

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 416**

51 Int. Cl.:

C12N 5/077 (2010.01)

A61K 35/34 (2015.01)

A61P 13/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.01.2008 PCT/US2008/000443**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2008 WO08086040**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2008 E 08705573 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2118271**

54 Título: **Células derivadas de músculo para el tratamiento de patologías de las vías urinarias y métodos de fabricación y uso de las mismas**

30 Prioridad:

11.01.2007 US 884478 P

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

10.08.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER
EDUCATION (100.0%)
200 Gardner Steel Conference Center, Thackeray
& O'Hara Streets
Pittsburgh, PA 15260, US**

72 Inventor/es:

**CHANCELLOR, MICHAEL, B.;
JANKOWSKI, RONALD;
PRUCHNIC, RYAN y
HUARD, JOHNNY**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 678 416 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

Células derivadas de músculo para el tratamiento de patologías de las vías urinarias y métodos de fabricación y uso de las mismas.

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a células progenitoras derivadas de músculo (CDM), a composiciones de las mismas y a su uso en el aumento de tejidos corporales, particularmente tejido blando como músculo uretral y periuretral. En particular, la presente invención se refiere a células progenitoras derivadas de músculo que muestran supervivencia prolongada después de la introducción en tejidos blandos, a métodos para aislar las CDM, y a composiciones que las contienen, para su uso en el aumento de tejidos blandos de seres humanos o animales. La
10 invención también se refiere a células progenitoras derivadas de músculo para su uso en el tratamiento de afecciones funcionales, tales como incontinencia urinaria por estrés o incontinencia urinaria.

Antecedentes de la invención

- 15 La incontinencia urinaria por estrés (IUE) es una afección habitual y se caracteriza por la pérdida involuntaria de orina cuando se realiza un esfuerzo, ejercicio, al estornudar o al toser. (Abrams P, et al. *Neurourol Urodyn* 2002;21(2): 167-178). La etiología de la IUE es multifactorial, lo que implica daño y/o deterioro funcional del músculo y nervios asociados que puede producirse como resultado de edad avanzada, estado hormonal y daño en el suelo pélvico resultante de parto vaginal. Debido a la etiología multifactorial, actualmente no existe una sola opción de tratamiento, que no esté limitada de alguna manera.

- 20 El uso de inyectables periuretrales, como una opción de tratamiento mínimamente invasiva, puede realizarse de manera ambulatoria con anestesia local. Este método de tratamiento es más rentable a corto plazo, con hospitalización más corta, un tiempo de quirófano reducido, y generalmente menos complicaciones en comparación con estrategias quirúrgicas invasivas, tales como la suspensión del cuello de la vejiga. (Berman CJ, et al. *J Urol* 1997; 157(1): 122-124). Sin embargo, tiene desventajas tales como la necesidad de inyecciones múltiples debido a la pérdida del efecto de relleno prolongada a causa de la degradación, reabsorción y/o migración, así como a otros
25 impedimentos tales como obstrucción de la salida de la vejiga y reacciones alérgicas. Por tanto, se requiere otro tipo diferente de materiales de aumento urinario que sean duraderos, compatibles con una amplia serie de tejidos del hospedador, y que causen inflamación, cicatrización y/o rigidez mínima de los tejidos que rodean el lugar del implante.

- 30 Las células derivadas de músculo, aisladas de rata, han mostrado algunos modelos satisfactorios para la incontinencia urinaria. (Cannon TW, et al. *Urology* 2003;62(5): 958-963 y Lee N et al. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2003; 14(1): 31-37; análisis 37). La presente invención proporciona el uso de células humanas derivadas de músculo (CDM) esquelético como un tratamiento inyectable para la IUE, y otras patologías que afectan a las vías urinarias.

Sumario de la invención

- 35 La presente invención se refiere a células humanas progenitoras derivadas de músculo (CDM) y a composiciones de las mismas, que presentan supervivencia prolongada después del trasplante. Las CDM de la presente invención, y las composiciones que las contienen, comprenden células musculares progenitoras tempranas, *es decir*, células madre derivadas de músculo, que expresan marcadores de células progenitoras, tales como desmina, M cadherina, MioD, miogenina, CD34 y Bcl-2. Además, estas células musculares progenitoras tempranas expresan los
40 marcadores celulares Flk-1, Sca-1, MNF y c-met, pero no expresan los marcadores celulares CD45 ni c-Kit.

- 45 Es un objeto de la presente invención proporcionar métodos para el aislamiento y enriquecimiento de células humanas progenitoras derivadas de músculo a partir de una población inicial de células musculares. Estos métodos producen el enriquecimiento de las CDM humanas que tienen una capacidad de supervivencia prolongada después del trasplante o de la introducción en un lugar de tejido blando. La población de CDM de acuerdo con la presente invención está particularmente enriquecida con células que expresan marcadores de células progenitoras, tales como desmina, M cadherina, MioD, miogenina, CD34 y Bcl-2. Esta población de CDM también expresa los marcadores celulares Flk-1, Sca-1, MNF y c-met, pero no expresa los marcadores celulares CD45 ni c-Kit.

La presente invención proporciona un proceso de preparación de un agente de relleno de tejido blando de las vías urinarias, que comprende células progenitoras derivadas de músculo (CDM), comprendiendo el proceso:

- 50 (a) suspender las células de músculo esquelético aisladas de un ser humano, en un primer recipiente de cultivo celular durante entre 30 y 120 minutos;

(b) decantar los medios del primer recipiente de cultivo celular a un segundo recipiente de cultivo celular;

(c) cultivar las células en el segundo recipiente de cultivo celular durante 1-3 días para permitir que las células restantes que permanecen en los medios se unan a las paredes del segundo recipiente de cultivo celular;

5 (d) aislar las células de las paredes del segundo recipiente de cultivo celular, en el que las células aisladas son CDM.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar las CDM y las composiciones que las contienen, para su uso en el aumento de tejido blando muscular, o tejido blando no muscular, incluyendo musculo liso, y diversos tejidos de órganos, sin que sean necesarios transportadores poliméricos o medios de cultivo especiales para el trasplante. Dichos métodos incluyen la administración de composiciones de CDM para su introducción en tejidos
10 blandos, por ejemplo, mediante inyección directa en el tejido, o mediante distribución sistémica de las composiciones. Preferentemente, el tejido blando incluye tejidos corporales no óseos. Más preferentemente, el tejido blando incluye músculo no estriado y tejidos corporales no óseos. De manera más preferente, el tejido blando incluye tejidos corporales no musculares, no óseos. Como se usa en el presente documento, aumento se refiere a llenado, relleno, soporte, alargamiento, extensión o incremento del tamaño o de la masa de tejido corporal.

15 Es un objeto de la presente divulgación proporcionar métodos para aumentar tejido blando, bien tejido blando derivado de músculo, o tejido blando no derivado de músculo, después de una lesión, herida, intervención quirúrgica, traumatismo, no traumatismo, u otros procedimientos que producen fisuras, aberturas, depresiones, heridas y similares, en la piel o en tejidos blandos u órganos internos.

20 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar tratamientos basados en CDM humanas para enfermedades de las vías urinarias y síntomas asociados. Las composiciones farmacéuticas que contienen las CDM, y las composiciones que las contienen, pueden utilizarse para el tratamiento de patologías de las vías urinarias. Estas composiciones farmacéuticas comprenden CDM humanas aisladas.

25 La presente invención proporciona una población de células que contiene las CDM para su uso en un método de tratamiento de incontinencia urinaria por estrés (IUE) en un sujeto humano que lo necesite, en el que la población de células que contiene las CDM se ha obtenido mediante un proceso que comprende:

(a) suspender células aisladas de músculo esquelético del sujeto humano en un primer recipiente de cultivo celular durante entre 30 y 120 minutos para adherir una primera población de células al recipiente y dejar en el recipiente una segunda población de células no adherida y en un medio de cultivo;

30 (b) transferir el medio de cultivo y la segunda población de células desde el primer recipiente de cultivo celular a un segundo recipiente de cultivo celular;

(c) cultivar las células en el segundo recipiente de cultivo celular durante 1-3 días para permitir que las células de la segunda población de células se unan al segundo recipiente de cultivo celular;

(d) aislar las células unidas al segundo recipiente de cultivo celular para obtener dicha población de células que contenga las CDM.

35 Después de aislarlas, estas CDM pueden expandirse posteriormente mediante cultivo celular. En una realización de la invención, estas CDM se congelan antes de suministrarlas a un sujeto que necesite la composición farmacéutica.

40 En una realización, cuando las CDM humanas, y composiciones de las mismas, se utilizan para tratar la incontinencia urinaria, se inyectan directamente en la uretra. Pudiendo inyectarse, preferentemente, en el músculo periuretral. Las CDM humanas, y composiciones de las mismas, pueden utilizarse para mejorar al menos un síntoma de enfermedad de las vías urinarias. Estos síntomas incluyen incontinencia urinaria, infección de las vías urinarias, polaquiuria (necesidad de orinar con más frecuencia), disuria (dolor al orinar), sensación de ardor al orinar, astenia, temblor, orina turbia, hematuria (sangre en la orina) y pielonefritis (infección renal).

45 Las CDM humanas se aíslan de una biopsia de músculo esquelético. En una realización, el músculo esquelético de la biopsia puede conservarse durante 1-6 días. En un aspecto de esta realización, el músculo esquelético de la biopsia se conserva a 4 °C. Después, las CDM se aíslan utilizando la técnica de siembra individual. También se desvela la técnica de presiembra.

