupresora, neutropenia congénita grave o infección bacteriana potencialmente mortal, también para la recogida de células madre. La mialgia (dolor muscular) es uno de los principales efectos secundarios de G-CSF que se han de tener en cuenta cuando se administra a

seres humanos (Taylor, K. M. *et al.* "Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor hastens granulocyte recovery after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation in Hodgkin's disease" [la errata publicada aparece en *J Clin Oncol* 1990 Mar; 8(3):567]. *J Clin Oncol* 7, 1791-1799 (1989)). Se especula que un mecanismo de este fenómeno es que la inyección de G-CSF estimula los mioblastos esqueléticos y la proliferación explosiva de miocitos esqueléticos resultante da lugar a la mialgia. A partir de varios aspectos sobre el uso clínico pasado de G-CSF, se han estudiado con precisión su seguridad y efectos secundarios. Los resultados proporcionan un nuevo potencial terapéutico y una visión mecanicista del G-CSF en el desarrollo y la regeneración del músculo esquelético, y se espera que aceleren la aplicación del G-CSF en la terapia de regeneración del músculo esquelético.

Ejemplos

A continuación, se presentan los métodos experimentales usados en los ejemplos.

Hibridación *in situ* en todo el portaobjetos

Se extirparon embriones murinos de ratones preñados ICR de tipo silvestre el día embrionario 10,5. Se realizó la hibridación *in situ* en todo el portaobjetos como se describe (Documento no de patente 4). Los ADNc de longitud completa para *c-met*, *pax3*, *myod* y *mrf4* murinos (números de acceso NM_008591, NM_001159520, NM_010866, NM_008657) fueron proporcionados amablemente por el profesor M. E. Buckingham (Departamento de biología evolutiva, Instituto Pasteur). Los ADNc de longitud completa para *csf3r* murino (número de acceso NM_007782) fue proporcionado amablemente por el profesor S. Nagata (Departamento de genética, Universidad de Osaka) (Fukunaga, R., Seto, Y., Mizushima, S. y Nagata, S. "Three Different mRNAs Encoding Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 8702-8706, doi:10.1073/pnas.87.22.8702 (1990)). Las sondas se generaron usando ARN polimerasa de T3 o T7.

Ratones *Myf5 nlacZ*

Los ratones *Myf5 nlacZ* fueron amablemente obsequiados por el doctor Shahragim Tajbakhsh (Departamento de biología evolutiva, Instituto Pasteur) (Tajbakhsh, S., Rocancourt, D. y Buckingham, M. "Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non-myogenic fates in myf-5 null mice". *Nature* 384, 266-270 (1.996)).

Inmunofluorescencia

Se fijaron embriones murinos en día embrionario 8,5, 9,5, 10,5, 11,5 y 12,5 en paraformaldehído al 4 % durante 3 horas y se embebieron para la sección congelada usando Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek, Chuo-ku, Tokio). Las muestras se incubaron con Triton X-100 durante 5 minutos a temperatura ambiente, después se lavaron y se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios: anti-receptor de G-CSF (Santa Cruz Biotechnology (sc-9173), 1:50), anti-Pax3 (ATCC, 1:200), anti-Pax7 (R & D Systems (MAB1675), 1:50), anti-MyoD (DAKO (M3512), 1:50), anti-miogenina (Santa Cruz Biotechnology (sc-12732), 1:50), anti-desmina (Dako (M0760), 1:200), anti-G-CSF (Santa Cruz Biotechnology (sc-9351), 1:50), anti- α -actinina (SIGMA (A7811), 1:1000) y anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology (sc-20357), 1:200), siendo todos los anticuerpos adquiridos comercialmente. Después de la incubación durante la noche, se visualizaron los anticuerpos unidos con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 o Alexa 546 (Molecular Probes, Minato-ku, Tokio). Se tiñeron los núcleos con diclorhidrato de 4',6'-diamidina-2-fenilindol (DAPI; Invitrogen (D21490)). Para la tinción de BrdU, se usó el kit de marcaje de BrdU (1296736, Roche, Basilea, Suiza). Tras la recuperación de los antígenos usando histoVT One (L6F9587 Nacalai Tesque, Nakagyo-ku, Kioto) y el posterior bloqueo, se realizó la tinción con BrdU como se describe en el protocolo.

Cultivo de células C2C12

Se cultivaron mioblastos de ratón C2C12 (ATCC) en DMEM/FBS al 10 % (GIBCO). En condiciones de diferenciación, se reemplazó el medio por DMEM/suero de caballo al 2 % (GIBCO) para la diferenciación. Se añadió G-CSF murino recombinante (414-CS, R & D Systems, Minneapolis, MN) en los días prescritos. Se realizó un análisis de la inhibición de la señal mediante la administración de anticuerpos neutralizantes del G-CSFR (AF-414-NA, R & D Systems).

Transferencia Western

Se trataron células C2C12 con G-CSF. Se aislaron extractos celulares a los 0, 5, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos de la estimulación con G-CSF. Se resolvieron las proteínas lisadas mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. Posteriormente, se realizó la inmunotransferencia con anticuerpos anti-fosfo STAT3 (9131), anti-fosfo AKT (9271), anti-fosfo ERK (9101), anti-fosfo JNK (9251S) y anti-fosfo p38MAPK (9211S) (todos adquiridos en Cell Signaling TECHNOLOGY, Beverly, MA), y anti IgG conjugado con peroxidasa de rábano picante, seguido del desarrollo con el reactivo quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce, Rockford, IL). Se recuperó la misma membrana y se volvió a someter a inmunotransferencia con anticuerpos anti-STAT3 (9132), anti-AKT (9272), anti-ERK (9102), anti-JNK (9252) y anti-p38MAPK (9212) (todos adquiridos en Cell Signaling

TECHNOLOGY), respectivamente.

Análisis de luciferasa

- 5 Se transfectaron células C2C12 cultivadas en DMEM con Lipofectamine (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El plásmido de luciferasa APRE fue proporcionado amablemente por el profesor Yoshimura (Departamento de inmunología, Universidad de Keio). Se usaron cien nanogramos del indicador APRE. Las dosis de administración de G-CSF representadas por el símbolo de la rampa indican 37,5, 125 y 375 pg/ml, respectivamente. Se usó la luciferasa CMV-Renilla como control interno para normalizar las variaciones en la
- 10 eficacia de la transfección. Todas las proteínas se expresaron a niveles muy similares, según lo confirmado por transferencia Western.

