

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 553**

51 Int. Cl.:

C12N 5/077 (2010.01)

A61K 35/34 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 35/16 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2013 E 13187352 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2837683**

54 Título: **Prevención y alivio de la enfermedad por trasplante de mioblastos humanos**

30 Prioridad:

16.08.2013 US 201313968982

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

07.06.2017

73 Titular/es:

**LAW, PETER K. (100.0%)
115 Glenarden Crescent
Richmond Hill, Ontario L4B 2L1, CA**

72 Inventor/es:

LAW, PETER K.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 615 553 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

Prevención y alivio de la enfermedad por trasplante de mioblastos humanos

Campo de la invención

5 Las realizaciones se refieren a la terapia del genoma humano de la enfermedad utilizando la terapia de transferencia de mioblastos.

Antecedentes de la invención

10 Peter K. Law demostró anteriormente que la transferencia de mioblastos en la distrofia muscular de Duchenne (DMD) producía distrofina (una proteína) y que la transferencia de mioblastos en el músculo cardíaco producía miosina pesada (otra proteína). Las patentes y publicaciones relacionadas se centraron en determinar la seguridad y eficacia del tratamiento de las distrofias musculares, la degeneración del músculo cardíaco y la diabetes.

15 El artículo publicado en una revista "Skeletal myoblast transplantation for attenuation of hyperglycemia, hyperinsulinaemia and glucose intolerance in a mouse model of type 2 diabetes mellitus" de L. Ye et al. en Diabetologia (2009) 52, páginas 1925-1934, describe la demostración de la viabilidad y la eficacia del trasplante intramuscular de mioblastos esqueléticos humanos (hSkM) para la atenuación de la hiperglucemia y la mejora de la sensibilidad a la insulina utilizando un modelo de ratón de diabetes mellitus tipo 2. Este estudio demostró que este enfoque puede ser una posible alternativa de tratamiento para la diabetes mellitus tipo 2.

20 El artículo publicado en una revista "Myogenic stem cells: regeneration and cell therapy in human skeletal muscle" de E. Negroni et al. en Pathologie Biologie (2006) 54, páginas 100-108, describe que el músculo esquelético humano ha sido considerado como una diana ideal para la terapia celular. Sin embargo, los resultados positivos obtenidos en modelos animales distróficos utilizando la población de células satélite precursoras residentes han sido seguidos por evidencias desalentadoras obtenidas en los ensayos clínicos con pacientes con distrofia muscular de Duchenne. Se han revisado los avances recientes y se ha visto que muchos grupos han logrado identificar a los potenciales candidatos del compartimiento de células madre para la terapia celular. Las células madre con potencial miogénico están en el foco, las cuales podrían mejorar la eficiencia del trasplante y, por tanto, podrían ser utilizadas como una herramienta terapéutica para las enfermedades neuromusculares.

25 El artículo publicado en una revista "Myoblast Transplantation: A Possible Surgical Treatment for a Severe Pediatric Disease" de B. Palmieri et al. en Surgery Today (2010) 40, páginas 902-908 presenta que la distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad genética huérfana recesiva ligada al cromosoma X que afecta a aproximadamente a 1 de cada 3.500 nacimientos de varones. Los niños con DMD tienen destrucción progresiva y predecible de los músculos debido a la ausencia de distrofina, una proteína presente debajo de la membrana de la fibra muscular. Esta ausencia induce daño de la membrana relacionado con la contracción y la activación de la necrosis y fibrosis inflamatoria, lo que lleva a insuficiencia cardíaca/diafragmática y muerte. En esta revisión, se respalda la función terapéutica del trasplante de mioblastos en la DMD y se describen los antecedentes y el fundamento de este enfoque.

35 En la Reunión Anual de la Sociedad de Neurociencias, vol. 18, N.º 1/02, 25 de octubre de 1992, en la página 730, XP 00061045 del artículo titulado "Myoblast Transfer Therapy (MTT) Strengthens Leg Muscles of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) Boys", de P. K. Law et al., se describe la evaluación de la viabilidad, seguridad y eficacia de la fase II de la MTT. Se realizaron estudios en niños con DMD con edades comprendidas entre los 6 y 14 años. Los resultados indicaron que la MTT es segura y aumenta la fuerza muscular. Más de 5 mil millones de mioblastos pueden cultivarse a partir de 1 g de biopsia muscular normal, proporcionando un número sin precedentes de células para la MTT. Los mioblastos congelados durante más de un año, conservan su capacidad de proliferar de 10 millones a 5 mil millones y de formar fibras musculares normales. Las inyecciones de 5 mil millones de mioblastos no han provocado ningún síntoma de rechazo inmunológico en los sujetos de la Fase II. Las inyecciones múltiples son seguros para llevar a cabo en los músculos de las extremidades inferiores sin formación de émbolos. El rechazo de células del donante por el receptor se puede prevenir con ciclosporina cuando se administra correctamente.

45 La patente US-5.139.481 describe un procedimiento para el tratamiento de la resistencia a la insulina en un paciente, que comprende el aislamiento de una célula de músculo esquelético de un donante sensible a la insulina y el trasplante de dicha célula del músculo esquelético en dicho paciente resistente a la insulina.

50 El artículo publicado en una revista "Problems and solution in myoblast transfer therapy" de G. M. Smythe et al. en J. Cell. Mol. Med. (2001) 5(1), páginas 33-47, describe que la caracterización y clonación del gen de la distrofina en 1987 fue un avance importante y se consideró que la simple sustitución de gen de la distrofina mejoraría el grave y progresivo deterioro muscular característico de la distrofia muscular de Duchenne. Después de 20 años, los intentos de reemplazar el gen de la distrofina de forma experimental o clínicamente han tenido poco éxito, pero ha habido muchos avances significativos en la comprensión de los factores que limitan la administración de un gen normal de la distrofina en el músculo distrófico del hospedador. En esta revisión, la respuesta inmunitaria del hospedador y los cambios en los mioblastos del donante subyacen a algunos de los principales problemas asociados con la sustitución de la distrofina mediada por mioblastos, se presentan posibles soluciones y se describen otros enfoques

terapéuticos nuevos.

La solicitud de patente internacional WO 96/18303 describe un procedimiento de tratamiento de afecciones patológicas de mamíferos que son hereditarias, degenerativas, debilitantes, mortales o no deseables, que comprende las etapas de cultivar un suministro de células miogénicas que son normales, transducidas genéticamente o convertidas fenotípicamente, comprendiendo las células miogénicas mioblastos, miotubos, fibras de músculo joven y tipos de células convertidas; administrar una dosis terapéuticamente efectiva de un inmunosupresor al hospedador y, por consiguiente, seleccionar y administrar de dicho suministro una dosis terapéuticamente eficaz de células miogénicas o células convertidas a partir de células miogénicas al hospedador, con lo cual el tejido/tamaño de los órganos, forma y/o función se mejoran y/o se previene, alivia o elimina la afección o afecciones patológicas.

La patente US-5.130.141 describe un procedimiento de tratamiento de la degeneración y la debilidad muscular en un hospedador, que comprende las etapas de cultivar células miogénicas genéticamente normales de donantes para producir un suministro de las células miogénicas que comprende mioblastos, miotubos y células de fibras musculares jóvenes; administrar una dosis terapéuticamente efectiva de un inmunosupresor al hospedador y posteriormente, seleccionar y administrar de dicho suministro una dosis terapéuticamente eficaz de células miogénicas a al menos un músculo miopático del hospedador, con lo que se mejoran las funciones musculares, los patrones locomotores y las funciones respiratorias.

La solicitud de patente internacional WO 2004/017972 A1 describe un procedimiento para la renovación de la piel de un individuo que comprende las etapas: a) eliminar células muertas de la superficie de la piel para generar una superficie preparada; b) aplicar mioblastos a la superficie de la piel preparada en una solución nutritiva de células de mioblastos.

