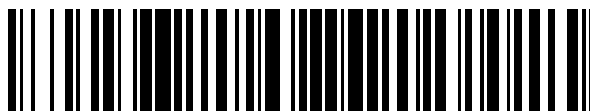


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 532**

51 Int. Cl.:

A61K 35/34 (2015.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2008** **PCT/IB2008/000829**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2008** **WO08104883**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2008** **E 08737391 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018** **EP 2120976**

54 Título: **Procedimientos de tratamiento de incontinencia anal usando mioblastos**

30 Prioridad:

28.02.2007 US 892095 P
27.02.2008 US 38410

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.01.2019

73 Titular/es:

INNOVACELL BIOTECHNOLOGIE AG (100.0%)
Mitterweg 24
6020 Innsbruck, AT

72 Inventor/es:

MARKSTEINER, RAINER

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 696 532 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

Procedimientos de tratamiento de incontinencia anal usando mioblastos

A. Campo de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para prevenir o tratar la incontinencia anal. En particular la presente invención se refiere a la prevención o el tratamiento de la incontinencia anal inyectando mioblastos en el esfínter anal externo.

B. Antecedentes de la invención

La capacidad de mantener la continencia es fundamental para nuestro bienestar como seres sociales. La pérdida de continencia anal da como resultado discapacidades físicas, fisiológicas y sociales. En general se cree que la incontinencia anal es padecida principalmente por personas ancianas y discapacitadas, sin embargo, estos síntomas pueden producirse en personas de todas las edades. El espectro de la incontinencia anal, es decir, la pérdida de control del contenido del intestino, varía de marcas de heces en la ropa interior al escape de flatos hasta episodios masivos de defecación descontrolada de heces blandas o sólidas. Las razones de esto pueden ser múltiples y complejas. Independientemente de la calidad de vida extremadamente alterada para el individuo afectado, la continencia anal alterada da como resultado un factor de coste que no debe subestimarse para el sistema sanitario público. En los Estados Unidos se gasta más de 400 millones de dólares al año para programas de ayuda a la incontinencia anal. Asimismo, la incontinencia anal es la segunda razón más frecuente para hospitalización en residencias de ancianos (con más frecuencia que la demencia). Un tercio de las personas ancianas en residencias u hospitales son incontinentes para las heces.

Se han estudiado aparatos de incontinencia anal en más detalles en la última década debido a la posibilidad de técnicas de captura de imágenes endoanales. Esto también ha conducido a un mejor entendimiento del mecanismo de la incontinencia anal y los factores responsables para mantener la continencia anal. La continencia anal requiere la coordinación de diferentes funciones anatómicas y fisiológicas. Una sensibilidad intacta asegura la percepción del estado de llenado rectal y el reconocimiento de la cualidad de las heces. Una inervación motora funcional permite que el esfínter responda a una "petición de cierre" anal aumentada de una manera apropiada. Finalmente, un aparato de esfínter intacto posibilita la oclusión del canal anal. La disfunción de una de estas funciones da como resultado una alteración de la continencia anal.

Dos músculos esqueléticos son importantes para el control voluntario de los órganos de continencia: el *Musculus sphincter ani externus*, y el *Musculus puborectalis* como parte del *Musculus levator ani*. Es probable que el restante *Diaphragma pelvis* (*M. pubococcygeus*, *M. ischiococcygeus*, *M. iliococcygeus*) desempeñe un papel más o menos de apoyo. El esfínter anal externo es sustentado por el *N. pudendus*. Ambos músculos, el *Musculus sphincter ani externus* y el *Musculus puborectalis*, pueden mantener un tono constante directamente proporcional al volumen/cantidad de llenado rectal, reduciéndose ese tono con el inicio del proceso de defecación. El tono basal constantes del *M. puborectalis* da como resultado una "contorsión" de la transición anorrectal hacia la sínfisis que forma un ángulo de 90° entre el canal anal y el recto. Este ángulo anorrectal también contribuye al mantenimiento de la continencia anal. Una función adicional del *M. puborectalis* es retener heces al menos parcialmente formadas, si el esfínter anal externo ha sido dañado.