50 Utilizando la técnica de presiembra, una suspensión de células de músculo esquelético de tejido de músculo esquelético se siembra en un primer recipiente al cual se adhieren células de fibroblasto de la suspensión de células de músculo esquelético. Después, las células no adherentes se resiembran en un segundo recipiente, realizándose la etapa de resiembra después de que el 15-20 % de las células se haya adherido al primer recipiente. Esta etapa de

resiembradebe repetirse al menos una vez. Las CDM se aíslan de este modo y pueden administrarse al esófago del sujeto mamífero.

5 Utilizando la técnica de siembra individual, las células se desmenuzan y se digieren utilizando una colagenasa, una dispasa, otra enzima o una combinación de enzimas. Después de eliminar la enzima lavando las células, estas se cultivan en un matraz en medio de cultivo durante entre aproximadamente 30 y aproximadamente 120 minutos. Durante este periodo de tiempo, las "células que se adhieren rápidamente" se pegan a las paredes del matraz o del recipiente, mientras que las "células que se adhieren lentamente" o las CDM, permanecen en suspensión. Las "células que se adhieren lentamente" se transfieren a un segundo matraz o recipiente y se cultivan en su interior durante un periodo de 1-3 días. Durante este segundo periodo de tiempo las "células que se adhieren lentamente" o las CDM se pegan a las paredes del segundo matraz o recipiente.

En otra realización de la invención, estas CDM se expanden a cualquier cantidad de células. En un aspecto preferido de esta realización, las células se expanden en nuevos medios de cultivo durante entre aproximadamente 10 y 20 días. Más preferentemente, las células se expanden durante 17 días.

15 Las CDM, ya sea expandidas o no expandidas, pueden preservarse para transportarse o conservarse durante un periodo de tiempo antes de su uso. En una realización, las CDM se congelan. Preferentemente, las CDM se congelan a entre aproximadamente -20 y -90 °C. Más preferentemente, las CDM se congelan a aproximadamente -80 °C. Estas CDM congeladas se utilizan como una composición farmacéutica.

Breve descripción de los dibujos

20 El archivo de patente o de solicitud de patente contiene al menos una reproducción fotográfica ejecutada a color. La oficina de patentes y marcas registradas de Estados Unidos proporcionará las copias de esta patente o solicitud de patente con reproducción(es) fotográfica(s) tras su solicitud y pago de tasas necesarias.

Los dibujos adjuntos de las figuras, se presentan para describir mejor la invención y para ayudar a entenderla aclarando sus diversos aspectos.

25 La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra una mayor presión del punto de pérdida en ratas tratadas con las CDM humanas en comparación con el control.

La Figura 2A es una micrografía óptica de un esfínter uretral proximal en una rata de control.

La Figura 2B es una micrografía óptica de un esfínter uretral proximal en una rata tratada con las CDM humanas.

30 La Figura 3 muestra el marcaje inmunofluorescente con un anticuerpo nuclear específico de ser humano (láminas A/C) que revela la presencia de núcleos humanos incorporados dentro de la capa muscular del esfínter estriado en tejido humano inyectado con CDM humanas (100x). Las flechas apuntan a núcleos individuales.

Descripción detallada de la invención

35 La invención proporciona CDM humanas y métodos de uso de dichas células para generar tejidos con propiedades de relleno que tienen el potencial de mejorar la coaptación y función intrínseca del esfínter remodelando el tejido dañado. Adicionalmente, la invención proporciona las CDM y población de células que contienen las CDM para su uso en métodos de tratamiento de trastornos de las vías urinarias, incluyendo incontinencia e incontinencia urinaria por estrés. El aislamiento de células humanas derivadas de músculo (CDM) de tejido adulto, es capaz de lograr un éxito funcional dentro de un modelo establecido de lesión del esfínter uretral.

Células derivadas de músculo y Composiciones

40 La presente invención proporciona CDM que comprenden células progenitoras tempranas (también denominadas en el presente documento, células progenitoras derivadas de músculo o células madre derivadas de músculo) que muestran tasas de supervivencia prolongada después de trasplante en los tejidos corporales, preferentemente tejidos blandos. Para obtener las CDM, un explante de músculo, preferentemente, de músculo esquelético, se obtiene de un animal donante, preferentemente, de un mamífero, incluyendo ratas, perros y seres humanos. Este explante sirve como un sincicio estructural y funcional que incluye "lechos" de células precursoras de músculo (T. A. Partridge et al., 1978, Nature 73: 306-8; B. H. Lipton et al., 1979, Science 205: 12924).

Las células aisladas de tejido muscular primario contienen una mezcla de fibroblastos, mioblastos, adipocitos, células hematopoyéticas y células progenitoras derivadas de músculo. Las células progenitoras de una población derivada de músculo pueden enriquecerse usando características de adherencia diferencial de células de músculo

primario en matraces de tejido cubiertos con colágeno, tal como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.866.842; de Chancellor *et al.* Las células que son lentas para adherirse tienden a ser morfológicamente redondas, expresan altos niveles de desmina y tienen la capacidad de fusionarse y diferenciarse en miotubos multinucleados (Patente de Estados Unidos n.º 6.866.842 de Chancellor *et al.*). Se demostró que una subpoblación de estas células respondía *in vitro* a la proteína morfogénica ósea 2 humana recombinante (rhBMP-2, *recombinant human bone morphogenic protein 2*), expresando mayores niveles de fosfatasa alcalina, hormona paratiroidea dependiente de AMPc 3',5', y linaje osteogénico y linajes miogénicos (Patente de Estados Unidos n.º 6.866.842 de Chancellor *et al.*; T. Katagiri *et al.*, 1994, *J. Cell Biol.*, 127:1755-1766).

En un aspecto de esta divulgación, para diferenciar las células que se adhieren rápidamente de las que se adhieren lentamente (CDM) puede utilizarse un procedimiento de presiembra. Se aislaron poblaciones de células que se adhieren rápidamente (PP 1-4) y CDM redondas (PP6) que se adhieren lentamente y enriquecieron de explantes de músculo esquelético y se analizó la expresión de diversos marcadores utilizando inmunohistoquímica para determinar la presencia de células pluripotentes entre las células que se adhieren lentamente (Ejemplo 1; solicitud de patente de Estados Unidos Ser. n.º 09/302.896 de Chancellor *et al.*). Las células PP6 expresaron marcadores miogénicos, incluyendo desmina, MioD y Miogenina. Las células PP6 también expresaron c-met y MNF, dos genes que se expresan en una fase temprana de la miogénesis (J. B. Miller *et al.*, 1999, *Curr. Top. Dev. Biol.* 43:191-219). Las PP6 mostraron un menor porcentaje de células que expresaban M cadherina, un marcador específico de células satélite (A. Irintchev *et al.*, 1994, *Development Dynamics* 199: 326-337), pero un mayor porcentaje de células que expresaban Bcl-2, un marcador limitado a células en las primeras etapas de la miogénesis (J. A. Dominov *et al.*, 1998, *J. Cell Biol.* 142:537-544). Las células PP6 también expresaron CD34, un marcador identificado con células progenitoras hematopoyéticas humanas, así como precursores de células estromales en médula ósea (R. G. Andrews *et al.*, 1986, *Blood* 67: 842-845; C. I. Civin *et al.*, 1984, *J. Immunol.* 133:157-165; L. Fina *et al.*, 1990, *Blood* 75: 2417-2426; P. J. Simmons *et al.*, 1991, *Blood* 78: 2848-2853). Las células PP6 también expresaron Flk-1, un homólogo de ratón del gen KOR humano que se identificó recientemente como un marcador de células hematopoyéticas con características similares a las de las células madre (B. L. Ziegler *et al.*, 1999, *Science* 285: 1553-1558). Del mismo modo, las células PP6 expresaron Sca-1, un marcador presente en células hematopoyéticas con características similares a las de las células madre (M. van de Rijn *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4634-8; M. Osawa *et al.*, 1996, *J. Immunol.* 156:3207-14). Sin embargo, las células PP6 no expresaron los marcadores de células madre hematopoyéticas CD45 ni c-Kit (revisado en L. K. Ashman, 1999, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31:1037-51; G. A. Koretzky, 1993, *FASEB J.* 7: 420-426).

Un aspecto de esta divulgación es la población PP6 de células progenitoras derivadas de músculo que tienen las características descritas en el presente documento. Estas células progenitoras derivadas de músculo expresan los marcadores celulares desmina, CD34 y Bcl-2. De acuerdo con la presente invención, las células PP6 se aíslan por técnicas descritas en el presente documento (Ejemplo I) para obtener una población de células progenitoras derivadas de músculo que tienen una capacidad de supervivencia prolongada después del trasplante. La población PP6 de células progenitoras derivadas de músculo comprende un porcentaje significativo de células que expresan marcadores de células progenitoras tales como desmina, CD34 y Bcl-2. Además, las células PP6 expresan los marcadores Flk-1 y Sca-1, pero no expresan los marcadores CD45 ni c-Kit. Preferentemente, más del 95 % de las células PP6 expresan los marcadores desmina, Sea-I y Flk-1, pero no expresan los marcadores CD45 ni c-Kit. Se prefiere que las células PP6 se utilicen al cabo de aproximadamente 1 día o aproximadamente 24 horas después de la última siembra.

En la presente invención, las células que se adhieren rápidamente y las que se adhieren lentamente (CDM) se separan entre ellas utilizando una técnica de siembra individual. En el Ejemplo 2 se describe una técnica de este tipo. En primer lugar, las células se proporcionan a partir de una biopsia de músculo esquelético. La biopsia solo requiere contener aproximadamente 100 mg de células. Pueden utilizarse biopsias cuyo tamaño varíe de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 500 mg de acuerdo con los métodos de presiembra y de siembra individual. Pueden utilizarse otras biopsias de 50, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 250, 300, 400 y 500 mg de acuerdo con los métodos de presiembra y de siembra individual.