El artículo publicado en una revista "Systemic Delivery of Allogenic Muscle Stem Cells Induces Long-Term Muscle Repair and Clinical Efficacy in Duchenne Muscular Dystrophic Dogs" de K. Rouger et al. en The American Journal of Pathology (2011) 179(5), páginas 2501-2518, describe la caracterización de células madre de adhesión retardada caninas y la investigación de la eficacia de su administración sistémica en el modelo animal de DMD clínicamente relevante para evaluar la potencial aplicación terapéutica en seres humanos. Las células madre de adhesión retardada, denominadas células MuStem (células madre musculares), se aislaron a partir de músculo perro sano usando una técnica de presembrado. In vitro, las células MuStem mostraban una gran capacidad de expansión, la capacidad de proliferar en suspensión y un potencial de diferenciación multilineaje. Fenotípicamente, se correspondían a los progenitores miogénicos iniciales y a las células no comprometidas. Cuando se inyectaban en perros distróficos inmunosuprimidos, contribuían a la regeneración miofibrilar, la reposición de células satélite y la expresión de distrofina. Es importante destacar que su administración sistémica tuvo como resultado la expresión de distrofina a largo plazo, la limitación de la evolución del daño muscular con un aumento de la actividad de regeneración y una restricción de la expansión intersticial y la persistencia de la estabilización del estado clínico del perro. En este artículo de revista, se describió que estos resultados demuestran que las células MuStem podrían proporcionar una vía terapéutica atractiva para los pacientes con DMD.

Estos trabajos se basaron en el aumento de la fuerza muscular, más fibras musculares, una mejor estructura de la célula y la reposición de proteínas como criterios de valoración de control. Sin embargo, no se identificó ningún mecanismo genético/bioquímico subyacente que se pudiera utilizar para mejorar la terapia o utilizar como herramientas para la identificación y selección de agentes profilácticos o terapéuticos tales como agentes de trasplante de células o prototipos de fármacos. Por el contrario estos estudios indicaron que sus efectos actuaban a través de la supervivencia de las células de los donantes, el desarrollo y funcionamiento per se. La transcripción y traducción de los genes que conducen a la reparación genética no se ha abordado con seriedad en la profilaxis y el tratamiento clínico de la enfermedad.

Una enfermedad importante es la diabetes. La diabetes es la principal causa de insuficiencia renal y amputaciones de miembros inferiores no traumáticas entre los adultos del mundo. Se ha estimado que en 2010, en los Estados Unidos se han gastado 198 mil millones de dólares en el tratamiento de la diabetes¹. Se estima que 285 millones de adultos tenían diabetes de Tipo II, lo que representa aproximadamente el 90 % de los casos de diabetes en 2010². La diabetes afecta a ~ 25 % de la población occidental y aumenta de manera constante³ y es un importante factor de riesgo de enfermedad cardiovascular⁴. Los estudios epidemiológicos y en gemelos han indicado claramente un factor poligenético importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina, una característica clave de la diabetes de Tipo II, que también estuvo influenciado por factores ambientales^{5,6}.

Estudios previos demostraron la importancia del músculo esquelético en el desarrollo de resistencia a la insulina. Los ratones con Glut-4 específico del músculo desactivado eran resistentes a la insulina e intolerantes a la glucosa desde una edad temprana⁷. Un defecto aislado en la proteína quinasa C-λ en el músculo induciría obesidad abdominal y otras anomalías metabólicas⁸. Por el contrario, la inactivación de LKB1 específica del músculo (una serina/treonina quinasa que es un regulador negativo de la sensibilidad a la insulina) aumentaba la sensibilidad a la insulina y mejoraba la homeostasis de la glucosa⁹. Estos estudios sugieren que los defectos en el transporte de la glucosa del músculo esquelético pueden ser factores clave en el desarrollo de la resistencia a la insulina.

Se produjo una hiperglucemia e hiperinsulinemia atenuada y una mejor tolerancia a la glucosa del ratón KK con xenotrasplantes de mioblastos esqueléticos humanos (hSkMs)¹⁰. Los mioblastos esqueléticos son células mononucleadas precursoras del músculo capaces de fusionarse con las fibras musculares de diferentes tipos y desarrollarse en el fenotipo del hospedador¹¹. Mediante fusión natural con fibras de músculo esquelético de ratón KK, los mioblastos humanos implantados formaron fibras musculares híbridas en el ratón KK.

A pesar de que este trabajo se realizó en la diabetes, nadie ha identificado ninguna alteración subyacente del transcrito de genes de múltiples genes o genomas. De hecho, las enseñanzas y conclusiones de estos trabajos indicaban que cualquier mejora encontrado podría ser el resultado de la supervivencia de las células del donante, el desarrollo y el funcionamiento sin reparación genética. En consecuencia, cualquier nueva información y modalidades de tratamiento en esta área que vaya más allá de este conocimiento básico puede proporcionar un beneficio incalculable a la profilaxis y el tratamiento clínico de la enfermedad

Sumario de la invención

Se han producido algunos avances en la terapia de trasplante de músculo a lo largo de los años, comenzando con el trabajo fundamental de Peter K. Law. Sin embargo, no ha habido ningún conocimiento específico o entendimiento de que los síntomas de diversas enfermedades pudieran aliviarse mediante cambios en la calidad y cantidad de los transcritos directos de múltiples genes. En una realización descrita en este documento, se ha demostrado sorprendentemente, por primera vez que los cambios en la cantidad y calidad de las transcripciones directas de múltiples genes, podría tener como resultado un alivio de la enfermedad utilizando un modelo animal genéticamente anormal de la diabetes de Tipo II.

Se encontró sorprendentemente que la transferencia de mioblastos en los músculos de diabéticos Tipo II produce cambios en los transcritos de genes (no proteína) en múltiples vías relacionadas con la resistencia a la insulina. Si unimos el desarrollo de la tecnología de transferencia de mioblastos en la DMD, la cardiomiopatía y la diabetes de Tipo II, este descubrimiento demuestra inesperadamente que la transferencia de mioblastos media su efecto a través de la transferencia de los núcleos de mioblastos normales que suministran el genoma humano completo, además de reponer simplemente el gen o genes aberrantes que faltan. Los genes de reemplazo se transcriben a continuación para producir las proteínas o factores necesarios para la reparación genética. Se encontró un variedad de usos de este descubrimiento, incluido el tratamiento de la enfermedad, la prevención de enfermedades, el descubrimiento de fármacos y la selección de células superiores y los clones para la terapia.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Comparación de los niveles de transcritos de genes de la vía de señalización de la insulina en los grupos KK hSkM, KK control y KK fibroblasto en ayunas.

Figura 2. Comparación de los niveles de transcritos de genes mitocondriales en los grupos KK hSkM, KK control y KK fibroblasto en ayunas.

Tratamiento y prevención de enfermedades

En general, los síntomas de la DMD, de la cardiomiopatía y de la diabetes de Tipo II se pueden prevenir y aliviar.

Un procedimiento de tratamiento de la diabetes de Tipo II en un paciente en necesidad del mismo puede comprender por ejemplo: determinar o verificar el estado de la diabetes de Tipo II del paciente; suministrar un genoma humano completo al paciente a través de la transferencia de núcleos de mioblastos, que comprende las etapas de: a. cultivar un suministro de mioblastos de una biopsia muscular de un donante que es genéticamente normal con respecto a la sensibilidad a la insulina; b. administrar una dosis terapéuticamente efectiva de un inmunosupresor al paciente; c. a continuación, seleccionar y administrar del suministro una dosis terapéuticamente eficaz de mioblastos a al menos un músculo del paciente, d. permitir la inserción de los núcleos de mioblastos del donante, cada uno de los cuales contiene un complemento completo de genes normales, en las células musculares genéticamente anormales del paciente para efectuar la reparación por complementación genética y e. permitir que los mioblastos del donante se fusionen entre sí para formar fibras musculares genéticamente normales; mediante lo cual se mejora la homeostasis del músculo mediada por glucosa, siendo detectable mediante la medición de una mejora en el estado de la diabetes de Tipo II del paciente.

Los mioblastos cultivados pueden ser más histoincompatibles con el paciente y derivar de un donante genéticamente normal. El donante puede por ejemplo ser seleccionado de un grupo genéticamente normal, incluyendo, pero sin limitarse al padre o a un hermano varón del hospedador.

Los mioblastos cultivados se pueden obtener de la biopsia muscular del paciente antes de que el paciente haya desarrollado diabetes de Tipo II. La medición de la mejora en el estado de la diabetes de Tipo II del paciente puede llevarse a cabo mediante la detección de cambios en la cantidad o calidad de los transcritos directos de múltiples genes que proporcionan alivio de los síntomas de la enfermedad.

La dosis terapéuticamente eficaz de los mioblastos cultivados puede ser por ejemplo aproximadamente 50 mil

millones de células para la diabetes de Tipo II y esta dosis puede administrarse en aproximadamente 100 millones de células por ml. El inmunosupresor puede comprender ciclosporina administrada por vía oral a 5-7 mg/kg de peso corporal por día, comenzando cinco días antes de la implantación de los mioblastos y eliminándose completamente a las tres semanas después de la operación. El nivel valle de ciclosporina en sangre total puede controlarse semanalmente y reajustarse la dosis de ciclosporina según sea necesario para mantener un nivel en sangre de aproximadamente 250 ng/ml hasta la última semana cuando comienza la eliminación.