El *M. puborectalis* no puede controlar los flatos o las heces líquidas. La continencia anal para estos tipos de heces es proporcionada por una interacción de los esfínteres anales interno y externo. Los cojines hemorroidales proporcionan una oclusión hermética. En el estado en reposo el canal anal se ocluye por la actividad tónica constante de los esfínteres anales externos y la presión en reposo basal del esfínter anal interno. El esfínter anal interno, que es una continuación y engrosamiento de la capa de músculo liso del colon, proporciona aproximadamente 75-85 % de la presión basal del canal anal cerrado. La actividad de este componente de músculo liso está completamente inhibida por una distensión rectal, el denominado reflejo inhibitor anal rectal. Esta relajación está acompañada de una contracción refleja del esfínter anal y *M. puborectalis* para evitar la defecación.

Para la diferenciación de las diferentes cualidades de las heces - heces sólidas, heces líquidas, flatos, etc. - la sensibilidad anal desempeña un papel crucial. Debido a su inervación sensorial extensiva el canal anal es muy adecuado para este objetivo. Para la continencia anal, con respecto a aspectos sensoriales, en principio son responsables dos componentes principales: Por un lado el recto reconoce el nivel de llenado de la ampolla rectal, por otro lado la parte superior del canal anal es capaz de determinar el tipo de contenido intestinal. La retroalimentación sensorial de estos dos sensores es esencial para la actividad coordinada de la musculatura del esfínter. Esto proporciona la sorprendente capacidad de dejar pasar flatos mientras se mantiene simultáneamente la continencia de heces líquidas y sólidas.

En el contexto de nacimientos vaginales aproximadamente de 0,5 a 2 % de todas las mujeres padecen una rotura perineal del tercer o cuarto grado (rotura de la membrana mucosa anal). Actualmente, varios estudios están intentando descubrir los factores de riesgo para la aparición de roturas perineales de alto grado. El parto con fórceps, la primiparidad, un peso del niño de más de 4 kg, así como anomalías posicionales del niño se consideran factores predisponentes que dan como resultado un aumento significativo de la frecuencia de una lesión del perineo.