En una realización preferida de la invención, el tejido de la biopsia se conserva después durante 1 a 7 días. Esta conservación es a una temperatura de aproximadamente la temperatura ambiente a aproximadamente 4 °C. Este periodo de espera hace que el tejido de músculo esquelético biopsiado sufra estrés. Aunque este estrés no es necesario para el aislamiento de las CDM utilizando esta técnica de siembra individual, parece que el uso del periodo de espera da como resultado una mayor producción de CDM.

El tejido de las biopsias se tritura y centrifuga. El sedimento se resuspende y se somete a digestión utilizando una enzima de digestión. Las enzimas que pueden utilizarse incluyen colagenasa, dispasa o combinaciones de estas enzimas. Después de la digestión, la enzima se elimina de las células mediante lavado. Las células se transfieren a un matraz en medios de cultivo para el aislamiento de las células que se adhieren rápidamente. Pueden utilizarse muchos medios de cultivo. Los medios de cultivo particularmente preferidos incluyen los diseñados para el cultivo de células endoteliales incluyendo el Medio de Cultivo Endotelial de Cambrex. Este medio puede complementarse con otros componentes incluyendo suero bovino fetal, IGF-1, bFGF, VEGF, EGF, hidrocortisona, heparina y/o ácido

ascórbico. Otros medios que pueden usarse en la técnica de siembra individual incluyen medio InCell M3 I OF. Este medio puede complementarse como se ha descrito anteriormente, o utilizarse no complementado.

5 La etapa de aislamiento de las células que se adhieren rápidamente puede requerir cultivo en matraz durante un periodo de tiempo de aproximadamente 30 a aproximadamente 120 minutos. Las células que se adhieren rápidamente, se adhieren a los matraces en 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 o 120 minutos. Después de que se adhieran, las células que se adhieren lentamente se separan de las que se adhieren rápidamente eliminando los medios de cultivo del matraz al que se han unido las células que se adhieren rápidamente.

10 El medio de cultivo eliminado de este matraz se transfiere después a un segundo matraz. Las células pueden centrifugarse y resuspenderse en medio de cultivo antes de transferirse al segundo matraz. Las células se cultivan en este segundo matraz durante entre 1 y 3 días. Preferentemente, las células se cultivan durante dos días. Durante este periodo de tiempo, las células que se adhieren lentamente (CDM) se adhieren al matraz. Después de haberse adherido las CDM, los medios de cultivo se retiran y se añaden nuevos medios de cultivo de tal manera que las CDM puedan expandirse en número. Las CDM pueden expandirse en número cultivándolas durante aproximadamente 10 a aproximadamente 20 días. Las CDM pueden expandirse en número cultivándolas durante 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 días. Preferentemente, las CDM se someten a cultivo en expansión durante 17 días.

20 Como una alternativa a los métodos de presiembra y de siembra individual, las CDM de la presente invención pueden aislarse mediante análisis de separación de células activadas por fluorescencia (FACS, *fluorescence activate cell sorting*), utilizando anticuerpos marcados contra uno o más de los marcadores de superficie celular expresados por las CDM (C. Webster et al., 1988, Exp. Cell. Res. 174:252-65; J. R. Blanton et al., 1999, Muscle Nerve 22: 43-50). Por ejemplo, el análisis FACS puede realizarse utilizando anticuerpos marcados para dirigirse contra CD34, Flk-1, Sca-1 y/o a los otros marcadores de superficie celular descritos en el presente documento, para seleccionar una población de células similares a PP6 que presentan una capacidad de supervivencia prolongada cuando se introducen en el tejido del hospedador. En el presente documento también se desvela el uso de uno o más marcadores de detección por fluorescencia, por ejemplo, fluoresceína o rodamina, para la detección de anticuerpos de diferentes proteínas marcadoras celulares.

30 Utilizando cualquiera de los métodos de aislamiento de las CDM descritos anteriormente, las CDM que se van a transportar, o que no van a usarse durante un periodo de tiempo, pueden preservarse usando métodos conocidos en la técnica. Más específicamente, las CDM aisladas pueden congelarse a una temperatura que varía de aproximadamente -25 a aproximadamente -90 °C. Preferentemente, las CDM se congelan aproximadamente a -80 °C, en nieve carbónica (hielo seco) para su uso o transporte posterior. La congelación puede realizarse con un medio de criopreservación conocido en la técnica.

Tratamientos basados en células derivadas de músculo

35 En una realización de la presente invención, las CDM se aíslan de una fuente de músculo esquelético y se introducen o se trasplantan en un sitio de interés de tejido blando muscular o no muscular, o en estructuras óseas. Ventajosamente, las CDM de la presente invención se aíslan y se enriquecen para que contengan una gran cantidad de células progenitoras que muestren supervivencia prolongada después del trasplante. Además, las células progenitoras derivadas de músculo de esta invención expresan diversos marcadores celulares característicos, tales como desmina, CD34 y Bcl-2. Adicionalmente, las células progenitoras derivadas de músculo de esta invención expresan los marcadores celulares Sca-1 y Flk-1, pero no expresan los marcadores celulares CD45 ni c-Kit.

40 Las CDM y las composiciones que comprenden las CDM de la presente invención, pueden usarse para reparar, tratar o mejorar diversas afecciones estéticas o funcionales (por ejemplo defectos) mediante el aumento de tejidos blandos musculares o no musculares. En particular, dichas composiciones pueden utilizarse como agentes de relleno de tejido blando para el tratamiento de la incontinencia urinaria y otros casos de debilidad de la musculatura lisa, enfermedad, lesión o disfunción. Además, dichas CDM y sus composiciones, pueden usarse para aumentar el tejido blando no asociado con lesión añadiendo volumen a una zona de tejido blando, orificio, depresión o espacio, en ausencia de enfermedad o traumatismo, tal como para "alisar". En la presente invención también se incluyen las administraciones múltiples y sucesivas de las CDM.

50 Para tratamientos basados en CDM, un explante de músculo esquelético se obtiene preferentemente de una fuente animal o humana autóloga o heteróloga. Se prefiere más una fuente animal o humana autóloga. Las composiciones de CDM se preparan después y se aíslan como se describe en el presente documento. Para introducir o trasplantar en un receptor humano o animal las CDM y/o las composiciones que las comprenden de acuerdo con la presente invención, se prepara una suspensión de células musculares mononucleadas. Dichas suspensiones contienen concentraciones de células progenitoras derivadas de músculo de la invención en un transportador, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable. Por ejemplo, las suspensiones de las CDM para la administración a un sujeto pueden comprender de 10^8 a 10^9 células/ml en una solución estéril de medio completo modificado para que contenga el suero del sujeto, como una alternativa al suero bovino fetal. Como alternativa, las suspensiones de CDM

pueden ser soluciones estériles sin suero, tales como soluciones de criopreservación (Celox Laboratories, St. Paul, Minn.). Las suspensiones de CDM pueden después introducirse, por ejemplo, mediante inyección, en uno o más lugares del tejido donante.

5 Las células descritas pueden administrarse como una preparación o composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable que contenga un transportador, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable, y administrarse a los tejidos del organismo receptor de interés, incluyendo animales humanos y no humanos. La composición que contiene CDM puede prepararse resuspendiendo las células en un líquido o solución adecuado tal como solución salina fisiológica estéril u otros líquidos acuosos inyectables fisiológicamente aceptables. Los expertos en la materia pueden determinar de manera habitual las cantidades de los componentes a utilizar en dichas composiciones.

10 Las CDM o sus composiciones, pueden administrarse colocando las suspensiones de CDM en material absorbente o adherente, *es decir*, una matriz de esponja de colágeno e inserción del material que contiene las CDM en el interior o sobre el lugar de interés. Como alternativa, las CDM pueden administrarse mediante vías de inyección parenterales, incluyendo subcutánea, intravenosa, intramuscular e intraesternal. Otros modos de administración incluyen, pero sin limitación, intranasal, intratecal, intracutánea, percutánea, enteral y sublingual. En una realización de la presente invención, la administración de las CDM puede estar mediada por cirugía endoscópica.

20 Para la administración inyectable, la composición está en solución o suspensión estéril o puede resuspendirse en vehículos acuosos u oleaginosos farmacéutica y fisiológicamente aceptables, que pueden contener conservantes, estabilizantes y material para hacer que la solución o la suspensión sea isotónica con los líquidos corporales (es decir, sangre) del receptor. Como ejemplos no limitantes de excipientes adecuados para su uso se incluye agua, solución salina tamponada con fosfato, un pH de 7,4, solución acuosa de cloruro de sodio 0,15 M, dextrosa, glicerol, etanol diluido y similares y mezclas de los mismos. Son estabilizantes ilustrativos polietilenglicol, proteínas, sacáridos, aminoácidos, ácidos inorgánicos y orgánicos, que pueden utilizarse solos o como aditivos. Los números o cantidades, así como las vías de administración utilizadas, se determinan individualmente y corresponden a las cantidades utilizadas en tipos de aplicaciones o indicaciones similares conocidas por los expertos en la materia.