Un procedimiento de prevención de la diabetes de Tipo II en un paciente, puede comprender, por ejemplo: revisar el estado potencial de la diabetes de Tipo II del paciente; suministrar un genoma humano completo al paciente a través de la transferencia de núcleos de mioblastos, que comprende las etapas de: a. cultivar un suministro de mioblastos de una biopsia muscular de un donante que es genéticamente normal con respecto a la sensibilidad a la insulina; b. administrar una dosis terapéuticamente efectiva de un inmunosupresor al paciente; c. a continuación, seleccionar y administrar del suministro una dosis terapéuticamente eficaz de mioblastos a al menos un músculo del paciente, d. permitir la inserción de los núcleos de mioblastos del donante, cada uno de los cuales contiene un complemento completo de genes normales, en las células musculares genéticamente anormales del paciente.

Un procedimiento de tratamiento de una enfermedad genética en un hospedador mediante el suministro de un genoma completo de la especie del hospedador a través de la transferencia de núcleos de mioblastos, puede comprender, por ejemplo, las etapas de: a. cultivar un suministro de mioblastos genéticamente normales de una biopsia muscular de un donante genéticamente normal; b. administrar una dosis terapéuticamente efectiva de un inmunosupresor al paciente; c. a continuación, seleccionar y administrar de dicho suministro una dosis terapéuticamente eficaz de mioblastos a al menos un músculo del hospedador, d. permitir la inserción de los núcleos de mioblastos del donante, cada uno de los cuales contiene un complemento completo de genes normales, en las células musculares anormales del paciente para efectuar la reparación por complementación genética y e. permitir que los mioblastos del donante se fusionen entre sí para formar fibras musculares genéticamente normales; llevándose a cabo la detección de la mejora en el hospedador, incluyendo la capacidad locomotora, la eyección/vascularización sanguínea y la transferencia de sustancias bioquímicas o iones a través de la membrana de la célula muscular.

Uso en el descubrimiento de fármacos

Una realización preferida proporciona un ensayo de descubrimiento de fármacos para seleccionar un fármaco prototipo para la terapia con mioblastos de la diabetes de Tipo II que comprende la detección de un aumento de la transcripción de genes de uno o más de un grupo de 22 genes implicados en la vía de señalización de la insulina o de uno o más de un grupo de 27 genes implicados en la biogénesis y la función mitocondrial, en la que el gen es uno o más seleccionados del grupo que consiste en Bcl211, Cox10, Cpt1b, Slc25a22, Slc25a25, Stard3, Timm17b, y Tomm40 o el gen es uno o más seleccionados del grupo que consiste en Acaca, Aebp1, Cfd, Gpd-1, Jun, PPARgamma, Ptpn1 y UCP1.

En una realización, los transcritos de ARN se someten a ensayo y la presencia o cantidad de la transcripción de ARN se utiliza para seleccionar un fármaco prototipo con expectativas clínicas o para su uso en la profilaxis de la diabetes de Tipo II o el alivio de los síntomas. En otra realización, se usa un bioensayo de la actividad de producto de transcripción del gen para seleccionar el fármaco prototipo.

Estos genes, transcritos de genes y proteínas producidos a partir de ellos se pueden detectar mediante una amplia variedad de procedimientos como fácilmente apreciará un experto en la materia. El descubrimiento y desarrollo de fármacos implica la identificación y selección de los marcadores clave. Aunque se sabe que en la vía de señalización de la insulina y en la biogénesis y función mitocondrial están implicados diferentes genes, las realizaciones proporcionan un conjunto más valioso de genes que sorprendentemente se ha visto que es más valioso en el contexto de terapia con mioblastos y se prefieren. La expresión preferencial de un gen mencionado anteriormente es particularmente preferido para la selección de compuestos prototipo plomo en el descubrimiento de fármacos destinados a la prevención o tratamiento de la diabetes de Tipo II.

Otra realización proporciona un procedimiento de selección realizado en modelos animales no humanos genéticamente obesos de la diabetes de Tipo II para el descubrimiento de un fármaco o candidato para la terapia con mioblastos útil para el tratamiento de la diabetes, que comprende la exposición de un compuesto de ensayo a un grupo de mioblastos in vitro, ex vitro, o in vivo, ensayando la actividad génica de uno o más de un gen seleccionado del grupo que consiste en Bc1211, Cox10, Cpt1b, S1c25a22, S1c25a25, Starch3, Timm17b y Tomm40, o del grupo que consiste en Acaca, Aebp1, Cfd, Gpd- UCP1 y usando un resultado positivo de la actividad génica para determinar el valor del compuesto de ensayo para el tratamiento de diabetes. En una realización, el procedimiento comprende la detección de transcritos de genes. En una realización, el procedimiento comprende la detección de la actividad de una proteína traducida del transcrito del gen. En una realización, el procedimiento comprende la detección inmunológica de una proteína traducida del gen transcrito.

Suministro del genoma mediante inyección de células

Anteriormente, los trabajadores en este campo, invariablemente inyectaban células en pacientes usando una

solución salina y otro medio definido o parcialmente definido como la solución de vehículo. El inventor encontró sorprendentemente que la inyección de mioblastos utilizando el suero del hospedador promovía la supervivencia y el desarrollo de las células. Se prefiere el suero coagulado debido a la facilidad de preparación, aunque también se contempla el suero con factores de angiogénesis añadidos y el uso del plasma del paciente como medio para las células inyectadas.

Se encontró que una concentración celular alta del inyectado, 100 millones de células por ml, mejora la fusión y el desarrollo de células después de la inyección. La técnica preferida es el tratamiento de la parte inferior corporal para los pacientes jóvenes como niños con DMD entre 5 a 12 años y el tratamiento de la parte superior corporal para los pacientes mayores como niños con DMD entre 12 a 18 años. El más preferido es el tratamiento de todo el cuerpo ("WBT") en los pacientes con edades entre 5 y 18 años. El WBT es el más preferido para los pacientes con diabetes de Tipo II de todas las edades. El WBT implica la inyección de 50 mil millones de mioblastos en 80 grupos musculares grandes del paciente.

Para la inyección se pueden usar células de volumen de tamaño más pequeño para proporcionar una mayor relación entre el ADN y la masa celular. Los tamaños de las células de diámetro promedio preferidos son 7 a 10 μm . El tamaño medio de célula puede ser 12 μm o menos y puede ser tan solo de 7 μm . Una suspensión de células en un medio de proteínas de la sangre del paciente, tal como suero o plasma, se puede proporcionar, por ejemplo, para su uso en un procedimiento de tratamiento de la diabetes de Tipo II en un paciente en necesidad del mismo, comprendiendo el procedimiento: determinar o verificar el estado de la diabetes de Tipo II del paciente; suministrar un genoma humano completo al paciente a través de la transferencia de núcleos de mioblastos, que comprende las etapas de: a. cultivar un suministro de mioblastos de una biopsia muscular de un donante que es genéticamente normal con respecto a la sensibilidad a la insulina; b. administrar una dosis terapéuticamente efectiva de un inmunosupresor al paciente; c. a continuación, seleccionar y administrar del suministro una dosis terapéuticamente eficaz de mioblastos a al menos un músculo del paciente, d. permitir la inserción de los núcleos de mioblastos del donante, cada uno de los cuales contiene un complemento completo de genes normales, en las células musculares genéticamente anormales del paciente para efectuar la reparación por complementación genética y e. permitir que los mioblastos del donante se fusionen entre sí para formar fibras musculares genéticamente normales; mediante lo cual se mejora la homeostasis del músculo mediada por glucosa, siendo detectable mediante la medición de una mejora en el estado de la diabetes de Tipo II del paciente. Dichas suspensiones, sin embargo, se pueden suministrar para otros métodos detallados en el presente documento.

Marcadores para la selección de células utilizadas en la terapia de trasplante

Sorprendentemente, se descubrió que los mioblastos, que exhiben actividades de transcripción inusualmente elevadas de ciertos genes proporcionan un beneficio superior para la terapia con mioblastos de la diabetes de Tipo II. En particular, dicha expresión génica se puede utilizar para la selección de células para la clonación y para el cultivo para proporcionar preparaciones de células mejoradas para la terapia. La detección de la actividad del producto de transcripción del gen se puede utilizar para seleccionar la mejor célula o cultivo de células. En una realización preferida, el gen es uno o más seleccionado del grupo que consiste en Bcl211, Cox10, Cpt1b, Slc25a22, Slc25a25, Stard3, Timm17b, and Tomm40 o el gen es uno o más seleccionado del grupo que consiste en Acaca, Aebp1, Cfd, Gpd-1, Jun, PPARgamma, Ptpn1 y UCP1. Estos genes, transcritos de genes y proteínas producidos a partir de ellos se pueden detectar mediante una amplia variedad de procedimientos como apreciará fácilmente un experto en la materia.