- En la mayoría de los casos, los primeros auxilios aplicados en casos de roturas perineales son inadecuados. En un estudio que abarcaba a 38 mujeres, que habían sido tratadas quirúrgicamente después de una ruptura perineal del tercer grado, 14 mujeres se volvieron incontinentes para heces tres meses después: nueve para heces sólidas o blandas, cinco para flatos. Otro estudio comparó mujeres con una rotura perineal del tercer grado con mujeres sin rotura perineal. Se ha mostrado que la mitad de las mujeres con rotura perineal padecieron incontinencia anal o una urgencia de defecación imperativa. Usando medios ecográficos se ha mostrado, que en el 85 % de los casos pudo detectarse un defecto del esfínter anal en estas mujeres, mientras que dicho defecto solamente se detectó en el 33 % de las mujeres sin rotura perineal evidente.
- La identificación de las razones para estos malos resultados funcionales requiere estudios adicionales. Es posible que un edema tisular y la dilatación del tejido inmediatamente después del parto dificulte una reconstrucción anatómica exacta. Sin embargo, en la mayoría de los casos no se identifican lesiones graves o se tratan quirúrgicamente de una manera inadecuada. Una incontinencia anal transitoria después de una rotura perineal de grado 3 o 4 es predictiva de la persistencia de incontinencia anal.
- En un estudio adicional, se sometió a mujeres con un defecto de esfínter anal persistente después de una rotura perineal de grado 3 o 4 a reparación de solapamiento anterior. Antes del tratamiento quirúrgico las mujeres eran incontinentes para heces sólidas así como blandas. El 80 % de las mujeres tratadas de esta manera recuperaron la continencia anal completa; solamente algunas permanecieron incontinentes para flatos. Sin embargo, estos resultados prometedores se rectificaron en estudios a largo plazo. Cinco años después, solo aproximadamente el 50 % de las pacientes relevantes indicaron una mejora "relativa" de su estado de continencia anal. Estudios fisiológicos verificaron estos resultados. Parece que las lesiones traumáticas, como resultado de dar a luz, también afectan a la inervación motora.
- Los estudios con mujeres, que tienen una rotura perineal de grado 3 o 4 y que muestran los síntomas de incontinencia anal, muestran que se produjo una agravación significativa de los síntomas después de un nacimiento vaginal adicional. Incluso las mujeres que permanecieron inicialmente sin síntomas después de rotura perineal, padecieron después de un parto vaginal adicional con mucha más frecuencia síntomas de incontinencia anal.
- Como se ha mencionado anteriormente, los procedimientos de tratamiento actuales se dirigen principalmente a la corrección quirúrgica del desgarro del esfínter. Esto conduce a una mejora a corto plazo de los síntomas mencionados anteriormente.
- Pueden tratarse formas leves de incontinencia anal con procedimientos de tratamiento conservativos, que pueden dar como resultado una mejora de los síntomas. Sin embargo, en casos más graves, la intervención quirúrgica respectiva da con frecuencia como resultado una mejora a corto plazo con una posibilidad de éxito pequeña.
- Los procedimientos conservativos de tratamiento comprenden un cambio dietético además de un aumento de la captación de fibras así como en casos con sensibilidad anal alterada, el uso de tampones anales y enemas rectales. El consumo de loperamid, si es necesario, también en combinación con sustancias de unión a ácido biliar, reduce la movilidad intestinal y aumenta la presión del músculo del esfínter anal (Hallgren y col., 1994). Una nueva forma de terapia utiliza estrógeno aplicado localmente para mujeres postmenopáusicas, sin embargo, faltan estudios aleatorios (Donnelly y col., 1997).
- Una terapia de retroalimentación biológica es, para los pacientes, sencilla, barata y sin efectos secundarios. El objetivo de dichos entrenamientos es un aumento del tono del esfínter anal como reacción a un aumento del llenado rectal. Se aplican estos enfoques: 1. Un entrenamiento coordinado, en el que el paciente aprende a reaccionar a un aumento del llenado rectal mediante una contracción del esfínter. 2. Entrenamiento de los mecanismos sensoriales para reconocer cantidades de llenado rectal menores. 3. La contracción aislada del esfínter anal y reducción de estados de pánico. Las perspectivas de éxito para este procedimiento están entre 38 % y 100 %, en el que la interpretación de "éxito" varía significativamente.
- Sin embargo, varios pacientes distintos requieren una intervención quirúrgica: Con más frecuencia, se aplica reparación del esfínter (interproximal o solapante) para el tratamiento agudo de lesiones traumáticas después de dar a luz, pero también de forma secundaria después de lesiones del esfínter anal provocadas por otras circunstancias. Las perspectivas a corto plazo son buenas, los resultados a largo plazo son malos (Malouf y col., 2000).
- Una transposición muscular no estimulada (*M. gracilis* o *M. gluteus*) muestra buenos resultados en niños. Sin embargo, el estado mejorado se deteriora con los años. Asimismo, la documentación de datos de este procedimiento quirúrgico es insuficiente. El procedimiento se reemplazó casi completamente por la introducción de transposiciones musculares estimuladas.
- Puede aplicarse a los pacientes un neoesfínter estimulado eléctricamente usando el *M. gracilis*, cuando los procedimientos convencionales fracasen. La tasa de complicación es, sin embargo, muy alta, lo que indica que la cirugía debería realizarse en centros que tengan una gran experiencia con esta técnica.
- El esfínter anal artificial, un sistema de esfínter hecho de silicio, cuyo manguito se enrolla alrededor del canal anal y se llena para proporcionar el cierre del canal anal, solo se aplica a pacientes, que tienen además de una forma muy

fuerte de incontinencia anal también los prerequisites físicos y fisiológicos para manejar dicho sistema correctamente. La tasa de morbilidad después de dicha implantación es muy alta y en aproximadamente un tercio de los pacientes es necesaria una explantación. Esta cirugía también está reservada a centros que se hayan especializado en gran medida en este procedimiento.