25 Para optimizar el éxito del trasplante, se desea que haya una compatibilidad inmunológica más cercana posible entre el donante y el receptor. Si la fuente autóloga no está disponible, para determinar la compatibilidad más cercana disponible pueden analizarse antígenos de histocompatibilidad de Clase I y Clase II del donante y receptor. Esto minimiza o elimina el rechazo inmunitario y reduce la necesidad de utilizar terapia inmunosupresora o inmunomoduladora. Si se desea, la terapia inmunosupresora o inmunomoduladora se puede iniciar antes, durante
30 y/o después del procedimiento del trasplante. Por ejemplo, al receptor del trasplante se le puede administrar ciclosporina A u otros fármacos inmunosupresores. También puede inducirse tolerancia inmunológica antes del trasplante mediante métodos alternativos conocidos en la materia (D. J. Watt et al., 1984, Clin. Exp. Immunol. 55: 419; D. Faustman et al., 1991, Science 252: 1701).

35 En consonancia con la presente invención, las CDM pueden administrarse a tejidos corporales, incluyendo tejido epitelial (es decir., piel, lumen, etc.), tejido muscular (es decir músculo liso) y a diversos tejidos de órganos tales como los órganos que están asociados al sistema urológico (es decir., vejiga, uretra, uréter, riñones, etc.).

40 La cantidad de células en una suspensión de CDM y el modo de administración puede variar dependiendo del lugar y de la afección que se esté tratando. Como ejemplos no limitantes, de acuerdo con la presente invención, para el tratamiento de la incontinencia urinaria se inyectan aproximadamente $3-5 \times 10^5$ CDM (véase el Ejemplo 3). En consonancia con los Ejemplos desvelados en el presente documento, un médico con práctica puede modular las cantidades y los métodos de los tratamientos basados en CDM de acuerdo con los requisitos, las limitaciones y/o las optimizaciones determinadas en cada caso.

45 Condiciones del lumen: En otra realización, las CDM y composiciones de las mismas de acuerdo con la presente invención, tienen utilidad adicional como tratamientos para afecciones del lumen en un sujeto animal o mamífero, incluyendo seres humanos. Específicamente, las células progenitoras derivadas de músculo se utilizan para bloquear, potenciar, alargar, sellar reparar, rellenar o llenar, completa o parcialmente, diversos lúmenes o espacios vacíos dentro del cuerpo. Los lúmenes incluyen, sin limitación, la uretra. Los espacios vacíos pueden incluir, sin limitación, diversas heridas tisulares (es decir, pérdida de músculo y de volumen de tejido blando debido a traumatismo; destrucción de tejido blanco debido a proyectiles penetrantes tales como una herida por arma blanca o
50 herida de bala; pérdida de tejido blando por enfermedad o muerte tisular debido a la extirpación quirúrgica del tejido, incluida la pérdida de tejido mamario después de una mastectomía por cáncer de mama o una pérdida de tejido muscular después de una cirugía para tratar sarcoma, etc.), lesiones, fisuras, divertículos, quistes, fístulas, aneurismas y otras depresiones o aberturas indeseables o no deseadas que puedan existir dentro del cuerpo de un animal o mamífero, incluyendo seres humanos. Para el tratamiento de afecciones del lumen, las CDM se preparan como se desvela en el presente documento y después se administran, por ejemplo, mediante inyección o suministro
55 intravenoso, al tejido luminal para llenar o reparar el espacio vacío. La cantidad de CDM introducida se modula para reparar espacios vacíos grandes o pequeños en un entorno de tejido blando, según sea necesario.

Afecciones del esfínter: Las CDM y sus composiciones de acuerdo con la presente invención, también pueden utilizarse para el tratamiento de una lesión, debilitamiento, enfermedad o disfunción del esfínter en un animal o mamífero, incluyendo seres humanos. En particular, las CDM se utilizan para aumentar los tejidos de los esfínteres urinarios. Más específicamente, la presente invención proporciona tratamientos de aumento de tejidos blandos para la incontinencia urinaria. Para el tratamiento de defectos del esfínter, las CDM se preparan como se describe en el presente documento y después se administran al tejido del esfínter, por ejemplo, mediante inyección, para proporcionar volumen, relleno o soporte adicional. El número de CDM introducido se modula para proporcionar diversas cantidades de material de relleno según sea necesario. Por ejemplo, para el tratamiento de la incontinencia urinaria se inyectan aproximadamente $3-5 \times 10^5$ CDM (véase el Ejemplo 3).

Además, como ejemplo, las CDM y sus composiciones pueden utilizarse para incidir en la contractilidad del tejido muscular liso, tal como tejido urinario o vesical. Por tanto, la presente invención también incluye el uso de las CDM de la invención en el restablecimiento de la contracción muscular, y/o mejorar o superar los problemas de contractilidad del músculo liso.

Células derivadas de músculo modificadas por ingeniería genética

En otro aspecto de la presente invención, las CDM de esta invención pueden modificarse por ingeniería genética para que contengan una o más secuencias de ácido nucleico que codifiquen una o más biomoléculas activas y para expresar estas biomoléculas, incluyendo proteínas, polipéptidos, péptidos, hormonas, metabolitos, fármacos, enzimas y similares. Dichas CDM pueden ser histocompatibles (autólogas) o no histocompatibles (alogénicas) para el receptor, incluyendo seres humanos. Estas células pueden servir como sistemas de suministro local prolongado para una diversidad de tratamientos, por ejemplo, incontinencia urinaria.

En la presente invención se prefieren células progenitoras autólogas derivadas de músculo, que no reconocerán como extraño al receptor. A este respecto, las CDM utilizadas para la transferencia o suministro de genes mediado por células, serán deseablemente compatibles con respecto al locus del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC o HLA en seres humanos). Dichas células compatibles con MHC o HLA pueden ser autólogas. Como alternativa, las células pueden ser de una persona que tenga el mismo perfil antigénico MHC o HLA o uno similar. El paciente también puede tolerizarse con respecto a los antígenos MHC alogénicos. La presente invención también incluye el uso de células que carecen de antígenos de MHC de Clase I y/o II, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.538.722.

Las CDM pueden modificarse por ingeniería genética mediante una diversidad de técnicas moleculares y métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, transfección, infección o transducción. La transducción, como se utiliza en el presente documento, se refiere habitualmente a células que se han modificado por ingeniería genética para que contengan un gen extraño o heterólogo introduciendo en las células un vector vírico o no vírico. La transfección se refiere más habitualmente a células que se han modificado por ingeniería genética para que contengan un gen extraño contenido en un plásmido, o en un vector no vírico. Las CDM pueden transfectarse o transducirse mediante diferentes vectores y, por tanto, pueden servir como vehículos de suministro de genes para transferir los productos expresados al músculo.

Aunque los vectores víricos son los preferidos, los expertos en la materia apreciarán que la modificación de las células por ingeniería genética para que contengan secuencias de ácido nucleico que codifiquen las proteínas o polipéptidos, citocinas y similares deseados, puede realizarse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.538.722, incluyendo fusión, transfección, lipofección mediada por el uso de liposomas, electroporación, precipitación con fosfato de calcio o DEAE-Dextrano, bombardeo de partículas (biolística) con partículas recubiertas de ácido nucleico (por ejemplo partículas de oro), microinyección y similares.

En la técnica se conocen bien vectores para introducir ácido nucleico (ADN o ARN) heterólogo (es decir, extraño) en las células musculares para la expresión de productos bioactivos. Dichos vectores poseen una secuencia promotora, preferentemente, un promotor que es específico de célula y se coloca cadena arriba de la secuencia a expresar. Los vectores también pueden contener, opcionalmente, uno o más genes marcadores de expresables para la expresión como una indicación de éxito en la transfección y expresión de las secuencias de ácido nucleico contenidas en el vector.

Como ejemplos ilustrativos de vehículos o construcciones de vectores para la transfección o infección de las células derivadas de músculo de la presente invención se incluyen vectores víricos con replicación defectuosa, vectores de virus de ADN o de virus de ARN (retrovirus), tales como adenovirus, virus del herpes simple y vectores víricos adenoasociados. Los vectores víricos adenoasociados son monocatenarios y permiten el suministro eficaz de múltiples copias de ácido nucleico al núcleo de la célula. Se prefieren los vectores adenovíricos. Normalmente, los vectores carecerán sustancialmente de cualquier ADN procarionota y pueden comprender diversas secuencias diferentes de ácidos nucleicos funcionales. Como ejemplos de dichas secuencias funcionales se incluyen

polinucleótidos, *por ejemplo*, ADN o ARN, secuencias que comprenden secuencias reguladoras de iniciación y de terminación transcripcional y de traducción, incluyendo promotores (por ejemplo, promotores fuertes, promotores inducibles y similares) y potenciadores que son activos en células musculares.

5 También se incluye, como parte de las secuencias funcionales, una fase de lectura abierta (secuencia de polinucleótidos) que codifica una proteína de interés; pudiendo también incluirse secuencias flanqueantes para la integración dirigida a sitio. En algunas situaciones, la secuencia flanqueante en 5' permitirá la recombinación homóloga, cambiando de este modo la naturaleza de la región de iniciación transcripcional, para proporcionar transcripción inducible o no inducible para aumentar o disminuir el nivel de transcripción, como ejemplo.