Experimento con animales

- 15 Todos los procedimientos y protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Cuidados y Uso de Animales de la Universidad de Keio, y se ajustaban a las directrices del NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Modelo de lesión del músculo esquelético

- 20 Se inyectó cardiotoxina (*Naja mossambica mossambica*, 10 µM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluida en 100 µl de PBS a una dosis de 100 µl en el recto femoral de ratones BL6/J usando una aguja de calibre 27 y una jeringa de 1 ml. Se insertó la aguja profundamente en el recto femoral longitudinalmente desde la rodilla. La cardiotoxina se inyectó a lo largo del músculo. Los ratones de un grupo de control recibieron por inyección 100 µl de PBS. Los
- 25 ratones (grupos tratados y de control) se sacrificaron en diversos puntos temporales después de la inyección de cardiotoxina, y se recogieron muestras de sangre (1,0-1,5 ml de cada ratón) en jeringas enjuagadas con heparina.

Ratones csf3r^{-/-}

- 30 Los ratones csf3r^{-/-} fueron amablemente obsequiados por el doctor Daniel C. Link (Facultad de Medicina de la Universidad de Washington, St. Louis) (Richards, M. K., Liu, F., Iwasaki, H., Akashi, K. y Link, D. C. "Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway". *Blood* 102, 3562-3568, doi:10.1182/blood-2003-02-0593 (2003)).

Ensayo de medición de la fuerza de agarre de los miembros anteriores

- Hubo 5 sesiones de entrenamiento durante las que se mantuvieron a los animales frente a la barra de medición de la fuerza de agarre (GSM, Muromachi Kikai Co., Ltd., Tokio, Japón), con el investigador sujetando suavemente las patas traseras de cada animal. Cuando las patas delanteras sin sujetar se pusieron en contacto con la barra del
- 40 GSM, se dejó que los animales se agarraran a la barra y luego se tiró suavemente del dispositivo. Entonces, el GSM midió la fuerza máxima antes de que el animal soltara la barra.

Trasplante de médula ósea

- 45 Se recogieron células de médula ósea (BM) de ratones transgénicos EGFP de 8 semanas de vida. Tras la irradiación con una sola dosis de 9,0 Gy, se inyectaron células de médula ósea EGFP⁺ no fraccionadas (1 x 10⁶ células) a través de la vena de la cola. Para evaluar el quimerismo, se recogieron células de sangre periférica de los ratones receptores 8 semanas después del trasplante de médula ósea, y se eliminaron los eritrocitos por hemólisis con cloruro de amonio. Tras ello, se determinó la frecuencia de las células EGFP⁺ entre las células nucleadas de
- 50 sangre periférica con un clasificador celular activado por fluorescencia (Becton Dickinson, San Jose, Calif.).

Análisis estadístico

- Los datos se analizaron usando el programa informático Statview J-4.5. Los valores se presentan como las medias ± DE. Las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante un ANOVA de una vía. Se usó la prueba F de Scheffe para determinar los niveles de significación. El nivel de probabilidad aceptado para la significación fue de P < 0,05.
- 55

EJEMPLO 1

- 60 Se investigó el patrón de expresión de *csf3r* en embriones de ratón en desarrollo mediante hibridación *in situ* en todo el portaobjetos.

- Para aclarar en qué lugar de los somitas se expresó *csf3r*, se compararon varios marcadores para la diferenciación de los miocitos esqueléticos (Fig. 1a). *C-met*, que codifica un receptor de tirosina quinasa del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), se expresa en la dermomiótoma, y es esencial para la deslaminación/migración de las células
- 65

progenitoras del músculo. La expresión de *C-met* se restringió a la porción ventral de los somitas, y el patrón de expresión de *csf3r* no resultó ser similar al de *c-met* (Yang, X. M., Vogan, K., Gros, P. y Park, M. "Expression of the met receptor tyrosine kinase in muscle progenitor cells in somites and limbs is absent in Splotch mice". *Development* 122, 2163-2171 (1996)). El desarrollo de los miocitos esqueléticos es sintonizado de manera precisa por los factores de transcripción miogénicos. *Pax3* se expresa primero en el mesodermo presomítico, y se expresa en el epitelio somítico del dermomiótoma. Entonces, se inhibe la expresión de *Pax3* y *Pax7* a medida que las células derivadas del dermomiótoma activan los factores de transcripción miogénicos. El patrón de expresión de *Pax3* no resultó ser idéntico al de *csf3r*. Los genes bHLH miogénicos también muestran patrones de expresión únicos en la etapa de desarrollo del músculo esquelético diferencial. *MyoD* y *myf5* se expresan en mioblastos proliferantes no diferenciados (Tapscott, S. J. *et al.* "MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts". *Science* 242, 405-411, doi:10.1126/science.3175662 (1988) ; Sara J. Venters, S. v. T. t. M. J. D. "Early development of the myotome in the mouse". *Developmental Dynamics* 216, 219-232 (1999)), mientras que *mrf4* no se expresa hasta tarde en el programa de diferenciación (Rhodes, S. J. y Konieczny, S. F. "Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family". *Genes & Development* 3, 2050-2061, doi:10.1101/gad.3.12b.2050 (1989); Bober, E. *et al.* "The muscle regulatory gene, Myf-6, has a biphasic pattern of expression during early mouse development". *J. Cell Biol.* 113, 1255-1265, doi: 10.1083/jcb. 113.6.1255 (1991)). En comparación con los patrones de expresión de los marcadores, el patrón de expresión de *csf3r* se parecía a los de *myf5* y *MyoD*. El marcador de diferenciación tardía *mrf4* no resultó ser idéntico al de *csf3r*.

La tinción inmunofluorescente de secciones de embriones en fase de desarrollo diferencial demostró que la expresión de G-CSFR en los somitas se restringió al período de E9.5 a E10.5. Antes de E9.5, no se observó G-CSFR en los somitas, y después de E11.5, la expresión de G-CSFR desapareció (Fig. 1b).

Los resultados anteriores sugirieron que G-CSF podría participar en el desarrollo de mioblastos proliferantes no diferenciados.