Composiciones y preparaciones de composiciones

En particular, la presente invención se refiere a una composición que comprende una cantidad de suministro de mioblastos genéticamente normales cultivados que suministran un genoma completo de la especie del hospedador para su uso en el tratamiento de una enfermedad genética en un hospedador, en el que esta comprende los mioblastos en el suero del hospedador. En una realización preferida, la enfermedad genética es la diabetes de Tipo II.

En una realización preferida, el suero del hospedador es suero coagulado.

El diámetro medio de los tamaños de las células es preferentemente 12 μm o menos, se prefieren particularmente 7 a 10 μm .

En otra realización, la dosis de los mioblastos cultivados es de aproximadamente 50 mil millones de células para su uso en el tratamiento y/o prevención de la distrofia muscular y para su uso en el tratamiento y/o prevención de la diabetes de Tipo II, administrándose dicha dosis a una dosis de aproximadamente 100 millones de células por ml de suero del hospedador.

Una dosis de aproximadamente mil millones de células para su uso en el tratamiento de la miocardiopatía también se puede administrar en dosis de aproximadamente 100 millones de células por ml de suero del hospedador.

En una realización, los mioblastos cultivados son histoincompatibles con el hospedador y en la que el hospedador se trata previamente con un inmunosupresor que comprende ciclosporina. El donante del que se obtienen se puede

seleccionar de un grupo genéticamente normal, incluyendo, pero sin limitarse al padre o hermanos varones del hospedador. Además, se puede haber obtenido una biopsia de músculo del donante antes de ser miopático el hospedador.

- 5 En una realización, un ensayo de descubrimiento de fármacos se utiliza para seleccionar un prototipo para la terapia con mioblastos de la diabetes de Tipo II que comprende la detección de aumento de la transcripción génica, en la que el gen es uno o más seleccionados del grupo que consiste en Bcl211, Cox10, Cpt1b, Slc25a22, Slc25a25, Stard3, Timm17b y Tomm40 o el gen es uno o más seleccionados del grupo que consiste en Acaca, Aebp1, Cfd, Gpd-1, Jun, PPARgamma, Ptpn1 y UCP1.

Ejemplo: Implantación intramuscular de mioblastos esqueléticos humanos (hSkM)

- 10 Este ejemplo muestra un perfil de expresión génica subyacente de la vía de señalización de la insulina, la biogénesis y la función mitocondrial, y demuestra el efecto de la aplicación según se reivindica en realizaciones en el presente documento.

- 15 Ratones KK diabéticos se dividieron en tres grupos: grupo KK control con inyección de medio basal (M199); grupo KK fibroblastos con trasplante de fibroblastos humanos; grupo de KK mioblastos con el trasplante de hSkM. Ratones C57BL recibieron trasplante de hSkM como un control normal. Las células fueron trasplantadas en los músculos de las extremidades traseras. Todos los animales fueron tratados con ciclosporina solamente durante 6 semanas. Se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa. Los ratones se sacrificaron en un estado de ayuno a las 12 semanas después del trasplante celular. Los músculos implantados se retiraron y se procesaron para el estudio de perfiles de expresión génica.

- 20 **Animales y dietas** – Los ratones KK fueron adquiridos de Jax Lab, Maine, EE.UU.. Se trata de un modelo de animal genéticamente obeso de la diabetes de Tipo II y se caracteriza por hiperglucemia, hiperinsulinemia e intolerancia a la glucosa¹². Estos eran aproximadamente un 34 % más pesados que el ratón C57BL a las 14-16 semanas de edad¹⁰. Los animales fueron alojados individualmente en jaulas de plástico en una habitación con aire acondicionado a 25 °C con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (luz: de 9:00 am a 9:00 pm) y libre acceso a los alimentos (PMI 5K52 Nutrition International LLC, EE.UU.) y al agua (agua del grifo). A la edad de 14-16 semanas, se estudió la hiperglucemia de los ratones y se usó para el experimento. Se utilizaron los ratones KK que cumplían los siguientes criterios: (1) glucosa sanguínea en ayunas > 6,5 mmol/l y (2) glucosa sanguínea > 20 mmol/l a los 30 min o 60 min y > 11 mmol/l a las 2 horas durante GTT¹⁰.

- 30 **Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT)** – A todos los ratones utilizados en el estudio se les realizó la GTT. Después de ayuno durante la noche (aproximadamente 16 horas), el ratón se inyectó intraperitonealmente (*i.p.*) con 1 g/kg de peso corporal de glucosa diluida en agua destilada (100 mg/ml). Las muestras de sangre de la vena de la cola se recogieron a los 0 (antes de la inyección de glucosa), 30, 60 y 120 min después de la inyección de glucosa. La concentración de glucosa en sangre se determinó con el glucómetro Accu-Chek Advantage (Roche, Alemania).

- 35 **Cultivo de hSkM y fibroblastos humanos** – Se cultivaron mioblastos esqueléticos humanos y se propagaron en matraces de cultivo de tejidos de 225 mm² y se mantuvieron con M199 suplementado con suero fetal bovino 10 %, 10 ng/ml de FGF (M199 10 %) a 37 °C en una incubadora de CO₂ 5 % hasta la confluencia. La pureza y la uniformidad del cultivo de hSkM se evaluaron para determinar la expresión de desmina y CD56 tal como se ha descrito anteriormente^{10,13}. Los fibroblastos humanos se obtuvieron del laboratorio del Profesor Asociado Toan Thang Phan, Departamento de Cirugía, Universidad Nacional de Singapur, Singapur.

- 40 **Marcado celular y trasplante** - Las células se marcaron con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma, EE.UU.) durante la noche antes del trasplante de células¹⁰.

- Los ratones KK que cumplan los criterios de diabetes fueron asignados al azar en tres grupos: grupo KK control (n = 8): recibió 1,5 ml de M199 solamente, grupo de KK fibroblastos (n = 8): recibió 1,5 ml de M199 que contenía 3x10⁷ fibroblastos humanos y grupo de KK mioblastos (n = 8): recibió 1,5 ml de M199 que contenía 3x10⁷ de hSkMs. El ratón C57BL se usó como un control normal para determinar los efectos secundarios relacionados con el trasplante de hSkM y recibió 1,5 ml de M199 que contiene 3x10⁷ de hSkMs. Se inyectaron con anestesia a los ratones un total de 20 inyecciones en el músculo bilateral de la cara anteromedial del muslo, en los músculos de la cara posterior de la pata y en los músculos de la región glútea. Después de la inyección, los ratones fueron devueltos a sus jaulas para la recuperación. Todos los animales recibieron tratamiento con ciclosporina (10 mg/kg/día) durante 3 días antes del tratamiento hasta 6 semanas después del tratamiento. Después de tomar muestras de sangre, los animales fueron sacrificados a las 12 semanas. **Estudios de inmunohistoquímica** – Los crio-cortes DAPI+ de los músculos esqueléticos de ratones que fueron explantados a las 12 semanas después del trasplante de células se inmunotifieron para la expresión de distrofina para determinar la integración de los núcleos de hSkM en las fibras del músculo esquelético de ratón¹⁰. Brevemente, los cortes de tejido se fijaron en metanol 100 % a -20 °C durante 20 min seguido de incubación con Triton-100 0,1 % durante 10 min a 4 °C. Después del bloqueo, se administraron las soluciones primarias de anticuerpos que contienen anticuerpo anti-distrofina de conejo (SC-15376, Santa Cruz, EE.UU.) en la dilución 1:50 en las muestras y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de esto, se administró IgG anti-conejo de cabra conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (F-4890, Sigma,

EE.UU.) en la dilución 1:200 durante 1 hora. Después de lavar a fondo, las muestras fueron contratendidas con yoduro de propidio y se observaron al microscopio de fluorescencia Olympus BX41 (Olympus, Japón) y las imágenes se registraron utilizando una cámara digital con Olympic Micro Image (Olympus, Japón).