- 5 La estimulación del nervio sacro es una técnica prometedora, pero solamente si se aplica a un grupo muy pequeño de pacientes, altamente seleccionado. En este enfoque se implanta un electrodo fino en el foramen 3 del hueso sacro. El esfínter anal debería estar intacto. Aún no están disponibles resultados a largo plazo.

Solamente está disponible una cantidad muy pequeña de datos para el tema de "biomateriales inyectables e incontinencia fecal". Adicionalmente, faltan procedimientos operativos normalizados para este enfoque así como resultados que abarquen periodos de observación más largos (Vaizey y col., 2005). Algunos ejemplos de dicho material son:

- 10
- Polyref: una mezcla de politetrafluoroetileno, glicerol y polisorbato; induce granulomas de cuerpos extraños.
 - Implantes de PTQ: Denominado formalmente macropastique; se aplicó con el nombre de biplastic en casos de incontinencia anal en los años 2001 y 2002. La alta viscosidad del producto complicó una inyección precisa.
- 15 Hasta la fecha solo se ha publicado el tratamiento de un total de 16 pacientes con incontinencia de heces, no están disponibles datos de observación a largo plazo (Malouf y col., 2001; Kenefick y col., 2002). Existe riesgo de formación de granulomas de cuerpos extraños.

- 20 Para incontinencia urinaria por estrés se ha propuesto inyectar células procedentes de músculo en el sitio lesionado para aliviar la incontinencia urinaria por estrés. Sin embargo, la incontinencia urinaria por estrés no es comparable a la incontinencia anal ya que las causas de las dos enfermedades diferentes son completamente diferentes. Además, los dos sistemas (urinario frente a anal) tampoco tienen una función similar. El tracto urinario tiene que proporcionar suficiente control solamente de líquidos. El recto es capaz de controlar contenidos sólidos, líquidos así como gaseosos. Esto necesita requisitos sensoriales completamente diferentes. Por lo tanto, la anatomía es bastante diferente entre el tracto genitourinario y el recto. Por ejemplo, aunque hay un músculo de esfínter anal externo que rodea el recto, no hay ningún equivalente que rodee completamente la uretra. Asimismo, apenas pueden encontrarse músculos estriados en el dorso de la uretra en el hombre adulto, mientras que el esfínter anal externo del recto es un músculo estriado.
- 25

El documento WO 96/40304 desvela el uso de células procedentes de músculo junto con polímeros biocompatibles inyectables para su uso en el tratamiento de la incontinencia.

- 30 El documento US 2003/077244 desvela hidrogeles de poliácridamida como dispositivos endoprostéticos para refuerzo de la uretra, el recto o el colon, o uréter para aumentar la resistencia en estos conductos para el tratamiento de la incontinencia urinaria, la incontinencia anal y el reflujo vesicoureteral.

- 35 El documento US 2006/257445 desvela una suspensión de células musculares lisas en una solución de polímero no proteico biodegradable que forma un hidrogel reticulado iónicamente que tiene las células dispersadas en el mismo cuando se inyecta *in vivo* en la pared de una luz en las cercanías o alrededor de las cercanías de un esfínter para tratar.

Sin embargo, ninguna de las solicitudes anteriormente mencionadas desvela el uso de mioblastos para la prevención y el tratamiento de la incontinencia anal.

- 40 El documento US 2007/224173 desvela un sistema y procedimiento para obtener una solución de células heterólogas para introducción en el cuerpo.

El documento WO 2008/031957 desvela un procedimiento de terapia que comprende el tratamiento funcional de esfínteres con células seleccionadas de células madre de músculo esquelético, células madre de músculo, células madre precursoras de músculo, mioblastos o células satélite, en el que la terapia comprende el tratamiento funcional de la incontinencia anal. La solicitud no desvela la aplicación de células al esfínter anal externo.

- 45 El documento WO 2008/076435 desvela el uso de células progenitoras procedentes de músculo (MDC) que muestran supervivencia a largo plazo después de la introducción en tejidos blandos, procedimientos para aislar MDC y procedimientos para usar composiciones que contienen MDC para el aumento de tejidos blandos humanos o animales. La aplicación de las células se realiza en el esfínter anal.