EJEMPLO 2

Se tiñeron por inmunotinción marcadores prematuros y maduros de miocitos esqueléticos en varias etapas de diferenciación para revelar en qué etapa de miocito esquelético expresarían el G-CSFR. Las células progenitoras del músculo esquelético surgen en la parte central de la dermomiótoma, coexpresan *Pax3* y *Pax7*, y se pueden diferenciar en fibras de músculo esquelético durante la embriogénesis ((Messina, G. y Cossu, G. "The origin of embryonic and fetal myoblasts: a role of Pax3 and Pax7". *Genes & Development* 23, 902-905, doi:10.1101/gad.1797009 (2009)). *Pax3* y *Pax7* tienen funciones parcialmente únicas y parcialmente solapantes en progenitores miogénicos, y ambas son reguladas negativamente durante la diferenciación miogénica que sigue a la expresión del factor regulador miogénico (MRF). Las células progenitoras miogénicas que expresaron *Pax3* y *Pax7* no expresaron G-CSFR (Fig. 1c). Sin embargo, entre las células en las que *Pax3* y *Pax7* disminuyeron, las que comenzaron a expresar *MyoD* y miogenina mostraron la expresión de G-CSFR (Fig. 1d). Al igual que en el informe anterior sobre el patrón de expresión de G-CSFR, la inmunorreactividad para G-CSFR se localizó en la membrana celular y el citoplasma en condiciones de estado estacionario (Aarts, L. H. J., Roovers, O., Ward, A. C. y Touw, I. P. "Receptor activation and 2 distinct COOH-terminal motifs control G-CSF receptor distribution and internalization kinetics". *Blood* 103, 571-579, doi: 10.1182/blood-2003-07-2250 (2004)). Estas células también expresaron desmina, un filamento intermedio expresado en los músculos esqueléticos.

También se examinó G-CSF, o el ligando de G-CSFR, por inmunotinción. La expresión de G-CSF no se detectó en las células progenitoras miogénicas que expresaron *Pax3* y *Pax7* (Fig. 1e). Al igual que en el caso de las células que expresaron G-CSFR, entre las células en las que *Pax3* y *Pax7* disminuyeron, las que comenzaron a expresar *MyoD* y miogenina también mostraron la expresión de G-CSF (Fig. 1f). La inmunotinción doble para G-CSF y G-CSFR reveló que las células que expresaron G-CSFR también expresaron G-CSF. Estos resultados revelaron que las células sometidas a diferenciación temprana en miocitos esqueléticos tienen una señalización de G-CSF de una forma autocrina.

El experimento descrito anteriormente verificó que G-CSF y el receptor de G-CSF se expresan en los miocitos esqueléticos en diferenciación.

EJEMPLO 3

Para dilucidar el papel de G-CSF en las células miogénicas, se analizaron mioblastos *in vitro*.

El G-CSF y el anticuerpo neutralizante anti-G-CSF se añadieron en los siguientes puntos temporales y concentraciones.

G-CSF

Momento de la adición: un día después de la siembra, se adhirieron las células a una placa por medio de DMEM + FBS al 10 %, y al segundo día, se lavó el cultivo, y se administraron DMEM (control) y DMEM + G-CSF (este

segundo día se designa Día 0 en la Fig. 2c, y la administración se efectuó únicamente por separado en el Día 0). Concentración de G-CSF añadida: los valores fueron de 0 µg/ml, 37,5 pg/ml, 125 pg/ml y 375 pg/ml de la parte inferior a la parte superior del gráfico de la Fig. 2c.

5 Anticuerpo neutralizante anti-G-CSF

Momento de la adición: un día después de la siembra, se adhirieron las células a una placa por medio de DMEM + FBS al 10 %, y al segundo día, se lavó el cultivo, y se administraron DMEM (suero⁻) y DMEM + HS al 0,1 % (suero⁺) y DMEM + HS al 0,1 % + anticuerpo neutralizante anti-G-CSF (este segundo día se designa Día 0 en la Fig. 2e, y la administración se efectuó únicamente por separado en el Día 0).

Concentración de anticuerpo neutralizante anti-G-CSF: 0,15 ng/ml, 0,5 ng/ml y 1,5 ng/ml.

La línea celular C2C12 es un subclon de células C2 establecidas del músculo del muslo en regeneración de un ratón adulto y se ha usado ampliamente como línea celular de mioblastos (Blau, H. M., Chiu, C.-P. y Webster, C. "Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons". *Cell* 32, 1171-1180 (1983)). En condiciones de cultivo bajo en suero, las células C2C12 se fusionan entre sí y se diferencian en miotubos multinucleados (Fig. 2a). La inmunotinción para G-CSFR y α -actinina reveló que las células C2C12 prematuras expresaron G-CSFR, pero no actinina, mientras que miotubos fusionados maduros expresaron claramente α -actinina, pero las células positivas en α -actinina no expresaron G-CSFR. El análisis de transferencia Western confirmó que a medida que se produjo la diferenciación, la expresión de α -actinina se fue aumentando gradualmente y la de G-CSFR se redujo (Fig. 2b).

Para aclarar el papel de G-CSF en los miocitos, se administró G-CSF a células C2C12 cuando se expresó G-CSFR. La administración de G-CSF aumentó significativamente el número de células C2C12 de una forma dependiente de la dosis (Fig. 2c). El Día 0, se administró G-CSF en una cantidad de 375 pg/ml, que era la dosis máxima usada en el experimento cuyos resultados se muestran en la Fig. 2c, y la medición se llevó a cabo el Día 4. Un experimento de incorporación de BrdU también reveló que el aumento del número de células se atribuyó a la proliferación celular por G-CSF (Fig. 2d). Además, se usó un anticuerpo neutralizante para inhibir la señalización de G-CSF innata para determinar si G-CSF era esencial para la proliferación de las células C2C12. El anticuerpo neutralizante para G-CSF inhibió la proliferación dependiente del suero de las células C2C12 (medición realizada el Día 4) (Fig. 2e).

Se ha informado que la unión de G-CSF a su receptor activa diversas señales incluyendo las proteínas ERK, JNK, p38MAPK, AKT y STAT (transductor de señales y activador de la transcripción) en las células hematopoyéticas (Avalos, B. "Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor". *Blood* 88, 761-777 (1996)). Los presentes inventores confirmaron que G-CSF activó STAT3, AKT, ERK, JNK y p38MAPK en las células C2C12 de una manera dependiente del tiempo. En el experimento en consideración, se añadió G-CSF en una cantidad de 375 pg/ml (Fig. 2f). Entre las sustancias mencionadas anteriormente, se ha informado que STAT3 contribuye a la proliferación de las células progenitoras de miocitos (Serrano, A. L., Baeza-Raja, B., Perdiguero, E., Jordi, M. y Munoz-Canoves, P. "Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy". *Cell Metab* 7, 33-44 (2008); Lynn A. Megeney, Robert L. S. Perry, Jennifer E. Lecouter y Michael A. Rudnicki. "bFGF and LIF signaling activates STAT3 in proliferating myoblasts". *Developmental Genetics* 19, 139-145 (1996)). La administración de G-CSF al medio de cultivo de células C2C12 aumentó la actividad de la luciferasa APRE que responde a la activación de STAT3 (medición realizada el Día 1) (Fig. 2g). Estos resultados muestran claramente que G-CSF potenció la proliferación en mioblastos C2C12 mediada por G-CSFR.