5 **Aislamiento de tejidos musculares y preparación del ARN total** - Después del sacrificio, se separaron inmediatamente los músculos esqueléticos del ratón de la cara anteromedial del muslo, se recogieron y se conservaron en nitrógeno líquido. El ARN total se extrajo de muestras de músculo congeladas con el reactivo Trizol (Invitrogen, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ARN se determinó por Nanodrop. Se usó ADNasa I (Fermentas, EE.UU.) para eliminar la contaminación de ADN del ARN total. El ADNc se sintetizó utilizando el kit de síntesis de la primera hebra de ADNc Maxima® (Fermentas, EE.UU.) a partir de 1 µg de ARN total. Se usó 1 µl (~ 1 µg) de ADNc para una microplaca. El ciclo de PCR en tiempo real se realizó de acuerdo con las instrucciones del Manual del Usuario RT² Profiler™ PCR Array. Un cambio en el nivel de expresión del gen ≥ 2 veces se consideraría significativamente aumentado entre los grupos, mientras que un cambio en el nivel de expresión $\leq 0,5$ veces se consideraría significativamente reducido entre los grupos. El nivel de expresión del gen se confirmó y cuantificó mediante PCR cuantitativa (qPCR) usando ADNc. Para confirmar el nivel de expresión génica, se utilizó el Maxima® SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Fermentas, EE.UU.). Los cebadores fueron diseñados utilizando el software Primer Premier 5 (Premier Biosoft, EE.UU.). Las secuencias se podían obtener por solicitud. El protocolo de ciclado térmico QPCR durante 40 ciclos se programó como sigue: 1 ciclo de desnaturalización inicial durante 10 min, a continuación, desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos, hibridación durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 30 segundos.

20 Los kits de matriz de PCR para los perfiles de expresión de genes en el músculo esquelético de la vía de la insulina y la biogénesis y función mitocondrial de ratón se adquirieron en SABiosciences, EE.UU. El Mouse Insulin Signalling Pathway RT² Profiler™ PCR Array (Cat PAMM-030, QIAGEN-SAbiosciences, EE.UU.) determina el perfil de expresión de 84 genes relacionados con la función de los genes sensibles a la insulina. La insulina media un amplio espectro de respuestas biológicas asociadas con la captación de glucosa, glucógeno, lípidos y la síntesis de proteínas, la activación de la transcripción, el crecimiento y la diferenciación celular.

25 El Mouse Mitochondria RT² Profiler™ PCR Array (PAMM-087, QIAGEN-SAbiosciences, EE.UU.) determina el perfil de expresión de 84 genes implicados en la biogénesis y función del orgánulo neurálgico de la célula. Los genes controlados por esta matriz incluyen reguladores y mediadores del transporte molecular mitocondrial no solo de los metabolitos necesarios para la cadena del transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, sino también de los iones necesarios para el mantenimiento de la polarización de la membrana mitocondrial y el potencial importante para la síntesis de ATP. El metabolismo y la producción de energía no son las únicas funciones de las mitocondrias. Los genes de la ruta de apoptosis intrínseca activada por la señalización del daño intracelular también se incluyen en esta matriz.

30 **Análisis estadístico:**- El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 20. Todos los datos se presentan como la media \pm el error estándar. El área bajo la curva de las mediciones de glucosa de 4 puntos se utilizó para comparar la diferencia entre los tres grupos por ANOVA. Un valor de probabilidad de $p < 0,05$ se consideró una diferencia significativa entre los grupos.

35 **Resultados:** Los hSKM sobrevivieron ampliamente en los músculos del hospedador a las 12 semanas después del trasplante celular. La prueba de tolerancia a la glucosa mostró una disminución significativa de la glucosa en sangre en ratones del grupo de KK mioblastos en comparación con los grupos KK control y KK fibroblastos. Los patrones de transcripción de la vía de señalización de la insulina mostraron alteraciones en el grupo de KK mioblastos en comparación con el grupo KK control (23 genes), el grupo de KK fibroblastos (8 genes) y el grupo de ratones C57BL (8 genes). Los patrones de transcripción de la biogénesis y la función mitocondrial también mostraron alteraciones en el grupo de KK mioblastos en comparación con el grupo KK control (27 genes), el grupo de KK fibroblastos (9 genes) y el grupo de ratones C57BL (6 genes).

Sorprendentemente, se encontró, y por primera vez, que el trasplante de hSKM tenía como resultado cambios en la transcripción de genes con múltiples genes implicados en la vía de señalización de la insulina y en la biogénesis y la función mitocondrial. Esto fue acompañado con una mejora en la tolerancia a la glucosa y la reducción de la hiperglucemia en el ratón KK diabético.

50 **Peso corporal** – Los pesos corporales medios de los cuatro grupos de animales a las 12 semanas después del tratamiento fueron: grupo de KK control = $32,3 \pm 1,3$ gramos, KK fibroblastos = $33,1 \pm 1,7$ gramos y grupo KK mioblastos = $30,4 \pm 1,2$ gramos y el grupo de ratones C57BL = $22,9 \pm 0,5$ gramos. El peso corporal de los ratones KK fue significativamente mayor que el de los ratones C57BL ($p < 0,05$ para todos). Aunque hubo una tendencia hacia la disminución del peso corporal en el grupo de KK mioblastos, no se encontró diferencia significativa entre los dos grupos KK.

55 **Homeostasis de la glucosa y análisis de la integración celular** – Resultados de la homeostasis de la glucosa de ratón a las 12 semanas después del tratamiento: la HbA1c del grupo de KK mioblastos se había reducido significativamente en comparación con KK control y KK fibroblastos. Sin embargo, seguía siendo significativamente mayor que la del grupo C57BL, el cual sirvió como un control normal. La GTT mostró que en el grupo de KK

mioblastos se había reducido significativamente la concentración de glucosa en plasma durante la GTT y de forma similar a la del grupo C57BL. (frente a KK control y fibroblastos $p < 0,05$ y frente a cualquier grupo KK: $p < 0,05$).

5 Núcleos de hSkM integrados en las fibras musculares del hospedador: el marcado con DAPI de los núcleos de hSkMs mostró un 100 % de eficiencia de marcado. Se determinó la supervivencia de los hSkM DAPI positivo en la inmunotinción del músculo esquelético del ratón para la expresión de la proteína distrofina. El mismo tejido se contratiñó con yoduro de propidio para mostrar todos los núcleos. Una superposición de las imágenes de estas dos condiciones mostró la integración de los núcleos de hSkM en músculo esquelético del ratón.

10 **Mejora de la HbA1c y prueba de la tolerancia a la glucosa** – el ensayo de la hemoglobina glicosilada demostró que los ratones del grupo de KK mioblastos logran un control significativamente mejor de la glucosa después del trasplante de hSkM. A las 12 semanas después del tratamiento, la HbA1c del grupo de KK mioblastos era significativamente menor que la de los grupos KK control y fibroblastos ($p < 0,05$ para ambos). La HbA1c del grupo C57BL fue significativamente menor que la de cualquier grupo KK ($p < 0,05$ para todos).

15 Se observó una disminución significativa en la concentración de glucosa en sangre en el grupo de KK mioblastos. A las 12 semanas después del trasplante, los animales del grupo KK control y fibroblastos tenían hiperglucemia grave e intolerancia a la glucosa. Por el contrario, los ratones del grupo de KK mioblastos mostraron una reducción significativa de la glucosa en sangre en comparación con los grupos KK control y fibroblastos ($p < 0,05$ para ambos), llegando casi a un nivel similar al del grupo C57BL ($p > 0,05$).

20 **Supervivencia e integración de hSkM en el músculo esquelético del ratón hospedador** - La eficiencia del marcaje de los hSkM fue del 100 % para DAPI. Se observó una amplia supervivencia de hSkM mostrada como como núcleos DAPI + en el músculo esquelético del ratón a las 12 semanas después del trasplante celular.

La inmunotinción del tejido DAPI+ para la expresión de distrofina mostró que los núcleos de hSkM estaban colocalizados con los núcleos del hospedador en las mismas fibras musculares, lo que sugiere que los hSkM integrados en las fibras del músculo esquelético formaban fibras musculares híbridas a medida que la distrofina se alineaba en el límite de las fibras musculares esqueléticas.

25 **Matriz de análisis de la expresión génica de la vía de señalización de la insulina en el músculo anteromedial del muslo**

Grupo KK mioblastos frente al grupo KK control

30 Los ratones en el grupo de KK mioblastos en comparación con el grupo de KK control que tenía 22 transcritos de genes aumentaron y 1 disminuyó, el cual representaba el 27,4 % de los 84 genes seleccionados (Figura 1). La mayor parte de los 22 genes aumentados pertenecían al metabolismo de las proteínas (13), crecimiento y diferenciación celular (9), vía MAPK (6) y proteínas asociadas al receptor de insulina (6), factores de transcripción y reguladores (4), grupos funcionales del metabolismo de los hidratos de carbono (4). El único gen que tenía un número reducido de transcritos era el gen diana para el receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ). Este es un novedoso e interesante hallazgo.