10 En general, la secuencia de ácido nucleico deseada a expresar por la célula progenitora derivada de músculo, es la de un gen estructural, o un fragmento funcional, segmento o parte del gen, que es heterólogo con respecto a la célula progenitora derivada de músculo y que codifica un producto proteico o polipeptídico deseado, por ejemplo. El producto codificado y expresado puede ser intracelular, *es decir*, estar retenido en el citoplasma, en el núcleo, o en un orgánulo de una célula, o puede secretarlo la célula. Para la secreción, la secuencia señal natural presente en el gen estructural puede retenerse, o puede utilizarse una secuencia señal que no esté presente de manera natural en el gen estructural. Cuando el polipéptido o péptido es un fragmento de una proteína que es más grande, también puede proporcionarse una secuencia señal de tal manera que, después de la secreción y procesamiento en el sitio de procesamiento, la proteína deseada tendrá la secuencia natural. Como ejemplos de genes de interés para su uso de acuerdo con la presente invención, se incluyen genes que codifican factores de crecimiento celular, factores de diferenciación celular, factores de señalización celular y factores de muerte celular programada. Como ejemplos específicos se incluyen, pero sin limitación, genes que codifican BMP-2 (rhBMP-2), IL-1Ra, Factor IX y conexina 43.

Como se ha mencionado anteriormente, un marcador puede estar presente para la selección de células que contienen la construcción del vector. El marcador puede ser un gen inducible o no inducible y generalmente permitirá la selección positiva bajo inducción, o sin inducción, respectivamente. Como ejemplos de genes marcadores habitualmente utilizados se incluyen neomicina, dihidrofolato reductasa, glutamina sintetasa y similares.

25 El vector empleado generalmente también incluirá un origen de replicación y otros genes que son necesarios para la replicación en las células hospedadoras, como habitualmente emplean los expertos en la materia. Como ejemplo, el sistema de replicación que comprende el origen de replicación y cualquiera de las proteínas asociadas con la replicación, codificadas por un virus particular, pueden incluirse como parte de la construcción. El sistema de replicación debe seleccionarse de tal manera que los genes que codifican los productos necesarios para replicación no transformen finalmente las células derivadas de músculo. Dichos sistemas de replicación se representan mediante adenovirus con replicación defectuosa, construidos como describen, por ejemplo, G. Acsadi et al., 1994, Hum. Mol. Genet 3: 579584, y virus de Epstein-Barr. Son ejemplos de vectores con replicación defectuosa, en particular, vectores retrovíricos con replicación defectuosa, BAG, descrito por Price et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 156; y Sanes et al., 1986, EMBO J., 5:3 1 33. Se entenderá que la construcción génica final puede contener uno o más genes de interés, por ejemplo, un gen que codifica una molécula metabólica bioactiva. Además, utilizando métodos y protocolos conocidos y practicados por los expertos en la materia, se puede emplear ADNc, ADN producido sintéticamente o ADN cromosómico.

40 Si se desea, para modificar por ingeniería las células antes de la inyección *in vivo* de las mismas, pueden utilizarse vectores víricos infecciosos con replicación defectuosa. A este respecto, los vectores pueden introducirse en células productoras de retrovirus para el empaquetado anfotrófico. La expansión natural de las células progenitoras derivadas de músculo en regiones adyacentes evita una gran cantidad de inyecciones en el interior o en el lugar o lugares de interés.

45 En otro aspecto, esta divulgación proporciona suministro génico *ex vivo* a células y tejidos de un hospedador mamífero receptor, incluyendo seres humanos, utilizando las CDM, por ejemplo, células musculares progenitoras tempranas, que se han transducido por virus utilizando un vector adenovírico modificado por ingeniería genética para contener un gen heterólogo que codifique un producto génico deseado. Dicha estrategia *ex vivo* proporciona la ventaja de la transferencia eficaz de genes víricos, que es superior a las estrategias directas de transferencia de genes. El procedimiento *ex vivo* implica el uso de las células progenitoras derivadas de músculo a partir de células aisladas de tejido muscular. La biopsia muscular que servirá como la fuente de células progenitoras derivadas de músculo, puede obtenerse de un lugar de lesión o de cualquier otra zona que el cirujano pueda obtener más fácilmente.

55 Se apreciará que, de acuerdo con la presente invención, utilizando diversos procedimientos conocidos en la materia, pueden obtenerse aislados clonales de la población de células progenitoras derivadas de músculo (es decir, células PP6 o células que se adhieren lentamente), por ejemplo, dilución limitante en placas en medio de cultivo tisular. Los aislados clonales comprenden células genéticamente idénticas que se originan de una célula solitaria, individual. Además, como se ha descrito anteriormente, pueden obtenerse aislados clonales utilizando análisis FACS, seguido de dilución limitante para obtener una célula individual por pocillo para establecer una línea celular clonalmente aislada.

Las CDM se infectan primero con vectores víricos modificados por ingeniería genética que contienen al menos un gen heterólogo que codifica un producto génico deseado, suspenderse en un transportador o excipiente fisiológicamente aceptable, tal como solución salina o solución salina tamponada con fosfato y después administrarse a un lugar apropiado en el hospedador. En consonancia con la presente invención, las CDM pueden administrarse a tejidos corporales, incluyendo hueso, tejido epitelial, tejido conectivo, tejido muscular y diversos tejidos de órganos tales como aquellos órganos que están asociados al sistema digestivo, sistema cardiovascular, sistema respiratorio, sistema reproductor, sistema urológico y sistema nervioso, como se ha descrito anteriormente. Las células inyectadas expresan el producto génico deseado, introduciendo así el producto génico en el hospedador. Los productos génicos introducidos y expresados pueden utilizarse para tratar, reparar o mejorar la lesión, disfunción o enfermedad, debido a que las CDM de la invención los expresan durante largos periodos de tiempo, y a que tienen una supervivencia prolongada en el hospedador.

En estudios de modelos animales de terapia génica mediada por mioblastos, se necesitó la implantación de 10^6 mioblastos por 100 mg de músculo para la corrección parcial de defectos enzimáticos musculares (véase, J. E. Morgan et al., 1988, J. Neural. Sci. 86:137; T. A. Partridge et al., 1989, Nature 337: 176). Extrapolando estos datos, para terapia génica en un individuo de 70 kg, pueden implantarse aproximadamente 10^{12} CDM suspendidas en un medio fisiológicamente compatible en tejido muscular. Esta cantidad de CDM de la invención puede producirse a partir de una sola biopsia de músculo esquelético de 100 mg de una fuente humana (véase más adelante). Para el tratamiento de un lugar de lesión específico, una inyección de las CDM modificadas por ingeniería genética en un tejido o lugar de lesión determinado, comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de células en solución o suspensión, preferentemente, de aproximadamente 10^5 a 10^6 células por cm^3 de tejido a tratar, en un medio fisiológicamente aceptable.

Ejemplos

Ejemplo 1. Enriquecimiento, aislamiento y análisis de CDM según el método de presiembra.

Enriquecimiento y aislamiento de las CDM: las CDM se prepararon como se ha descrito (Patente de Estados Unidos n.º 6.866.842 de Chancellor et al.). Se obtuvieron explantes musculares de las patas traseras de diversas fuentes, concretamente de ratones mdx (distróficos) de 3 semanas de vida (C57BL/10ScSn mdx/mdx, Jackson Laboratories), de ratas hembra normales de 4-6 semanas de vida SD (Sprague Dawley) o de ratones SCID (*severe combined immunodeficiency*, inmunodeficiencia combinada grave). El tejido muscular de cada una de las fuentes animales se diseccionó para eliminar los huesos y se trituró dando lugar a una suspensión. Después, la suspensión se sometió a digestión a través de incubaciones en serie de 1 hora con colagenasa de tipo XI al 0,2 %, dispasa (grado II, 240 unidades) y tripsina 0,1 % a 37 °C. La suspensión celular resultante se pasó a través de agujas de calibre 18, 20 y 22 y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, las células se suspendieron en medio de cultivo (DMEM complementado con suero bovino fetal al 10 %, suero equino al 10 %, extracto de embrión de pollo al 0,5 % y penicilina/estreptomicina al 2 %). Después, las células se presebraron en matraces cubiertos con colágeno (Patente de los Estados Unidos n.º 6.866.842 de Chancellor et al.). Después de aproximadamente 1 hora, el sobrenadante se eliminó de los matraces y se resebró en un matraz cubierto con colágeno reciente. Las células que se adhirieron rápidamente en esta 1 hora de incubación, eran principalmente fibroblastos (Z. Qu *et al.*, citados anteriormente; Patente de Estados Unidos n.º 6.866.842 de Chacellor et al.). El sobrenadante se eliminó y resebró después de que el 30-40 % de las células se hubiese adherido a cada matraz. Después de aproximadamente 5-6 siembras en serie, el cultivo se enriqueció con pequeñas células redondas, denominadas células PP6, que se aislaron de la población de células inicial y se utilizó en estudios posteriores. Las células adherentes aisladas en las siembras tempranas se agruparon entre sí y se denominaron células PP1-4.

Las poblaciones de células mdx PP1-4, mdx PP6, PP6 normales y fibroblastos se examinaron mediante análisis inmunohistoquímico para la expresión de marcadores celulares. En la Tabla 1 se muestran los resultados de este análisis.

TABLA 1

Marcadores celulares expresados en poblaciones de células PP1-4 y PP6.				
	células mdx PP1-4	células mdx PP6	células no PP6	fibroblastos
desmina	+/-	+	+	-
CD34	-	+	+	-
Bcl-2	(-)	+	+	-
Flk-1	nd	+	+	-
Sca-1	nd	+	+	-
M cadherina	-/+	-/+	-/+	-

MioD	-/+	+/-	+/-	-
miogenina	-/+	+/-	+/-	-

Las células mdx PP1-4, mdx PP6, PP6 normales y los fibroblastos se obtuvieron mediante la técnica de presiembra y se examinaron mediante análisis inmunohistoquímico. "-" indica que menos del 2 % de las células mostró expresión; "(-)"; "-/+" indica que el 5-50 % de las células mostró expresión; "+/-" indica que ~ el 40-80 % de las células mostró expresión; "+" indica que >95 % de las células mostró expresión; "nor" indica células normales; "nd" indica que los datos inmunohistoquímicos no están disponibles.