EJEMPLO 4

Se realizó una investigación para ver si G-CSFR se expresaría en miocitos esqueléticos en el proceso de regeneración tras una lesión. Se sabe que la cardiotoxina daña la membrana plasmática de las miofibras, pero deja la lámina basal, las células satélite y los nervios intactos, lo que permite una regeneración muscular rápida y reproducible (Hosaka, Y. et al. α 1-Syntrophin-deficient skeletal muscle exhibits hypertrophy and aberrant formation of neuromuscular junctions during regeneration". *J. Cell Biol.* 158, 1097-1107, doi:10.1083/jcb.200204076 (2002)).

Los presentes inventores inyectaron directamente cardiotoxina en los músculos femorales, y realizaron análisis histológicos en serie hasta el Día 28 (Fig. 3a). Tras la inyección de cardiotoxina, se observó la regeneración espontánea del músculo lesionado (Fig. 3b). A partir del Día 1 o 2, se absorbió una serie de células inflamatorias infiltradas en el músculo lesionado y los miotubos lesionados. Las células satélite o las células TA (células en amplificación transitoria) comenzaron a aumentar el Día 3, y se identificaron claramente miocitos nucleares centrales tempranos a partir del Día 5. Se fusionaron entre sí y su diámetro aumentó rápidamente a partir de entonces. A partir del Día 7, la superficie lesionada se llenó de los miotubos regenerados que tenían núcleos centrales y tenían un diámetro menor que los miotubos maduros. A partir del Día 28, los miotubos regenerados tenían un diámetro sustancialmente igual al de los miotubos no lesionados, aunque tenían núcleos centrales.

Como resultado de la inmunotinción triple para la lamina, G-CSFR y DAPI, no se observaron células positivas en

G-CSFR en el músculo esquelético no lesionado (Fig. 3c). Por el contrario, el G-CSFR se expresó claramente en los miocitos regenerantes el Día 5 después de la inyección de cardiotoxina (Fig. 3d). El tamaño de las células positivas en G-CSFR fue aparentemente superior al de las células inflamatorias infiltradas, y eran de forma redonda, nucleares centrales y completamente rodeadas de laminina, lo que indica que fueron regenerando miocitos tempranos que expresaban G-CSFR. Los análisis de tinción de inmunofluorescencia en serie demostraron que las células que expresan G-CSFR solo se observaron del Día 3 al Día 8 después de la lesión de los miocitos esqueléticos (Fig. 3e y 3f).

La reparación muscular se caracteriza por etapas diferenciadas de regeneración. En este proceso, se produce la regeneración del músculo esquelético que comprende la activación de las células satélite, así como la proliferación, la diferenciación y la maduración de las células satélite o células TA (Shi, X. y Garry, D. J. "Muscle stem cells in development, regeneration, and disease". *Genes & Development* 20, 1692-1708, doi:10.1101/gad.1419406 (2006)). El día de la expresión de G-CSFR correspondió al día en el que proliferaron las células progenitoras de músculo esquelético.

EJEMPLO 5

Para dilucidar la acción de G-CSF sobre los miocitos esqueléticos regenerantes, se inyectó G-CSF en modelos de lesión del músculo esquelético inducida por cardiotoxina. Se administró G-CSF por vía intravenosa o se inyectó directamente en el músculo lesionado en los Días 4 y 6, cuando G-CSFR era enérgicamente expresado, y el Día 7 se observó la regeneración del músculo esquelético. Concentración final de la adición: se administró una porción de 100 μ l a las concentraciones respectivas de 0 μ g/ml, 5 μ g/ml y 50 μ g/ml. Momento, vía, frecuencia y sitio de administración: asignándose el Día 0 como el día en el que se lesionó el músculo esquelético, la sustancia de ensayo se inyectó en la vena de la cola y se inyectó tópicamente en el músculo recto femoral lesionado los Días 4 y 6. Número de animales experimentales: n = 5. Peso medio de los ratones: 24,1 g.

Se administró el anticuerpo neutralizante anti-G-CSF por vía tópica en el recto femoral a una sola dosis el Día 3 en las mismas condiciones que con G-CSF humano.

En la dosificación de la administración de G-CSF más alta, la administración intravenosa fue eficaz para la regeneración del músculo esquelético en comparación con la administración de PBS. La administración intramuscular fue más eficaz que la administración intravenosa en la dosificación de administración de G-CSF inferior (Fig. 4a). Las células centrales nucleares representan los miocitos esqueléticos regenerados (Shi, X. y Garry, D. J. "Muscle stem cells in development, regeneration, and disease". *Genes & Development* 20, 1692-1708, doi:10.1101/gad.1419406 (2006)). El número de células nucleares centrales se aumentó significativamente mediante la administración de G-CSF, y la administración intramuscular de G-CSF aumentó significativamente la regeneración del músculo esquelético (Fig. 4b). Se midió el diámetro del músculo lesionado para mostrar que la administración de G-CSF aumentó significativamente el diámetro del músculo regenerado. El diámetro del recto femoral también se aumentó mediante la administración intramuscular, y el aumento fue más destacado que la administración intravenosa (Fig. 4c). La recuperación funcional se evaluó mediante la medición de la fuerza de agarre de los miembros anteriores; G-CSF (100 μ l administrados a una concentración de 50 μ g/ml) mejoró significativamente la recuperación funcional a los 5 y 7 días de la lesión del músculo esquelético en comparación con la administración de PBS (Fig. 4d).

Para determinar si la señalización innata de G-CSF era necesaria para la regeneración adecuada de los miocitos esqueléticos, se administró el anticuerpo neutralizante anti-G-CSF después de la lesión del músculo esquelético inducida por cardiotoxina. El anticuerpo neutralizante anti-G-CSF deterioró la regeneración espontánea de los miocitos esqueléticos de una manera dependiente de la dosis de su administración (Fig. 4e). Las células nucleares centrales que representan los miocitos regenerantes fueron exterminadas drásticamente mediante la adición del anticuerpo neutralizante anti-G-CSF (Fig. 4f). El diámetro del músculo lesionado también se redujo significativamente mediante la administración del anticuerpo neutralizante anti-G-CSF en comparación con la administración de PBS (Fig. 4g). Estos resultados mostraron claramente que el G-CSF exógeno aumenta la regeneración de los miocitos esqueléticos y que la señalización fisiológica innata de G-CSF desempeña un papel esencial para la regeneración adecuada de los miocitos esqueléticos.