- 50 A la vista de las limitaciones anteriormente mencionadas y complicaciones del tratamiento de la incontinencia anal, son necesarias en la técnica nuevas modalidades eficaces en esta área.

Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona terapia de inyección de células musculares usando células procedentes de músculos como un medio mejorado y nuevo para prevenir y tratar la incontinencia anal. Como solo una ventaja, la inyección de células procedentes de músculo puede ser autóloga, de modo que haya reacciones

alérgicas mínimas, o no haya reacciones alérgicas. No se absorben células miógenas tales como mioblastos; por lo tanto, se puede proporcionar una mejor tasa de mejora y cura.

Los mioblastos, los precursores de fibras musculares, son células musculares mononucleadas que difieren de muchas maneras de otros tipos de células. Los mioblastos se fusionan de forma natural para formar miotubos multinucleados postmitóticos que dan como resultado la expresión a largo plazo y el suministro de proteínas bioactivas. Se han usado mioblastos para suministro génico a músculo para enfermedades relacionadas con músculos, tales como distrofia muscular de Duchenne, así como para enfermedades no relacionadas con músculos, por ejemplo, suministro génico de adenosina desaminasa humana para el síndrome de deficiencia de adenosina desaminasa; transferencia génica de proinsulina humana para diabetes mellitus; transferencia génica para expresión de tirosina hidroxilasa para enfermedad de Parkinson; transferencia y expresión de Facto IX para hemofilia B, suministro de hormona del crecimiento humana para retardo del crecimiento.

El uso de mioblastos para tratar la degeneración muscular, para reparar el daño tisular o tratar enfermedad se desvela en patentes de los Estados Unidos 5.130.141 y 5.538.722. Además, se ha empleado trasplante de mioblastos para la reparación de disfunción miocárdica (Robinson y col., 1995; Murry y col., 1996; Gojo y col., 1996; Zibaitis y col., 1994).

La presente invención proporciona una célula procedente de músculo para su uso en la prevención y el tratamiento de la incontinencia anal en un sujeto, en el que dichas células son células mioblásticas, en el que dichas células son autólogas o heterólogas con respecto a dicho sujeto, y en el que la célula procedente de músculo debe administrarse en el esfínter anal externo.

Se describen procedimientos nuevos y eficaces para la prevención o el tratamiento de la incontinencia anal, suministrando células procedentes de músculos a tejidos musculares del recto, al sistema de esfínter anal y al esfínter anal externo. Por lo tanto, se describen procedimientos para prevenir o tratar la incontinencia anal, en los que el procedimiento comprende las siguientes etapas: (a) introducción de un dispositivo de inyección a través de la piel de un paciente, (b) mover el dispositivo de inyección hacia delante hasta que el dispositivo de inyección alcance el sitio de inyección de interés y (c) inyección de células procedentes de músculo obtenidas previamente mediante dispositivo de inyección en dicho sistema de inyección de interés, en el que el sitio de inyección de interés es, o está adyacente a, tejido muscular que proporciona la continencia anal. La etapa (c) comprende además retirar el dispositivo de inyección del sitio de interés mientras que, al mismo tiempo, dichas células procedentes de músculo se distribuyen de dicho dispositivo de inyección a lo largo de al menos una parte del canal de inyección creado por el movimiento de dicho dispositivo de inyección en el sitio de inyección de interés, creando de este modo una banda de inyección. La banda de inyección puede no ser de más de aproximadamente 600 µm de diámetro y/o la longitud de la banda de inyección puede ser tan larga como el músculo que se inyecta. El tejido muscular que proporciona la continencia anal es el esfínter anal externo. También se describe que el tejido muscular para continencia anal es *M. puborectalis*.