35 *Grupo de KK mioblastos frente al grupo de KK fibroblastos*

Los ratones del grupo de KK mioblastos en comparación con el grupo de KK fibroblastos había aumentado 8 (9,5 % de 84) transcritos de genes (Figura 1). Los 8 genes pertenecían al metabolismo de las proteína (3), crecimiento y diferenciación celular (2), proteínas asociadas al receptor de insulina (1), factores y reguladores de la transcripción (3) y grupos funcionales de genes diana de PPAR γ (3).

40 *Grupo de KK mioblastos frente al grupo C57BL*

45 En comparación con el grupo de ratones C57BL, los ratones del grupo de KK mioblastos tenían cambios en 8 transcritos de genes (Figura 1). Entre estos, 7 transcritos de genes aumentaron y 1 disminuyó. La mayoría de los 7 genes que habían aumentado pertenecían al metabolismo de las proteínas (4), vía MAPK (2), metabolismo de los hidratos de carbono (3) y grupos funcionales de la vía de la PI-3 quinasa (2). El único gen en el que había disminución de la transcripción era Glut-1. No hubo cambio en los transcritos del gen PPAR γ .

Matriz de análisis de la expresión génica de la biogénesis y función mitocondrial en el músculo anteromedial del muslo

Grupo de KK mioblastos frente al grupo de KK control

50 En comparación con el grupo KK control, en el grupo KK mioblastos habían aumentado 27 (32,1 % de 84) transcritos del gen (Figura 2). La mayor parte de los 27 genes pertenecían al transporte molécula pequeña (7), transporte mitocondrial (7), translocación de la membrana interna (5), proteínas de direccionamiento a la mitocondria (4), importación de proteínas mitocondriales (4), fisión y fusión mitocondrial (4), localización mitocondrial (3 aumentos) y traslocación fuera de la membrana (2) y grupos funcionales de polarización y potencial de la membrana (2).

Grupo de KK mioblastos frente al grupo de KK fibroblastos

En comparación con el grupo de KK fibroblastos, el grupo de KK mioblastos solo había aumentado 9 (10,7 % de 84) transcripciones de genes (Figura 2). La mayoría de los 9 genes pertenecían al transporte de pequeña molécula (2), transporte mitocondrial (4), translocación de membrana interna (1), proteínas de direccionamiento a la mitocondria (1), importación de proteínas a la mitocondria (2), fisión y fusión mitocondrial (1), translocación fuera de la membrana (1) y grupos funcionales de la polarización y potencial de membrana (2). Ningún gen que pertenecía al grupo funcional de localización mitocondrial mostró ninguna diferencia significativa entre los grupos de KK mioblastos y KK fibroblastos.

Grupo de KK mioblastos frente al grupo C57BL

En comparación con el grupo de ratones C57BL, el grupo de KK mioblastos tenían menos cambios de transcritos de genes mitocondriales (Figura 2). Cinco transcritos de genes aumentaron y 1 transcrito de gen disminuyó. Los 5 genes pertenecían al transporte de molécula pequeña (1), transporte mitocondrial (2), translocación a la membrana interna (1), proteínas de direccionamiento a la mitocondria (4), importación de proteínas a la mitocondria (4), fisión y fusión mitocondrial (1), localización mitocondrial (1 aumentó) y translocación fuera de la membrana (2) y grupos funcionales de la polarización y potencial de membrana (2). El único gen cuya transcripción había disminuido fue Slc25a25, que es un gen transportador de molécula pequeña.

Ningún gen que pertenezca al direccionamiento de proteínas a la mitocondria, importación de proteínas a la mitocondria y translocación fuera de la membrana etc., grupos funcionales mostró ninguna diferencia significativa entre los grupos KK mioblastos y C57BL.

El ejemplo sorprendentemente muestra que los perfiles génicos de la vía de señalización de la insulina y la biogénesis y función mitocondrial cambiaron en los músculos esqueléticos de ratón KK después del trasplante de hSkM, como cambios documentados en los transcritos de genes. Hay 23 (27,4 %) y 27 (32,1 %) transcritos de genes, de la vía de señalización de la insulina y la biogénesis y función mitocondrial, respectivamente, que cambiaron en el músculo esquelético de ratón KK después del trasplante de hSkM en comparación con el ratón KK control. Sin embargo, el número de genes se redujo a 8 (9,5 %) y 9 (10,7 %) en comparación con el grupo de KK fibroblastos y 8 (9,5 %) y 6 (7,1 %) en comparación con el grupo de ratones C57BL. Estos indicaron que el trasplante de hSkM en músculo esquelético del ratón KK cambió el nivel de expresión de genes implicados en la vía de señalización de la insulina y en la biogénesis y función mitocondrial. Sin desear estar vinculado por ninguna teoría o "quid de la cuestión" para esta realización, se cree que estos cambios contribuyen directamente e indirectamente a la reducción de la hiperglucemia y a la mejora de la tolerancia a la glucosa.

Estos resultados muestran que el trasplante de hSkM logra una mejor homeostasis de la glucosa y una mejor tolerancia a la glucosa, que se acompaña con una prolongación de la supervivencia de hSkM en músculo esquelético de ratón KK a las 12 semanas después del trasplante de células usando un tratamiento de supresión inmunológica transitoria. Los núcleos hSkM se integraron en las fibras del músculo esquelético del hospedador. La fusión entre mioblastos del donante con fibras del músculo esquelético del hospedador formaron fibras musculares híbridas. Sin desear estar vinculado por ninguna teoría o "quid de la cuestión" para esta realización, se cree que esto podría ayudar a que el hSkM del donante escapase del rechazo inmunitario del hospedador tras la retirada del tratamiento con ciclosporina, ya que las fibras musculares esqueléticas maduras no expresan antígenos del complejo de histocompatibilidad mayor de clase 1¹⁴. Los núcleos donantes también pueden co-expresar genes exógenos junto con genes del hospedador en las fibras musculares híbridas. Los resultados del ejemplo demuestran además que la implantación de hSkM normal podría aumentar el nivel de expresión de 22 genes implicados en la vía de señalización de la insulina y 27 genes implicados en la biogénesis y función mitocondrial.

Se encontró que 23 genes de la vía de señalización de la insulina cambiaron en el grupo de KK mioblastos en comparación con el grupo KK control: 22 aumentaron y 1 disminuyó. Excepto genes diana efectores secundarios para el grupo funcional de señalización de la insulina, todos los demás grupos funcionales tienen genes que han cambiado significativamente. Notablemente, la mitad de estos genes (56,55 %) de los 23 genes están involucrados en el metabolismo de las proteínas. La mayoría de ellos son multi-funcionales y están involucrados en otros grupos funcionales. Por ejemplo, Cebpa, Frs2, Hras1, Jun, Leptin, Raf y Shc1 no solo están involucrados en el crecimiento y diferenciación celular, sino también en el metabolismo de proteínas.

En comparación con el grupo de KK fibroblastos, 8 transcritos de genes aumentaron en el grupo de KK mioblastos: Acaca, Aebp1, Cfd, Gpd-1, Jun, PPAR γ , Ptpn1 y UCP1. En comparación con el grupo de ratones C57BL, 7 transcritos de genes aumentaron y 1 disminuyó en el grupo de KK mioblastos: Braf, Frap1, Gpd-1, Igf2, Leptin, Ppp1ca y UCP1 aumentaron, mientras que Glut-1 disminuyó. Se encontró que solo los ratones KK que recibieron el trasplante de hSkM habían mejorado significativamente la hiperglucemia, tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en comparación no solo con ratones de control KK, sino también con ratones KK que recibieron el trasplante de fibroblastos humanos. Sin embargo, el grupo de KK mioblastos no desarrolló la misma homeostasis de la glucosa como el grupo de ratones C57BL. Por lo tanto, se observa sorprendentemente que Acaca, Aebp1, Cfd, Gpd-1, Jun, PPAR γ , PTPN1 y UCP1 son más importantes que los otros 15 genes restantes que contribuyen a la homeostasis de la glucosa, en particular en el contexto de la terapia del trasplante de células. Los niveles de transcritos de los 15

genes restantes fueron similares entre los grupos de KK mioblastos y fibroblastos.