También se encontró que la administración de G-CSF humano es eficaz en la regeneración de los miocitos esqueléticos, incluso a la dosis más baja, y que la administración intramuscular es más eficaz que la administración intravenosa.

EJEMPLO 6

Para aclarar el papel de la señalización de G-CSF y del receptor de G-CSF en los miocitos esqueléticos, se examinaron ratones con G-CSFR desactivado ($csf3r^{-/-}$) que tenían la señalización de G-CSF desactivada genéticamente. Los ratones $csf3r^{-/-}$ se usaron principalmente para el examen de los aspectos hematológicos. El número de ratones entregados de los ratones $csf3r^{-/-}$ fue bajo y aproximadamente la mitad del número de ratones entregados de los ratones de tipo silvestre ($csf3r^{+/+}$). Normalmente, los ratones $csf3r^{-/-}$ entregados no mostraron

diferencias significativas en el aspecto. Cuando se desarrollaron por completo, su tamaño corporal resultó ser ligeramente, pero significativamente inferior al de los ratones $csf3r^{+/+}$. Al parecer, el análisis histológico del músculo esquelético de los ratones $csf3r^{-/-}$ no reveló diferencias significativas en comparación con los ratones $csf3r^{+/+}$ (Fig. 5a). Sin embargo, cuando se examinaron las secciones de músculo esquelético, cada uno de los miocitos fue ligeramente, pero significativamente superior en los ratones $csf3r^{-/-}$ que en los ratones $csf3r^{+/+}$ (Fig. 5b). Por otro lado, el diámetro del recto femoral fue significativamente inferior al del tipo silvestre (Fig. 5c). Estos hallazgos sugieren que en el ratón $csf3r^{-/-}$, la proliferación del músculo esquelético se deteriora en la etapa de desarrollo y, en compensación, cada uno de los miocitos esqueléticos se vuelve hipertrófico.

Para determinar si el G-CSFR innato era necesario para la regeneración adecuada de los miocitos esqueléticos, se sometieron los ratones $csf3r^{-/-}$ a lesión del músculo esquelético inducida por cardiotoxina. Los ratones $csf3r^{-/-}$ sufrieron un deterioro de la regeneración del músculo esquelético el Día 7 y 14 después de la lesión inducida por cardiotoxina (Fig. 5d). El número de miocitos nucleares centrales del músculo esquelético en regeneración se redujo significativamente en los ratones $csf3r^{-/-}$, lo que sugiere que el G-CSFR era esencial para la regeneración del músculo esquelético (Figura 5e). Para confirmar que la acción de G-CSF estaba mediada por G-CSFR, se administró G-CSF a los ratones $csf3r^{-/-}$. Para ser más concretos, se administró G-CSF por vía tópica (100 μ l cada vez a una concentración de 50 μ g/ml) en los rectos femorales lesionados el Día 4 y 6. Si G-CSF actuara a través de otro receptor, G-CSF también debería mejorar la regeneración del músculo esquelético en ratones $csf3r^{-/-}$, pero una administración del G-CSF exógeno no pudo mejorar la regeneración del músculo esquelético (Figura 5f). Se midió el número de miocitos nucleares centrales en el músculo esquelético en regeneración para demostrar que la administración de G-CSF aumentó significativamente el diámetro del músculo regenerado en los ratones $csf3r^{+/+}$, pero que no fue eficaz en los ratones $csf3r^{-/-}$ (Fig. 5g). Se evaluó la recuperación funcional mediante la medición de la fuerza de agarre de los miembros anteriores. Incluso cuando se administró G-CSF, no se reconoció la recuperación funcional a los 5 y 7 días de la lesión del músculo esquelético (Fig. 5h).

EJEMPLO 7

Para probar la implicación de las células hematopoyéticas en el deterioro de la regeneración del músculo esquelético en ratones con G-CSFR desactivado, se trasplantó la médula ósea de ratones $csf3r^{+/+}$ que expresan constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP) a ratones $csf3r^{-/-}$ (Fig. 6a) 60 días antes de la lesión inducida por cardiotoxina. En todos los ratones, se comprobó mediante análisis de clasificación celular activado por fluorescencia (FACS) que las células de médula ósea se injertaron de forma estable lo suficiente para dar un quimerismo en exceso de al menos el 80 % (Fig. 6b). Se inyectó cardiotoxina en el recto femoral y se administró G-CSF (100 μ l cada vez a una concentración de 50 μ g/ml) en el Día 4 y 6. Tras la inyección de cardiotoxina, los ratones $csf3r^{-/-}$ trasplantados con la médula ósea de los ratones $csf3r^{+/+}$ no tuvieron ningún signo de mejora en un ensayo de fuerza de los miembros anteriores, incluso cuando se les administró G-CSF (Fig. 6c). El diámetro del recto femoral tampoco mejoró con G-CSF (Fig. 6d).

A continuación, los presentes inventores realizaron un experimento de trasplante de médula ósea de una manera inversa: se trasplantó la médula ósea de ratones $csf3r^{-/-}$ en ratones $csf3r^{-/-}$. Tras causar la lesión del músculo esquelético en estos ratones, se indujo la regeneración de los miocitos esqueléticos mediante G-CSF (Fig. 6e). Un ensayo de la fuerza de agarre de los miembros anteriores reveló que el G-CSF mejoró notablemente la fuerza de agarre de los miembros anteriores (Fig. 6f), y también se encontró que aumentó el diámetro del recto femoral (medido el Día 7) (Fig. 6g).

Los experimentos descritos anteriormente confirmaron que las células hematopoyéticas que expresan el receptor de G-CSF no son capaces de recuperar la capacidad de regeneración del músculo esquelético de los ratones con el receptor de G-CSF desactivado. Por lo tanto, los resultados anteriores han revelado que la acción de G-CSF en el proceso de regeneración del músculo esquelético es un efecto directo sobre el músculo esquelético y no está mediada por las células de médula ósea.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un factor estimulante de colonias de granulocitos para su uso en el tratamiento de la lesión muscular, donde el factor estimulante de colonias de granulocitos se va a administrar intramuscularmente en un período de 4 a 7 días después de la lesión muscular.
2. El factor estimulante de colonias de granulocitos para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la dosis de una sola administración es de 0,1-10 $\mu\text{g/kg}$.
- 10 3. El factor estimulante de colonias de granulocitos para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la dosis de una sola administración es de 0,5-5 $\mu\text{g/kg}$.
4. El factor estimulante de colonias de granulocitos para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la dosis de una sola administración es de 1-2,5 $\mu\text{g/kg}$.
- 15 5. El factor estimulante de colonias de granulocitos para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la dosis total que se va a administrar es de 0,2-50 $\mu\text{g/kg}$.
- 20 6. El factor estimulante de colonias de granulocitos para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde la dosis total que se va a administrar es de 1,0-25 $\mu\text{g/kg}$.
7. El factor estimulante de colonias de granulocitos para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, donde la dosis total que se va a administrar es de 2,0-12,5 $\mu\text{g/kg}$.