Se observa que los ratones tanto mdx como normales mostraron distribución idéntica de todos los marcadores celulares analizados en este ensayo. Por tanto, la presencia de la mutación mdx no afecta a la expresión del marcador celular de la población derivada de células musculares PP6 aisladas.

Las CDM se cultivaron en un medio de proliferación que contenía DMEM (Medio Eagle Modificado de Dulbecco) con FBS (suero bovino fetal) al 10 %, HS (suero equino) al 10 %, extracto de embrión de pollo al 0,5 %, y penicilina/estreptomicina al 1%, o medio de fusión que contenía DMEM complementado con suero bovino fetal al 2 % y solución de antibióticos al 1 %. Todos los medios proporcionados se adquirieron en Gibco Laboratories (Grand Island, N. Y.).

Ejemplo 2. Enriquecimiento, aislamiento y análisis de CDM según el método de siembra individual.

Enriquecimiento y aislamiento de las CDM

Se aislaron poblaciones de CDM que se adhieren rápidamente y lentamente de músculo esquelético de un sujeto mamífero. El sujeto puede ser un ser humano, una rata, un perro u otro mamífero. El tamaño de la biopsia variaba de 42 a 247 mg.

El tejido de biopsia de músculo esquelético se colocó inmediatamente en medio hipotérmico frío (HYPOTHERMOSOL® (BioLife) complementado con sulfato de gentamicina (100 ng/ml, Roche)) y se conservó a 4 °C. Después de 3 a 7 días, el tejido de biopsia se retiró de la conservación y se inició la producción. Se diseccionó cualquier tejido conectivo o no muscular de la muestra de biopsia. El tejido muscular restante que se utilizó para el aislamiento se pesó. El tejido se desmenuzó en Solución Salina Equilibrada de Hank (HBSS), se transfirió a un tubo cónico y se centrifugó (2.500xg, 5 minutos). Después, el sedimento se resuspendió en una solución Enzimática para Digestión (Liberase Blendzyme 4 (0,4-1,0 U/ml, Roche)). Se utilizaron 2 ml de solución Enzimática para Digestión por 100 mg de tejido de biopsia y se incubó durante 30 minutos a 37 °C en una placa rotatoria. Después, las muestras se centrifugaron (2.500xg, 5 minutos). El sedimento se resuspendió en medio de cultivo y se pasó a través de un tamiz celular de 70 µm. Los medios de cultivo utilizados para los procedimientos descritos en este Ejemplo fueron Medio de Cultivo Endotelial de Cambrex EGM-2 basal complementado con los siguientes componentes: i. suero bovino fetal 10 % (v/v), y ii. Cambrex EGM-2 SingleQuotKit, que contiene: Factor de Crecimiento de Insulínico 1 (IGF-1), Factor de Crecimiento de Fibroblastos Básico (bFGF), Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), Hidrocortisona, Heparina y Ácido Ascórbico. La solución celular filtrada se transfirió después a un matraz de cultivo T25 y se incubó durante 30-120 minutos a 37 °C en CO₂ al 5 %. Las células que se unieron a este matraz se denominaron "células que se adhieren rápidamente".

Después de la incubación, el sobrenadante del cultivo celular se retiró del matraz T25 y se colocó en un tubo cónico de 15 ml. El matraz de cultivo T25 se lavó con 2 ml de medio de cultivo tibio y se transfirió al tubo cónico de 15 ml mencionado anteriormente. El tubo cónico de 15 ml se centrifugó (2.500xg, 5 minutos). El sedimento se resuspendió en medio de cultivo y se transfirió a un nuevo matraz de cultivo T25. El matraz se incubó durante ~2 días a 37 °C en CO₂ al 5 % (las células que se unieron a este matraz se denominaron "células que se adhieren lentamente"). Después de la incubación, el sobrenadante del cultivo celular se aspiró y se añadió al matraz un nuevo medio de cultivo. Después, el matraz volvió al incubador para la expansión. Los pases de cultivo estándar se llevan a cabo de aquí en adelante para mantener la confluencia de células en el matraz de cultivo a menos del 50%. Se utilizó tripsina-EDTA (0,25 %, Invitrogen) para desprender del matraz las células adherentes durante los pases. La expansión típica de las "células que se adhieren lentamente" duró un promedio de 17 días (comenzando desde que se inició el día de la producción) para conseguir un número de células viable total promedio de 37 millones de células.

Una vez conseguido el número de células deseado, las células se recogieron del matraz utilizando Tripsina-EDTA y se centrifugó (2.500xg, 5 minutos). El sedimento se resuspendió en solución BSS-P (HBSS complementado con albúmina de suero humano (2 % v/v, Suero Care Life)) y se realizó el recuento. Después, la solución celular se centrifugó de nuevo (2.500xg, 5 minutos), se resuspendió con medio de criopreservación (CRYOSTOR™ (Biolife) complementado con albúmina de suero humano (2 % v/v, Sera Care Life Sciences)) a la concentración celular deseada, y se envasó en el vial apropiado mediante conservación criogénica. El criovial se colocó en un recipiente

de congelación y se puso en el congelador a -80 °C. Las células se administraron descongelando la suspensión celular congelada a temperatura ambiente con un mismo volumen de solución salina fisiológica y se inyectaron directamente (sin manipulación adicional). La caracterización del linaje de las poblaciones de células que se adhieren lentamente mostró: células miogénicas (87,4 % CD56+, 89,2 % desmina+), endoteliales (0,0 % CD31+),
 5 hematopoyéticas (0,3 % CD45+) y fibroblastos (6,8 % CD90+/CD56-).

Análisis para la caracterización de CDM enriquecidas y aisladas

Después de la disociación del tejido de musculo esquelético de biopsia, recogieron dos fracciones de células basándose en su adhesión rápida o lenta a los matraces de cultivo, como se ha descrito anteriormente. Después, como también se ha descrito anteriormente, las células se expandieron en cultivo con medio de crecimiento y
 10 después se congelaron en medio de criopreservación (3 x 10⁵ células en 15 µl) en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Para el grupo de control, en el tubo se colocaron 15 µl de medio de criopreservación solo. Estos tubos se conservaron a -80 °C hasta la inyección. Inmediatamente antes de la inyección, un tubo se retiró del almacenamiento, se descongeló a temperatura ambiente y se resuspendió con 15 µl de solución de cloruro de sodio al 0,9 %. Después, la solución restante de 30 µl se extrajo en una jeringa de insulina de 0,5 cc con una aguja de calibre 30. El
 15 investigador que realizaba la cirugía y la inyección desconocía lo que contenían los tubos.

El recuento y la viabilidad celular se midieron utilizando un citómetro de flujo Guava y el kit de ensayo Viacount (Guava). CD56 se midió por citometría de flujo (Guava) utilizando anticuerpo anti-CD56 conjugado con PE (1:50, BD Pharmingen) y anticuerpo monoclonal de control de isotipo conjugado con PE (1:50, BD Pharmingen). La desmina se midió por citometría de flujo (Guava) en células fijadas con paraformaldehído (BD Pharmingen) utilizando un anticuerpo monoclonal de desmina (1:100, Dako) y un anticuerpo monoclonal de control de isotipo (1:200, BD Pharmingen). El marcaje fluorescente se realizó utilizando un anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con Cy3 (1:250, Sigma). Entre las etapas, las células se lavaron con tampón de permeabilización (BD Pharmingen). Para el ensayo de creatina quinasa (CK), se sembraron 1 x 10⁵ células por pocillo en una placa de 12 pocillos en un medio inductor de diferenciación. Después de 6 días, las células se recogieron por tripsinización y se centrifugaron en un
 20 sedimento. El sobrenadante de la lisis celular se ensayó para determinar la actividad CK utilizando el kit CK LIQUI-UV® (Stanbio).

Ejemplo 3. Tratamiento de incontinencia urinaria con CDM humanas en un modelo de rata.

El tratamiento con CDM humanas condujo al restablecimiento de la presión del punto de pérdida (PPP) de nuevo a niveles normales en un modelo experimental de incontinencia urinaria por estrés (IUE). Las CDM humanas
 30 inyectadas aliviaron la incontinencia urinaria en un modelo de rata bien establecido.

Estos experimentos demuestran la prueba de concepto y la viabilidad del uso de la terapia celular humana para la aplicación urológica. Las CDM humanas se recogieron de una biopsia de músculo de un tamaño clínicamente obtenible y de los mejores resultados fisiológicos durante hasta cuatro semanas en un modelo de rata inmunocomprometida de IUE. La evaluación histológica demostró atrofia del músculo periuretral solo en el grupo
 35 tratado con inyección simulada. Las CDM humanas estaban presentes en el esfínter uretral de ratas desnudas 4 semanas después de la inyección. El tratamiento con CDM humanas condujo al restablecimiento de la PPP de nuevo a niveles casi normales en un modelo experimental de IUE en la rata desnuda.