Veintisiete genes de la biogénesis y función mitocondrial se incrementaron en el grupo de KK mioblastos en comparación con el grupo de KK fibroblastos. Todos los grupos funcionales tenían genes que cambiaron significativamente en el grupo de KK mioblastos. La mitad de los genes (51,9 % de 27) estaban involucrados en el transporte de moléculas pequeñas (7) y el transporte mitocondrial (7). A excepción de los genes del transporte de moléculas pequeñas, translocaciones de membrana interna y externa, la mayoría de los otros también son multifuncionales y están involucrados en otros grupos funcionales. Por ejemplo, Aip, Cpt1b y Grpel1 no solo están involucrados en el transporte mitocondrial, sino que también están involucrados en la importación de proteínas a la mitocondria y el direccionamiento de proteínas a la mitocondria.

Cuando se compara con el grupo de KK fibroblastos KK, el grupo de KK mioblastos mostraba aumentos de los transcritos génicos en 9 genes: Bcl211, Cox10, Cpt1b, Slc25a22, Slc25a25, Stard3, Timm17b, Tomm40 y UCP1. Cuando se compara con el grupo de C57BL, el grupo de KK mioblastos mostró incrementos de transcritos de genes en 5 genes: Bcl211, Opal, Sfn, Slc25a22 y UCP1 y una disminución de los transcritos de genes en 1 gen: Slc25a25. Se encontró que solo los ratones KK que recibieron el trasplante de hSkM permitió mejorar sensiblemente la hiperglucemia, tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en comparación con los ratones KK control y KK fibroblastos. No obstante, no desarrollaron la misma homeostasis de la glucosa como los ratones C57BL. Así, se encontró sorprendentemente que Bcl211, Cox10, Cpt1b, Slc25a22, Slc25a25, Stard3, Timm17b, Tomm40 son más importantes que los 19 genes restantes que contribuyen a la homeostasis de la glucosa, ya que los niveles de transcripción de los 19 genes restantes fueron similares entre los grupos de KK mioblastos y KK fibroblastos.

Los resultados muestran que el trasplante de Skm suplementa los genes que faltan que están implicados en el transporte y metabolismo de la glucosa. Los niveles de expresión de múltiples genes implicados en la vía de señalización de la insulina y la biogénesis y función mitocondrial se incrementaron significativamente. Estos cambios contribuyeron directa e indirectamente a mejorar el transporte y el metabolismo de la glucosa en los músculos esqueléticos. Esto, a su vez, reduce la hiperglucemia y la hiperinsulinemia y mejora el fenotipo diabético de los ratones KK.

En consecuencia, se demuestra sorprendentemente que el xeno-trasplante de hSkM normales en los músculos esqueléticos de las extremidades del ratón KK regulaba al alza la expresión de múltiples genes implicados en la vía de señalización de la insulina y en la biogénesis y función mitocondrial. Esto está acompañado con una mejor tolerancia a la glucosa y la reducción de la hiperglucemia en el ratón KK. Los genes específicos descubiertos en este contexto son herramientas útiles para el control del inicio, progresión y posible y terapia real por aumento celular de la enfermedad (particularmente diabetes). La detección de uno o más de estos genes es particularmente útil antes, durante y después del tratamiento con agentes de alivio de la enfermedad, tales como el aumento celular tal como el descrito aquí. Estos genes y sus productos también son útiles para la selección de clones de células superiores para su uso en el campo emergente de la terapia celular. Un experto en la técnica apreciará fácilmente formas de seleccionar las células que sirven para el tratamiento y profilaxis de la enfermedad, usando uno o más de los genes particulares descritos aquí.

Las siguientes referencias desvelan procedimientos y materiales para la obtención y crecimiento de las células, y ensayo de sustancias bioquímicas (incluyendo proteínas y ADN/ARN) y marcadores celulares, particularmente, cada etapa clínica, procedimiento y material utilizado para la biopsia de las células musculares, cultivo, identificación y uso se desvela en las referencias 10 y 13.

Referencias

1. Zhang P, Zhang X, Brown J, Vistisen D, Sicree R, Shaw J, Nichols G. Global healthcare expenditure on diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*. 2010;87:293-301.
2. Vijan S. Type 2 diabetes. *Annals of internal medicine*. 2010;152:ITC31-15; quiz ITC316.
3. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Nelson DE, Engelgau MM, Vinicor F, Marks JS. The continuing increase of diabetes in the us. *Diabetes care*. 2001;24:412.
4. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 1998;339:229-234.
5. Guillausseau PJ, Tielmans D, Virally-Monod M, Assayag M. Diabetes: From phenotypes to genotypes. *Diabetes & metabolism*. 1997;23 Suppl 2:14-21.
6. Stem MP. Genetic and environmental influences on type 2 diabetes mellitus in mexican americans. *Nutrition reviews*. 1999;57:S66-70.
7. Zisman A, Peroni OD, Abel ED, Michael MD, Mauvais-Jarvis F, Lowell BB, Wojtaszewski JF, Hirshman MF, Virkamaki A, Goodyear LJ, Kahn CR, Kahn BB. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nature medicine*. 2000;6:924-928.
8. Farese RV, Sajan MP, Yang H, Li P, Mastorides S, Gower WR, Jr., Nimal S, Choi CS, Kim S, Shulman GI, Kahn CR, Braun U, Leitges M. Muscle-specific knockout of pck-lambda impairs glucose transport and induces metabolic and diabetic syndromes. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117:2289-2301.
9. Koh HJ, Arnolds DE, Fujii N, Tran TT, Rogers MJ, Jessen N, Li Y, Liew CW, Ho RC, Hirshman MF, Kulkarni RN, Kahn CR, Goodyear LJ. Skeletal muscle-selective knockout of Ikb1 increases insulin sensitivity, improves glucose homeostasis, and decreases trb3. *Molecular and cellular biology*. 2006;26:8217-8227.
10. Ye L, Lee KO, Su LP, Toh WC, Haider HK, Law PK, Zhang W, Chan SP, Sim EK. Skeletal myoblast transplantation for attenuation of hyperglycaemia, hyperinsulinaemia and glucose intolerance in a mouse model of

- type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2009;52:1925-1934. 11. Campion DR. The muscle satellite cell: A review. *International review of cytology*. 1984;87:225-251. 12. Iwatsuka H, Shino A, Suzuoki Z. General survey of diabetic features of yellow kk mice. *Endocrinologia japonica*. 1970;17:23-35. 13. Ye L, Haider H, Tan R, Toh W, Law PK, Tan W, Su L, Zhang W, Ge R, Zhang Y, Lim Y, Sim EK. Transplantation of nanoparticle transfected skeletal myoblasts overexpressing vascular endothelial growth factor-165 for cardiac repair. *Circulation*. 2007;116:1113-120. 14. Karpati G, Pouliot Y, Carpenter S. Expression of immunoreactive major histocompatibility complex products in human skeletal muscles. *Annals of neurology*. 1988;23:64-72.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una cantidad de suministro de mioblastos genéticamente normales, cultivados que suministran un genoma completo de la especie del hospedador para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad genética en un hospedador, **caracterizada porque** comprende los mioblastos en el suero del hospedador.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enfermedad genética es la diabetes de Tipo II.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el suero del hospedador es suero coagulado.
- 10 4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la dosis de los mioblastos cultivados es de aproximadamente 50 mil millones de células para su uso en el tratamiento y/o prevención de la distrofia muscular y para su uso en el tratamiento y/o prevención de la diabetes de Tipo II, administrándose dicha dosis a una dosis de aproximadamente 100 millones de células por ml de suero del hospedador.
- 15 5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que los mioblastos cultivados son histoincompatibles con el hospedador y en la que el hospedador se trata previamente con un inmunosupresor que comprende ciclosporina.
- 20 6. Un ensayo de descubrimiento de fármacos para seleccionar un fármaco prototipo para la terapia con mioblastos de la diabetes de Tipo II que comprende la detección del aumento de la transcripción de genes, en el que el gen es uno o más seleccionados del grupo que consiste en Bcl211, Cox10, Cpt1b, Slc25a22, Slc25a25, Stard3, Timm17b y Tomm40 o en el que el gen es uno o más seleccionados del grupo que consiste en Acaca, Aebp1, Cfd, Gpd-1, Jun, PPARgamma, Ptpn1 y UCP1.
7. El ensayo de descubrimiento de fármacos según la reivindicación 6, en el que se ensayan los transcritos de ARN y la presencia o cantidad de transcripción de ARN se usa para seleccionar el fármaco prototipo.
- 25 8. El ensayo de descubrimiento de fármacos según la reivindicación 6, en el que se usa un bioensayo de actividad del producto de transcripción del gen para seleccionar el fármaco prototipo.
9. Un procedimiento de detección realizado en modelos animales no humanos genéticamente obesos de diabetes de Tipo II de descubrimiento de un fármaco o un candidato a terapia con mioblastos útil para el tratamiento de la diabetes, que comprende la exposición de un compuesto de ensayo a un grupo in vitro, ex vitro o in vivo de mioblastos, ensayando la actividad del gen de uno o más de un gen seleccionado del grupo que consiste en Bcl211, Cox10, Cpt1b, Slc25a22, Slc25a25, Stard3, Timm17b y Tomm40 o del grupo que consiste en Acaca, Aebp1, Cfd, Gpd-1, Jun, PPARγ, Ptpn1 y UCP1 y usando un resultado positivo de la actividad del gen para determinar el valor del compuesto de prueba para el tratamiento de la diabetes.
- 30 10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que el procedimiento comprende la detección de transcritos de genes.
- 35 11. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que el procedimiento comprende la detección de la actividad de una proteína traducida a partir del transcrito del gen.
12. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que el procedimiento comprende la detección inmunológica de una proteína traducida a partir del transcrito del gen.