25

Figura 1

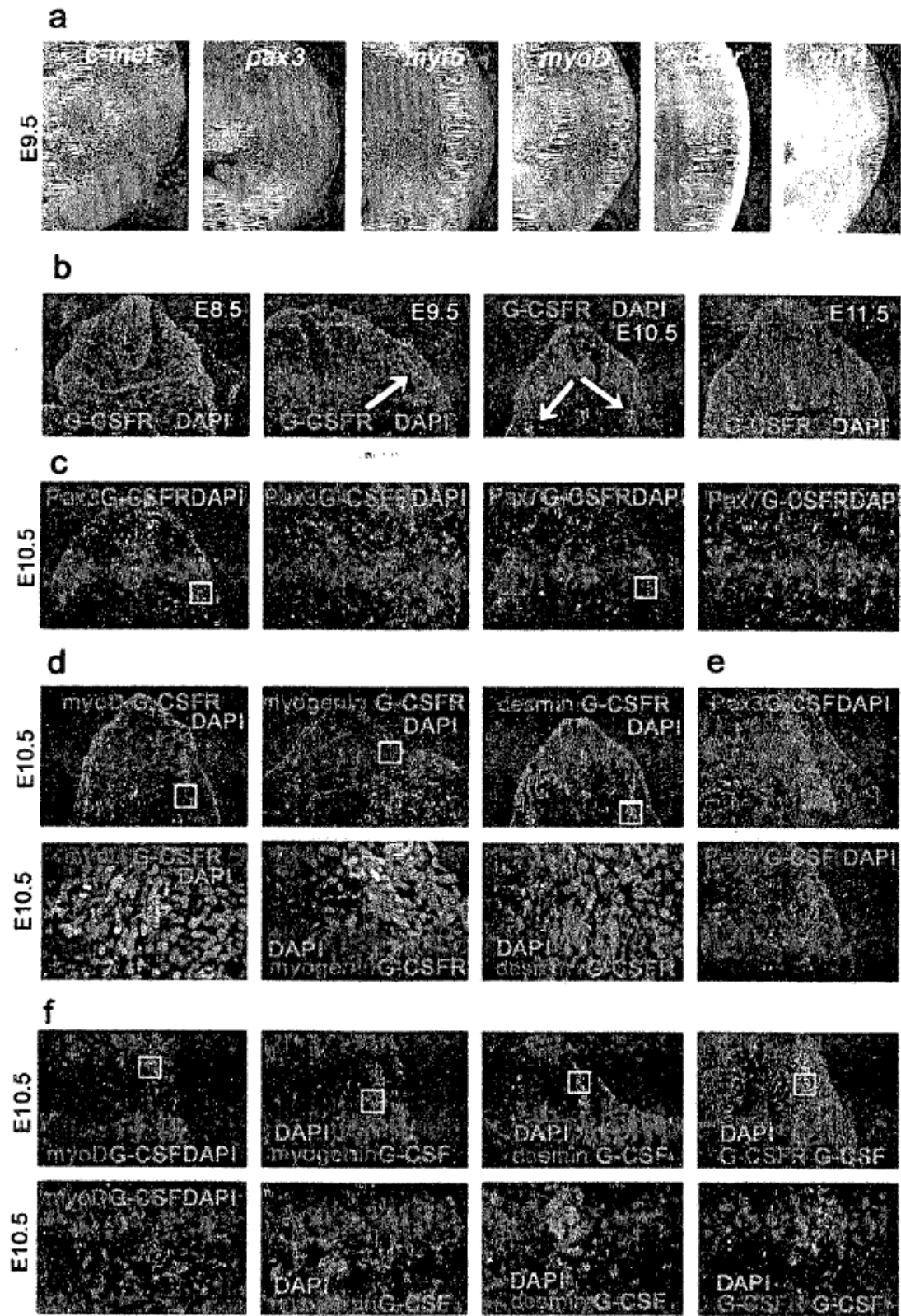


Figura 2

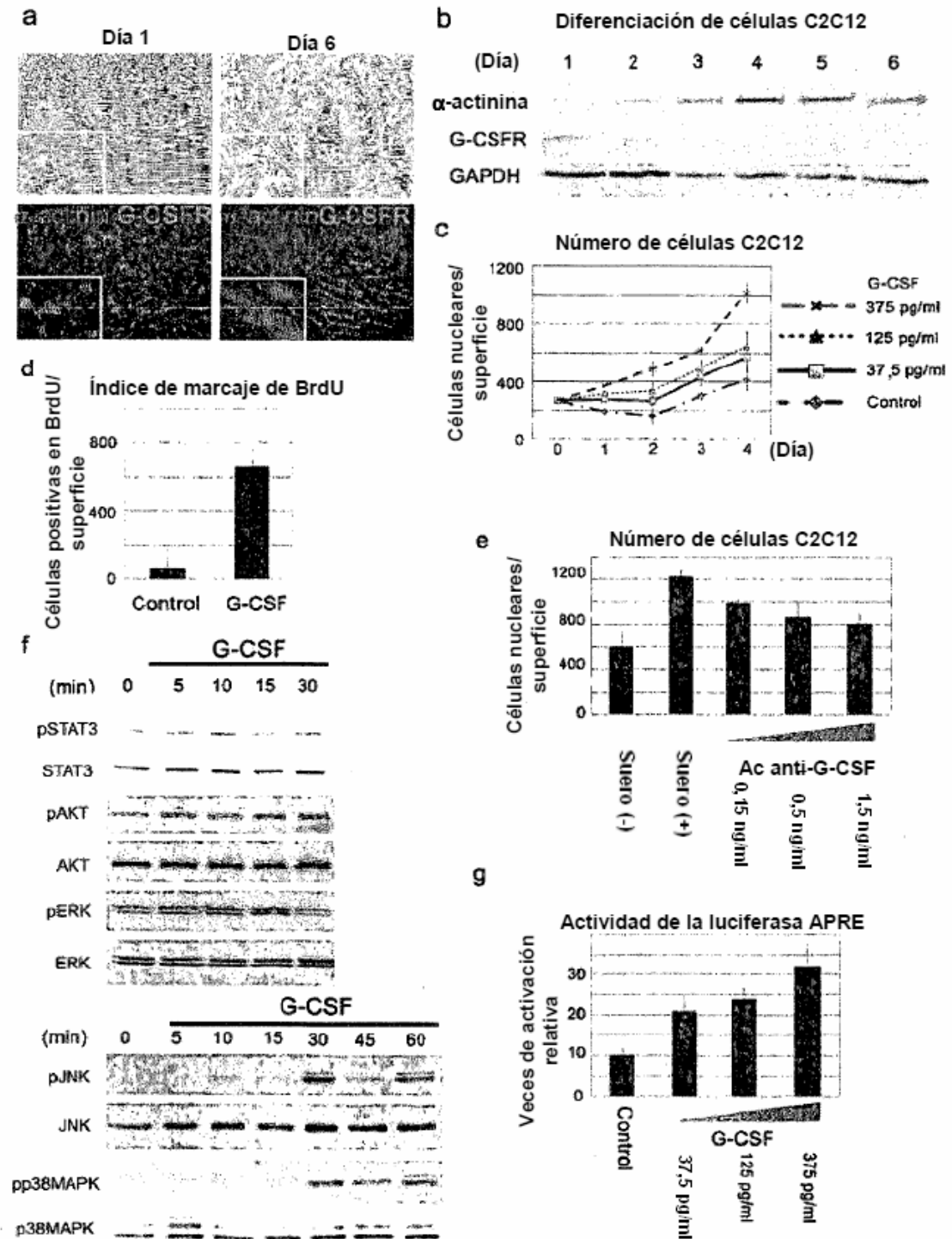