Adicionalmente, se describen procedimientos para prevenir o tratar la incontinencia anal, en los que el procedimiento comprende las siguientes etapas: (a) introducción de un dispositivo de inyección en el recto de un paciente, (b) mover el dispositivo de inyección hacia delante a lo largo del recto hasta que el dispositivo de inyección alcance el plano del sitio de inyección de interés; (c) penetrar la pared rectal con el dispositivo de inyección; y (d) mover el dispositivo de inyección hacia delante hasta que el dispositivo de inyección alcance el sitio de inyección de interés, y, posteriormente, (e) inyección de células procedentes de músculo previamente obtenidas mediante el dispositivo de inyección en el sitio de inyección de interés, en el que el sitio de inyección de interés es, o está adyacente a, tejido muscular que proporciona la continencia anal. La etapa (e) comprende además retirar el dispositivo de inyección del sitio de interés mientras que, al mismo tiempo, dichas células procedentes de músculo se distribuyen de dicho dispositivo de inyección a lo largo de al menos una parte del canal de inyección creado por el movimiento de dicho dispositivo de inyección en el sitio de inyección de interés, creando de este modo una banda de inyección. En una realización la banda de inyección puede no ser de más de aproximadamente 600 µm de diámetro y/o la longitud de la banda de inyección puede ser tan larga como el músculo que se inyecta.

En una realización las células procedentes de músculo para inyectar pueden ser mioblastos autólogos. Cuando se practica la presente invención estos tipos celulares pueden inyectarse en o adyacentes a un tejido muscular lesionado que proporciona la continencia anal, es decir un esfínter anal externo lesionado como medio de prevención o tratamiento para la incontinencia anal.

Las células procedentes de músculo previamente obtenidas, es decir, obtenidas antes de practicar los procedimientos de la presente invención, pueden ser células cultivadas que pueden generar cantidades suficientes de células musculares para inyecciones repetidas. Como alternativa, las células procedentes de músculo son células primarias.

Por lo tanto, la presente invención también proporciona un enfoque de profilaxis sencillo o procedimiento de tratamiento para mujeres y hombres con incontinencia anal o en riesgo de desarrollar incontinencia anal usando mioblastos autólogos para potenciar sus esfínteres anales. Dicha terapia de células procedentes de músculo permite reparar y mejorar el esfínter anal dañado. De acuerdo con la presente invención el tratamiento comprende una

aspiración por aguja para obtener mioblastos, por ejemplo, y un tratamiento de seguimiento breve para inyectar células cultivadas y preparadas en el paciente. También según la presente invención, pueden emplearse inyecciones de células musculares autólogas usando mioblastos recogidos de y cultivados para un paciente con incontinencia anal específico como un agente no alérgico para reforzar la pared rectal, potenciando de este modo la coaptación y mejorando el músculo del esfínter anal. En este aspecto de la invención, se realiza trasplante de células musculares autólogas, como se ha analizado anteriormente.

Se contempla que puede implementarse cualquier procedimiento o composición descrito en el presente documento con respecto a cualquier otro procedimiento o composición descrito en el presente documento.

El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con el término "comprender" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es coherente con el significado de "uno o más", "al menos uno", y "uno o más de uno".

El término "aproximadamente" significa que se contemplan el valor indicado, más o menos 5 % del valor indicado, o el error típico para mediciones del valor dado. La invención será mejor apreciada y entendida cuando se considere junto con la siguiente descripción y el dibujo adjunto.

Breve descripción de los dibujos

El siguiente dibujo forma parte de la presente memoria descriptiva y se incluye para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia al dibujo en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

La FIG. 1 ilustra la "puntuación de Wexner" en 10 pacientes humanos antes y después de la implantación de mioblastos autólogos en el esfínter anal externo. En la "Fase 1" (0-4 semanas) todos los pacientes tuvieron que realizar entrenamiento del suelo pélvico y electroestimulación de la misma manera que después de la inyección celular. La biopsia muscular se tomó solamente después de reducción no significativa de la "puntuación de Wexner". En el tiempo de cultivo celular (aproximadamente 6 semanas) se instruyó a los pacientes para que continuaran con el entrenamiento del suelo pélvico (Fase 2). Después de la implantación de los mioblastos expandidos (flecha roja) los pacientes repitieron el programa de entrenamiento de la Fase 1. Puede verse una reducción significativa de la "Puntuación de Wexner" después de la inyección celular en contraste con la electroestimulación sola.