Figura 1.

Genes	Nº de registro	Categorías	Veces de cambio		
			A	B	C
<i>Acaca</i>	NM_133360	Genes diana para SREBP1	2,06 †	2,87 †	0,94
<i>Acx1</i>	NM_015729	Metabolismo de los lípidos Genes diana para PPAR γ	11,23 †	1,09	1,84
<i>Aebp1</i>	NM_009636	Factores y reguladores de la transcripción	9,06 †	2,01 †	1,71
<i>Braf</i>	NM_139294	Vía MAPK	2,5 †	0,84	2,25 †
<i>Cabpa</i>	NM_007678	Crecimiento y diferenciación celular Metabolismo de las proteínas Factores y reguladores de la transcripción	2,64 †	1,47	1,36
<i>Cfd</i>	NM_013459	Genes diana para PPAR γ	2,27 †	4,29 †	1
<i>Frap1</i>	NM_020009	Vía de la PI-3 quinasa Metabolismo de las proteínas	11 †	1,25	2,81 †
<i>Frs2</i>	NM_177798	Crecimiento y diferenciación celular Proteínas asociadas al receptor de insulina Metabolismo de las proteínas	4,2 †	0,91	0,79
<i>Gab1</i>	NM_021356	Proteínas asociadas al receptor de insulina Vía MAPK Metabolismo de las proteínas	5,62 †	0,7	0,86
<i>Gpd1</i>	NM_010271	Metabolismo de los carbohidratos Genes diana para PPAR γ	9,38 †	2,41 †	2,51 †
<i>Hras1</i>	NM_008284	Crecimiento y diferenciación celular Vía MAPK Metabolismo de las proteínas	3,03 †	1,05	1,92
<i>Igf2</i>	NM_010514	Crecimiento y diferenciación celular	19,71	1,92	3,51 †
<i>Irs2</i>	NM_001081212	Crecimiento y diferenciación celular Proteínas asociadas al receptor de insulina	2,48 †	1,23	1,09
<i>Jun</i>	NM_010591	Crecimiento y diferenciación celular Genes diana primarios para la señalización de la insulina Metabolismo de las proteínas Factores y reguladores de la transcripción	2,93 †	2,01 †	1,05
<i>Lepin</i>	NM_008493	Metabolismo de los lípidos Metabolismo de los carbohidratos Metabolismo de las proteínas Genes diana primarios para la señalización de la insulina Crecimiento y diferenciación celular	2,03 †	1,95	30,3 †
<i>Pparg</i>	NM_011146	Genes diana para PPAR γ Crecimiento y diferenciación celular Factores y reguladores de la transcripción	0,46 †	3,32 †	0,59
<i>Ppp1ca</i>	NM_031868	Metabolismo de los carbohidratos Proteínas asociadas al receptor de insulina Metabolismo de las proteínas	4,59 †	1,54	2,08 †
<i>Ptpn1</i>	NM_011201	Proteínas asociadas al receptor de insulina Metabolismo de las proteínas	2,62 †	4,66 †	1,65
<i>Raf1</i>	NM_029780	Crecimiento y diferenciación celular Metabolismo de las proteínas Factores y reguladores de la transcripción	2,51 †	0,97	0,8
<i>Shc1</i>	NM_011368	Crecimiento y diferenciación celular Proteínas asociadas al receptor de insulina Metabolismo de los lípidos Metabolismo de las proteínas Vía MAPK	3,53 †	1,11	1,64
<i>Glut-1</i>	NM_011400	Metabolismo de los carbohidratos	2,25 †	0,98	0,48 †
<i>Aps6ka1</i>	NM_009097	Vía MAPK Vía de la PI-3 quinasa Metabolismo de las proteínas	2,58 †	1,56	0,31
<i>UCP1</i>	NM_009463	Vía MAPK Vía de la PI-3 quinasa Metabolismo de las proteínas	8,4 †	4,76 †	4,44 †

† y ‡: regulación al alza y regulación a la baja significativa en el grupo de KK mioblastos comparado con el grupo de KK control (A), grupo de KK fibroblastos (B) y grupo C57BL (C).

Figura 2.

Genes	Nº de registro	Categorías	Veces de cambio		
			A	B	C
Aifm2	NM_178058	Genes apoptóticos	2,45↑	1,52	1,32
Aip	NM_016666	Transporte mitocondrial Proteínas de direccionamiento a la mitocondria Importación de proteínas a la mitocondria	2,33↑	1,21	0,85
Bcl2l1	NM_009743	Genes apoptóticos Transporte mitocondrial Polarización y potencial de membrana	13,4↑	3,68↑	3,03↑
Cox10	NM_178379	Importación de proteínas a la mitocondria Fisión y fusión mitocondrial	2,31↑	2,52↑	1,1
Cpt1b	NM_009948	Transporte mitocondrial Proteínas de direccionamiento a la mitocondria Importación de proteínas a la mitocondria	16,33↑	2,06↑	1,72
Fis1	NM_025562	Fisión y fusión mitocondrial	2,5↑	1,24	1,39
Grpel1	NM_024478	Transporte mitocondrial Proteínas de direccionamiento a la mitocondria Importación de proteínas a la mitocondria	5,39↑	1,15	1,14
Mfn1	NM_024200	Fisión y fusión mitocondrial Localización mitocondrial	2,03↑	0,95	0,86
Mipep	NM_027436	Transporte mitocondrial Proteínas de direccionamiento a la mitocondria	2,83↑	1,43	1,46
Opa1	NM_133752	Traslocación a la membrana interna Localización mitocondrial Fisión y fusión mitocondrial	5,13↑	0,95	2,13↑
Rhot2	NM_145999	Localización mitocondrial	2,64↑	1,06	1,23
Sfn	NM_018754	Genes apoptóticos	2,14↑	0,77	3,39↑
Slc25a15	NM_181325	Transporte de moléculas pequeñas	2,55↑	0,86	0,91
Slc25a16	NM_175194	Transporte de moléculas pequeñas	3,01↑	1,23	0,76
Slc25a17	NM_011399	Transporte de moléculas pequeñas	3,16↑	0,89	1,22
Slc25a20	NM_020520	Transporte de moléculas pequeñas	3,31↑	1,13	0,59
Slc25a22	NM_026646	Transporte de moléculas pequeñas	3,16↑	2,01↑	2,07↑
Slc25a25	NM_146118	Transporte de moléculas pequeñas	2,53↑	2,91↑	0,46↓
Slc25a27	NM_028711	Transporte de moléculas pequeñas	4,26↑	0,92	1,2
Stard3	NM_021547	Transporte mitocondrial	2,87↑	2,23↑	1,31
Taz	NM_181516	Traslocación a la membrana interna	4,89↑	1,17	1,3
Timm17b	NM_011591	Traslocación a la membrana interna	3,39↑	2,19↑	1,17
Timm22	NM_019818	Traslocación a la membrana interna	3,46↑	1,82	1,05
Timm44	NM_011592	Traslocación a la membrana interna	2,31↑	1,09	1,4
Tomn34	NM_025996	Traslocación a la membrana externa	3,27↑	1,56	1,16
Tomn40	NM_016871	Traslocación a la membrana externa	5,13↑	3,46	1,59
UCPI	NM_009463	Polarización y potencial de membrana Transporte mitocondrial	8,4↑	4,76↑	4,44↑

↑ y ↓: regulación a la alza y regulación a la baja significativa en el grupo de KK mioblastos comparado con el grupo de KK control (A), grupo de KK fibroblastos (B) y grupo C57BL (C).