Figura 3

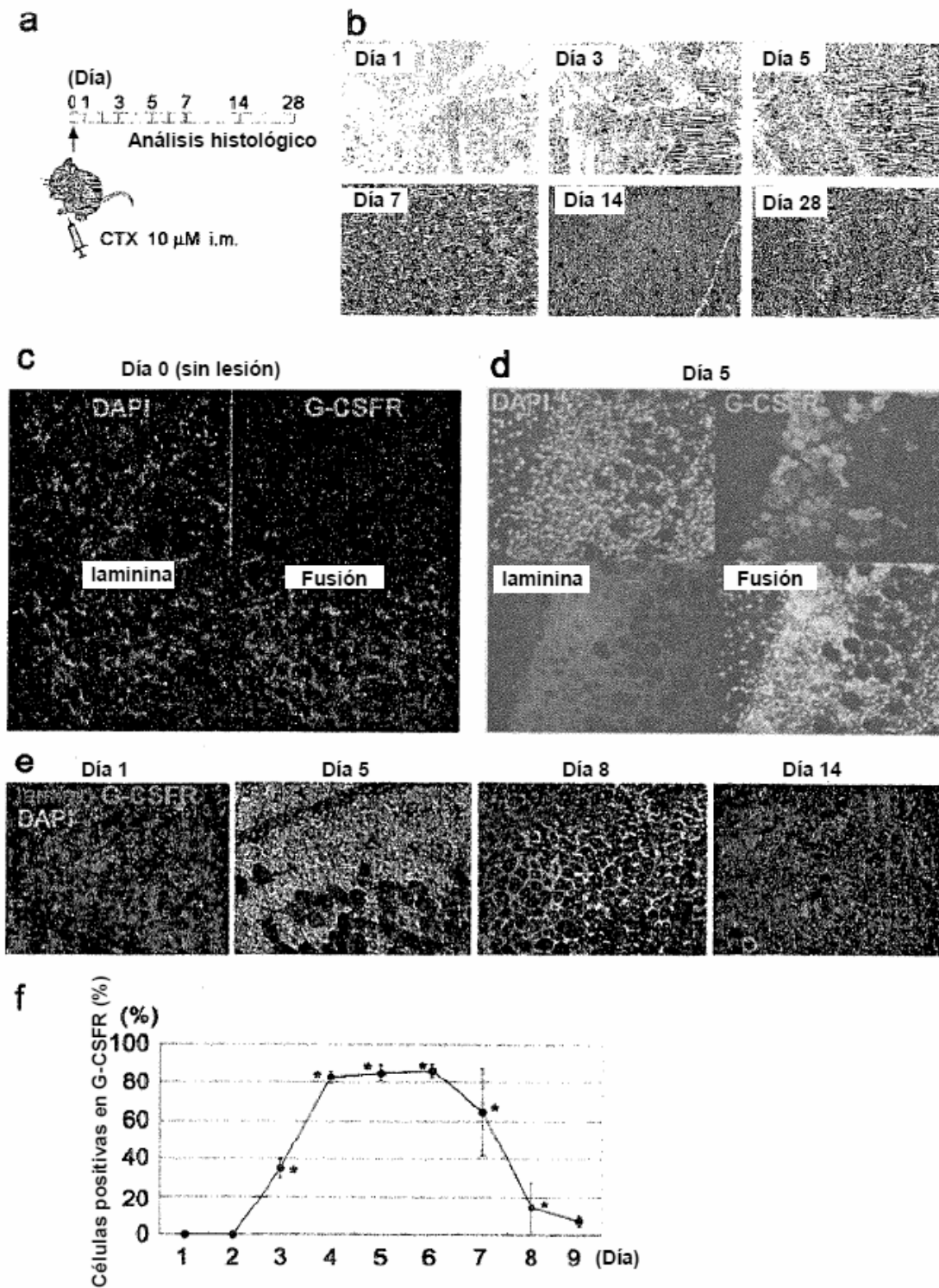


Figura 4