Animales: Los experimentos descritos a continuación se realizaron utilizando ratas hembra desnudas (sin pelo) atímicas, de 6-8 semanas de vida (Hsd:RH-rnu, Harlan Laboratory). El Animal Research Care Committee of Children's Hospital of Pittsburgh aprobó los protocolos procedimentales. Las políticas y los procedimientos del laboratorio animal son conforme a los detallados en la guía para el 'Cuidado y uso de animales de laboratorio' publicada por el Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos.
 40

Denervación del nervio ciático (modelo de IUE): Se creó un modelo de IUE bien establecido mediante transección bilateral del nervio ciático. Las ratas recibieron anestesia con isoflurano (2 l/min) y, después de la inducción apropiada, se realizaron incisiones dorsales verticales bilaterales sobre la fosa isquiorrectal. Bajo un microscopio de operación, el nervio ciático de cada lado se identificó y 2 mm de estos troncos se extirparon distalmente a su origen desde la columna vertebral, aunque proximal a la ramificación del nervio pudiendo.
 45

Aislamiento de CDM humanas: Las CDM humanas utilizadas en este estudio se aislaron de tejido músculo esquelético humano (~250 mg) recogido del músculo recto abdominal de un solo donante y se aislaron según la técnica de siembra individual descrita anteriormente. La expansión del cultivo se realizó en un medio de marca sin antibiótico complementado con suero bovino fetal al 10 %. Se realizó análisis de citometría de flujo de las suspensiones CDM para evaluar el contenido miogénico mediante marcaje con anticuerpos de expresión de CD56 (BD Pharmingen). Las CDM se crioconservaron a una concentración de 1x10⁶ células viables/10 µl. Para la inyección simulada, también se prepararon alícuotas distintas solo de medio transportador.
 50

Procedimiento de inyección: Siete días después de la denervación, con anestesia de isoflurano (2 l/min), se realizó una incisión en la línea media baja para exponer la vejiga y la uretra. Las suspensiones de CDM crioconservadas o simuladas se descongelaron con el mismo volumen de solución salina justo antes de la inyección. Para inyectar 10 µl (5x 10⁵ células) de una alícuota de suspensión de CDM o simulada en cada pared lateral de la uretra media se utilizó una jeringa de insulina de 3/10 ml con una guía microscópica. Los animales no denervados, no inyectados y de la misma edad sirvieron como controles.

Medición in vivo de cistometría (CMG) y de la presión del punto de pérdida (PPP): Se realizaron mediciones funcionales *in vivo* 4 semanas después de las inyecciones. Con anestesia de uretano (inyección subcutánea de 1,2 g/kg), se realizó una incisión abdominal en la línea media y los uréteres se ligaron. En el domo de la vejiga, se insertó un catéter transvesical con una punta acampanada (PE-90) para el llenado de la vejiga y para registrar la presión, y el abdomen se cerró. Se conectó una llave de paso de tres vías al tubo transvesical para controlar la presión de la vejiga durante la cistometría (infusión continua de solución salina normal a una velocidad de 0,04 ml/min). El volumen miccional, la capacidad de la vejiga y la presión miccional máxima se controlaron. Después de la cistometría, todas las ratas se sometieron a una sección transversal de la médula espinal a nivel de la T9 para eliminar la actividad vesical espontánea en respuesta al aumento de las presiones intravesicales. Las ratas se instalaron después en una mesa basculante y se colocaron en posición vertical. La presión intravesical se pinzó conectando una jeringa grande de 50 ml al catéter de la vejiga y al transductor de presión mediante un tubo PE-190 y llaves de paso de tres vías. El depósito se instaló en un poste vertical medido para el ajuste de altura controlado. La presión intravesical se incrementó en etapas de 1-3 cmH₂O desde cero hasta la identificación visual de la pérdida; esta presión se identificó como la PPP. Se obtuvieron tres lecturas consecutivas y se realizó un promedio de cada animal y se presentó como una sola PPP.

Tejido recogido e histología: Inmediatamente después de la medición de la PPP, se extrajo todo el complejo de vejiga-uretra. Los tejidos se congelaron instantáneamente utilizando 2-metilbutano preenfriado en nitrógeno líquido. Las criosecciones de la uretra se marcaron con hematoxilina/eosina (H&E) para la histología general y también se marcaron con inmunofluorescencia con anticuerpos anti láminas A/C específicos de ser humano (Novocastra, U.K.) para seguir el destino de las CDM inyectadas.

Análisis Estadístico: los datos se presentan como media ± ET. Se realizaron comparaciones globales entre grupos utilizando análisis de varianza unidireccional (prueba de comparación múltiple de Tukey). Un valor de p menor de 0,05 se aceptó como significativo.

Las suspensiones de CDM inyectadas contenían células miogénicas al 87,7 % (CD56 positivas); las restantes células eran fibroblásticas. No se observaron efectos adversos graves en ninguna rata en los grupos que recibieron inyección de control, simulada y de CDM. Sin embargo, en un animal, se encontró una obstrucción parcial del orificio externo de la uretra (meato urinario) debido a una infección en la zona perineal, tanto en los grupos que recibieron inyección simulada como en los que recibieron inyección de CDM humanas. Por lo tanto, estos animales se excluyeron de los análisis funcionales.

Medición de CMG y PPP: No se observaron diferencias en ningún parámetro cistométrico medido entre los grupos de control, simulado y tratado con CDM humanas (Tabla 2).

Tabla 2. Variables cistométricas en cada grupo.

Parámetros cistométricos	Control	Simulado	CDM	Valor de p
Presión miccional máxima (cmH ₂ O)	29,8±1,4	29,3±2,8	33,7±5,8	0,677
Capacidad de la vejiga (ml)	0,40±0,06	0,36±0,09	0,34±0,03	0,827

La denervación del esfínter de la uretra produjo una disminución significativa de la PPP de los grupos de control a simulados (Figura 1) (43,4±0,6 a 27,8±0,7 cmH₂O, respectivamente; p<0,05). La PPP se restableció a niveles significativamente más altos después de la inyección de CDM (35,7±2,0 cmH₂O) cuando se comparó con el grupo de inyección simulada (p<0,05); sin embargo, a las 4 semanas, este nivel de restablecimiento permaneció significativamente más bajo que el del grupo de control (p<0,05).

Análisis histológico: En las ratas denervadas, el esfínter uretral proximal era atrófico a las 4 semanas en comparación con el control (Figura 2). Los núcleos humanos presentes en el tejido del esfínter de rata se revelaron mediante marcaje inmunofluorescente utilizando un anticuerpo específico de ser humano contra las proteínas de la envoltura nuclear, láminas A y C. Los tejidos del grupo inyectado con CDM mostraron un claro marcaje positivo de numerosos núcleos humanos incorporados en el músculo del esfínter externo (estriado) (Figura 3).

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de preparación de un agente de relleno de tejido blando de las vías urinarias, que comprende células progenitoras derivadas de músculo (CDM), comprendiendo el proceso:
- 5 (a) suspender las células de músculo esquelético aisladas de un ser humano, en un primer recipiente de cultivo celular durante entre 30 y 120 minutos;
- (b) decantar los medios del primer recipiente de cultivo celular a un segundo recipiente de cultivo celular;
- (c) cultivar las células en el segundo recipiente de cultivo celular durante 1-3 días para permitir que las células restantes que permanecen en los medios se unan a las paredes del segundo recipiente de cultivo celular;
- 10 (d) aislar las células de las paredes del segundo recipiente de cultivo celular, en el que las células aisladas son CDM.
2. El proceso de la reivindicación 1, en el que las células de músculo esquelético humano aisladas se enfrían a una temperatura inferior a 10 °C y se conservan durante 1-7 días antes de resuspenderlas en la etapa (a), y en el que el proceso de obtención de las CDM comprende adicionalmente las etapas de:
- (e) cultivar las CDM aisladas en la etapa (d) para expandir su número;
- 15 (f) congelar las CDM preparadas en la etapa (e) a una temperatura inferior a -30 °C; y
- (g) descongelar las CDM preparadas en la etapa (f).
3. Una población de células que contiene las CDM para su uso en un método de tratamiento de la incontinencia urinaria por estrés (IUE) en un sujeto humano que lo necesite, en la que la población de células que contiene las CDM se ha obtenido mediante un proceso que comprende:
- 20 (a) suspender células aisladas de músculo esquelético del sujeto humano en un primer recipiente de cultivo celular durante entre 30 y 120 minutos para adherir una primera población de células al recipiente y dejar en el recipiente una segunda población de células no adherida y en un medio de cultivo;
- (b) transferir el medio de cultivo y la segunda población de células desde el primer recipiente de cultivo celular a un segundo recipiente de cultivo celular;
- 25 (c) cultivar las células en el segundo recipiente de cultivo celular durante 1-3 días para permitir a las células de la segunda población de células unirse al segundo recipiente de cultivo celular;
- (d) aislar las células unidas al segundo recipiente de cultivo celular para obtener dicha población de células que contenga las CDM.
- 30 4. El uso de una población de células que contiene las CDM en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de IUE en un sujeto humano que lo necesite, en la que la población de células que contiene las CDM se ha obtenido mediante un proceso que comprende:
- (a) suspender células aisladas de músculo esquelético del sujeto humano en un primer recipiente de cultivo celular durante entre 30 y 120 minutos para adherir una primera población de células al recipiente y dejar en el recipiente una segunda población de células no adherida y en un medio de cultivo;
- 35 (b) transferir el medio de cultivo y la segunda población de células desde el primer recipiente de cultivo celular a un segundo recipiente de cultivo celular;
- (c) cultivar las células en el segundo recipiente de cultivo celular durante 1-3 días para permitir que las células de la segunda población de células se unan al segundo recipiente de cultivo celular;
- 40 (d) aislar las células unidas al segundo recipiente de cultivo celular para obtener dicha población de células que contenga las CDM.
5. Una población de células que contiene las CDM para el uso de la reivindicación 3, o el uso de la reivindicación 4, en la que el tratamiento de la IUE comprende una inyección en la uretra o una inyección en el músculo periuretral.