Descripción detallada de la invención

A. Definiciones

La expresión "incontinencia anal", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier pérdida no deseada de contenido del intestino a través del ano, como flato, heces líquidas o sólidas. La expresión comprende los tres grados de gravedad: Grado 1 = solamente gaseosa, grado 2 = heces líquidas y blandas, grado 3 = heces sólidas, formadas.

La expresión "esfínter anal" o "aparato de esfínter anal", como se utiliza en el presente documento, se refiere en particular al *Musculus sphincter ani externus*, y el *Musculus puborectalis* como parte del *Musculus levator ani*. Sin embargo también incluye *M. pubococcygeus*, *M. ischiococcygeus*, *M. iliococcygeus* y *N. pudendus*.

La expresión "célula procedente de músculo" se refiere a mioblastos, que pueden ser células primarias y/o células cultivadas *in vitro* y como alternativa a otras células con potencial miógeno (por ejemplo, de tejido liposucionado u otros tejidos que albergan células madre tales como médula ósea). La expresión también comprende células procedentes de tejido adiposo que pueden aislarse y usarse para cultivo de células del músculo esquelético.

El término "penetración", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un procedimiento de introducción de un dispositivo de inyección, por ejemplo una aguja en un tejido corporal sin efectuar aún el procedimiento de inyección.

El término "inyección", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la expulsión de una solución de inyección que comprende células anteriormente mencionadas de un dispositivo de inyección a un sitio específico dentro del cuerpo humano, en particular a o adyacente a tejido muscular que proporciona la continencia anal. El procedimiento de inyección puede ser, pero sin limitación, estático, es decir, el dispositivo de inyección permanece en la posición alcanzada. Como alternativa, el procedimiento de inyección es dinámico. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente invención la inyección se realiza simultáneamente con la retracción del dispositivo de inyección del sitio de inyección.

La expresión "sitio de inyección", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un sitio en el cuerpo humano, tal como cerca de o que es tejido muscular que proporciona la continencia anal, en el que se inicia el procedimiento de inyección. No es necesario que el sitio de inyección sea idéntico al sitio en el que termina el procedimiento de inyección.

La expresión "dispositivo de inyección", como se utiliza en el presente documento, se refiere en general a cualquier

dispositivo adecuado para penetrar en tejido humano para alcanzar un sitio de inyección de interés y capaz de suministrar soluciones, en particular soluciones que comprenden células procedentes de músculo al sitio de inyección de interés.

5 La expresión "incontinencia de heces", como se utiliza en el presente documento, se refiere solo a la pérdida no deseada de líquido o heces formadas a través del ano.

La expresión "incontinencia pasiva", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una falta de reconocimiento sensorial de la pérdida de heces. Esto comprende valores de presión basales anales bajos y una capacidad sensorial deficiente de la mucosa anal y rectal.

10 "Defecación imperativa" o "urgencia imperativa", como se utilizan en el presente documento, se refieren a la incapacidad de una persona para retrasar la defecación durante más de cinco minutos. Dicho paciente tiene que ir al servicio inmediatamente.

B. Células y tipos celulares para su uso en la presente invención

15 Varias células procedentes de músculo y/o miógenas son adecuadas para su uso con los procedimientos de la presente invención. Los ejemplos no limitantes de dichas células incluyen mioblastos, fibroblastos y células madre procedentes de músculo que residen en tejido muscular. Podrían usarse células con potencial miógeno (por ejemplo, de tejido liposucionado u otros tejidos que albergan células madre (médula ósea) o células procedentes de tejido adiposo).

20 En la presente invención, se usan mioblastos en la reparación del aparato de esfínter anal. En particular, las células para su uso en la presente invención tienen que ser capaces de fusionarse y establecer un citoesqueleto contráctil, orientado (secuencia de actina-miosina).