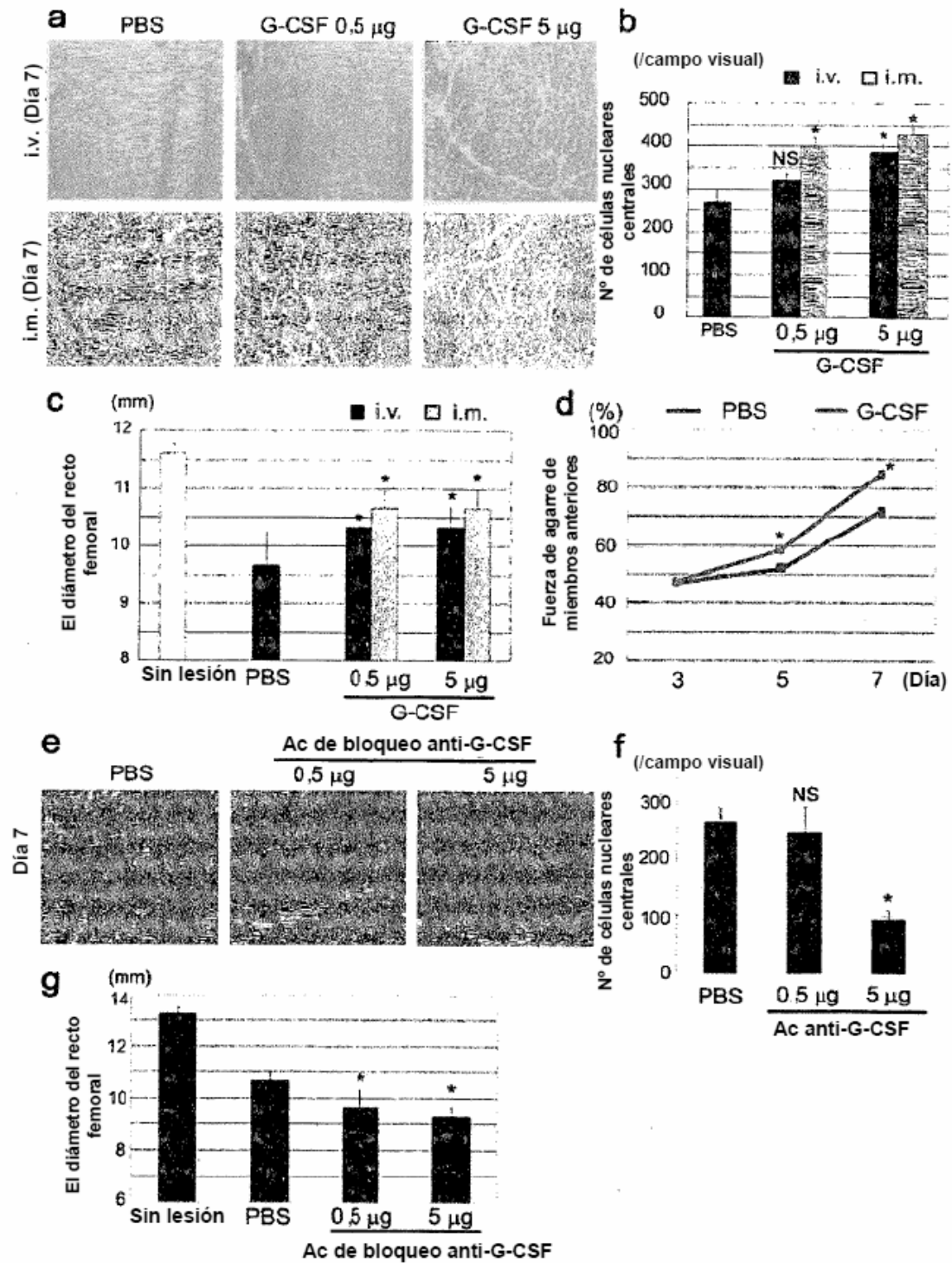


Figura 5

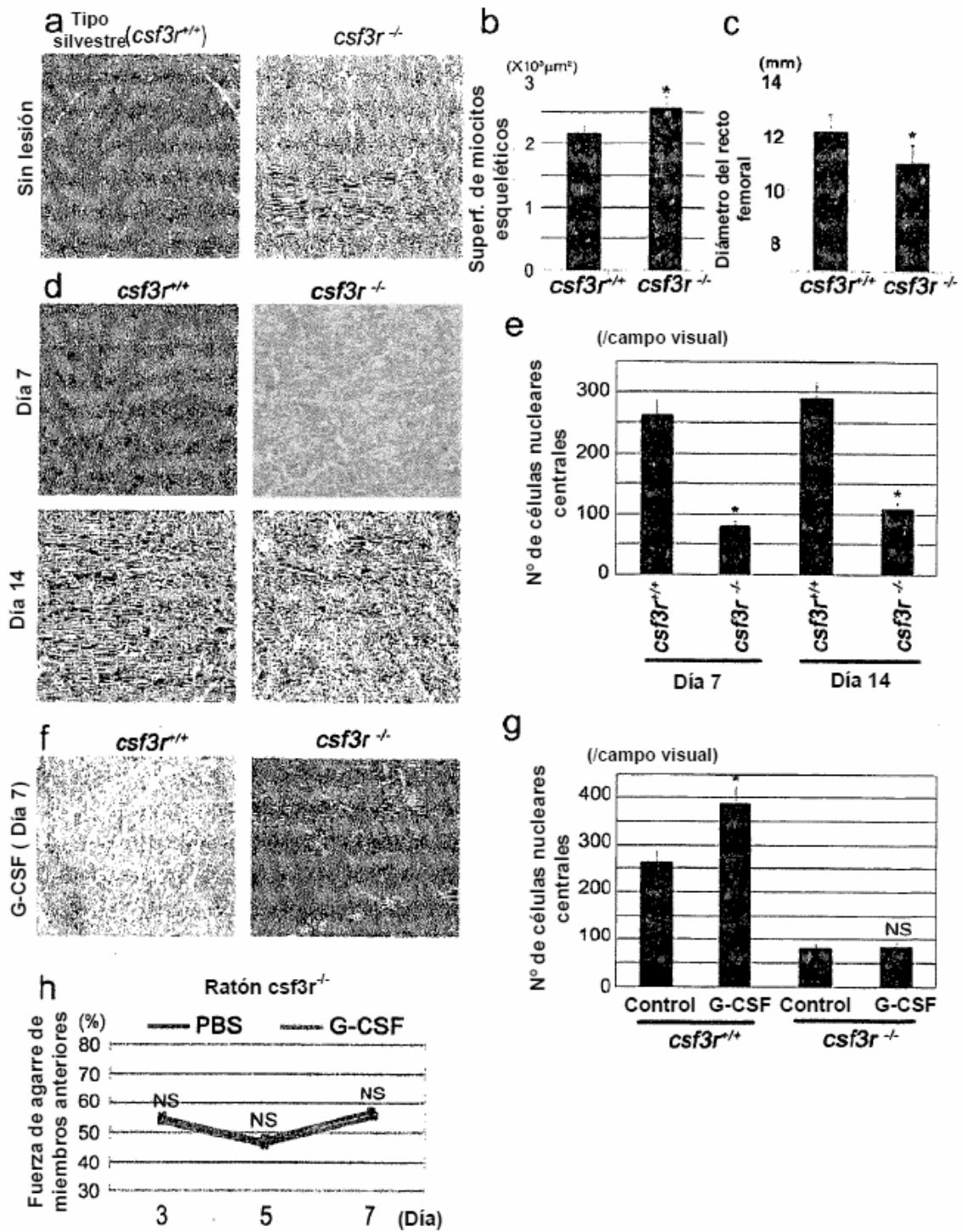


Figura 6