ES 2 678 416 T3

6. Una población de células que contiene las CDM para el uso de la reivindicación 3, o el uso de la reivindicación 4, en la que la población que contiene las CDM, se cultiva para expandir su número antes del tratamiento de la IUE.
7. Una población de células que contiene las CDM para el uso de la reivindicación 3, o el uso de la reivindicación 4, en la que después de la etapa (d), la población que contiene las CDM, se expande en nuevos medios de cultivo durante entre 10 y 20 días, y preferentemente durante 17 días.
8. Una población de células que contiene las CDM para el uso de la reivindicación 3, o el uso de la reivindicación 4, en la que el músculo esquelético del sujeto humano se enfría a una temperatura inferior a 10 °C o se enfría a una temperatura entre la temperatura ambiente y 4 °C y se conserva durante 1-7 días.

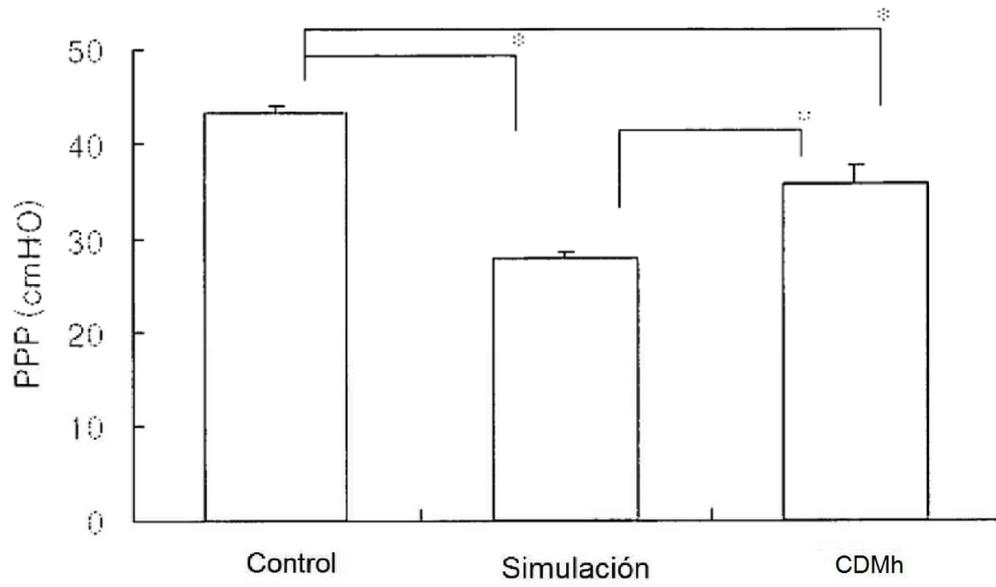


Figura 1

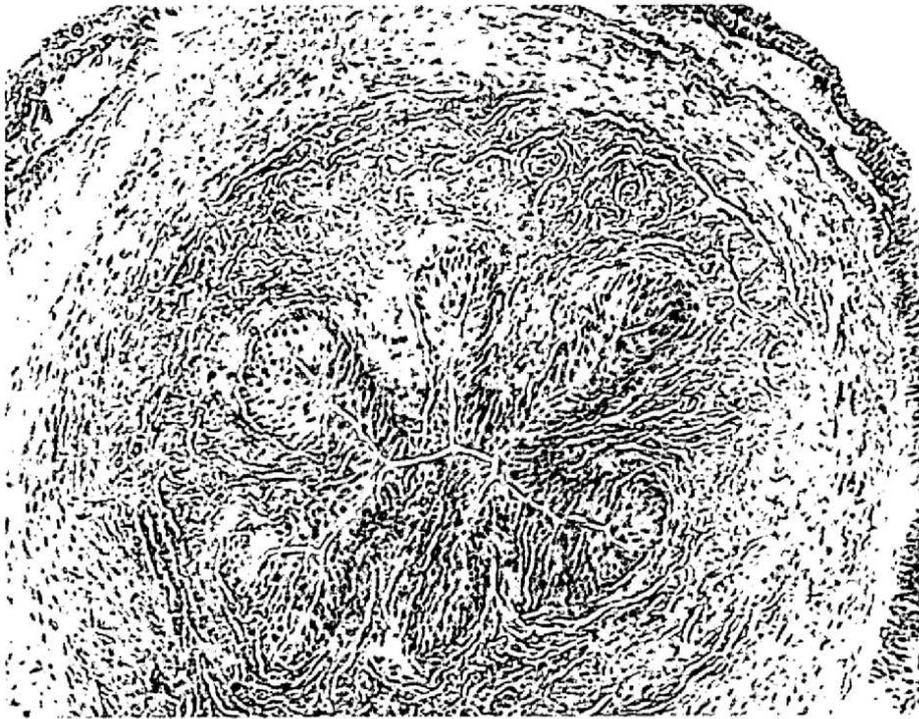


Figura 2A

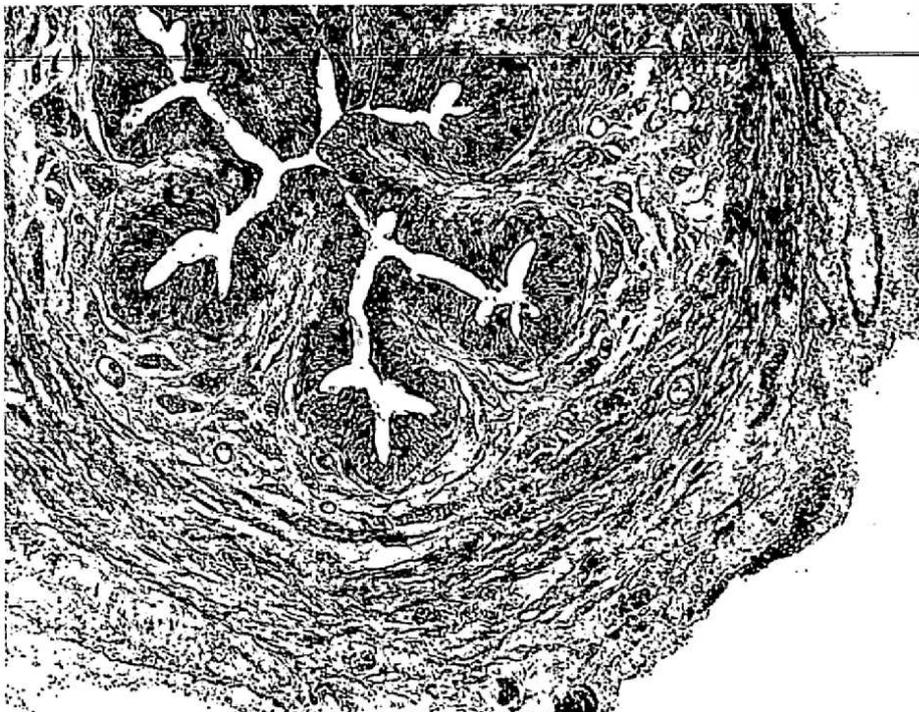


Figura 2B

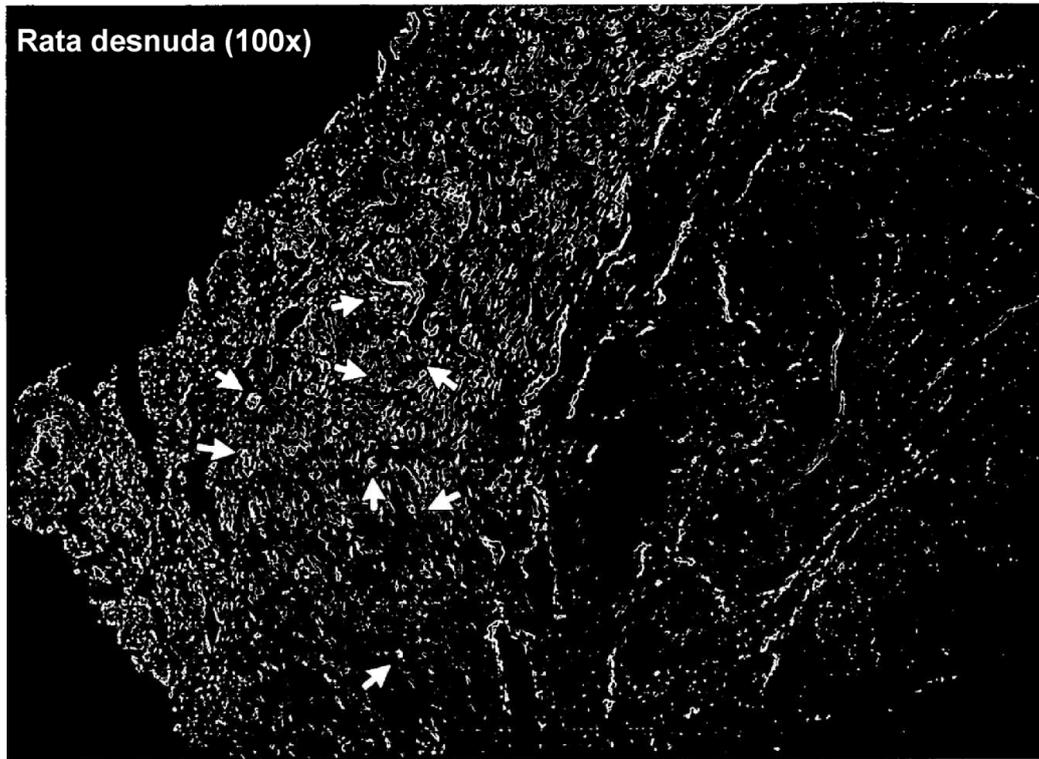


Figura 3