25 De acuerdo con la presente invención, los mioblastos pueden ser células primarias o células cultivadas. Pueden ser histocompatibles (autólogos) o no histocompatibles (alogénicos) para el receptor, incluyendo seres humanos. Son realizaciones particulares en la presente invención mioblastos y células procedentes de músculo, incluyendo mioblastos autólogos y células procedentes de músculo que no serán reconocidas como extrañas para el receptor. A este respecto, los mioblastos pueden emparejarse frente al locus mayor de histocompatibilidad (MHC o HLA en seres humanos). Dichas células de MHC o HLA emparejado pueden ser autólogas. Como alternativa, las células pueden ser de una persona que tiene el mismo perfil de antígeno de MHC o HLA o uno similar. El paciente también puede ser tolerante a los antígenos alogénicos del MHC. La presente invención también abarca el uso de células que carecen de antígenos del MHC de clase I y/o II, tales como los descritos en la patente de los Estados Unidos n.º 5.538.722.

35 Puede obtenerse el establecimiento de un cultivo de células procedentes de músculo a partir de células aisladas de tejido muscular mediante procedimientos bien conocidos por un experto en la materia, por ejemplo, mediante una biopsia muscular. Dicha biopsia muscular que actúa como la fuente de células procedentes de músculo puede obtenerse del músculo en el sitio de lesión o de otra área que puede ser más fácilmente accesible para el cirujano clínico. Como se ha mencionado anteriormente, no es estrictamente necesario que las células procedentes de músculo se obtengan del paciente para tratar. Sin embargo, una realización de la invención es en la que la biopsia muscular se toma del paciente que padece incontinencia anal. El sitio de la biopsia no está restringido pero puede ser un músculo esquelético, tal como del brazo. El tamaño de la biopsia puede comprender aproximadamente 1 cm x 1 cm x 1 cm o mayor. De esta muestra de biopsia se aíslan y cultivan células satélite, es decir, células capaces de fusionarse (sincitio de al menos tres células) y establecer un citoesqueleto contráctil (secuencia de actina-miosina). Pueden cultivarse de aproximadamente 60 a aproximadamente 500 millones de células para un único tratamiento. Adicionalmente, puede obtenerse una muestra de sangre del paciente, que posteriormente se usa para cultivo de las células *in vitro*. Como alternativa, se usa suero bovino fetal para cultivo. Los mioblastos en cultivo celular pueden purificarse adicionalmente usando una tecnología establecida (Rando y Blau, 1994) u otros procedimientos. Estas células musculares se cultivan *in vitro*.

45 En una biopsia muscular, un área pequeña de tejido muscular contiene en general suficientes células miógenas para producir millones de células procedentes de músculo en cultivo. Para mioblastos, una vez que las células se han aislado y dejado crecer en cultivo, es fácil distinguir mioblastos puros de otros tipos celulares, ya que los mioblastos se fusionan para formar miotubos elongados *in vitro*. Además, puede usarse desmina, una proteína marcadora específica de miógeno, para determinar el índice de miogénia del cultivo celular sin el requisito de diferenciación.

C. Procedimientos de inyección

55 En general, la inyección de células procedentes de músculo, incluyendo mioblastos, células madre procedentes de músculo u otras células con potencial miógeno (véase anteriormente), en un tejido o sitio de lesión dado comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de células en solución o suspensión, por ejemplo, de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 6×10^6 células por cada 100 µl de solución de inyección. La solución de inyección es un medio fisiológicamente aceptable, con o sin suero autólogo. El medio fisiológicamente aceptable puede ser como ejemplo no limitante solución salina fisiológica o una solución tamponada con fosfato.

En una realización de la presente invención, la inyección de células procedentes de músculo comprende inyección de mioblastos autólogos, en el esfínter anal externo empleada como un tratamiento para la incontinencia anal para potenciar, mejorar y/o reparar el esfínter anal externo. Los mioblastos se inyectan en el esfínter anal externo y sobreviven y se diferencian en miofibras para mejorar la función del esfínter. La viabilidad y supervivencia de la inyección de mioblastos en el esfínter anal externo se ha verificado. De acuerdo con esta realización, pueden utilizarse inyecciones celulares de mioblastos autólogos (es decir, células procedentes de músculo recogidas de y cultivados para un paciente con incontinencia anal específico) como un agente no alérgico para reforzar la pared rectal, potenciando de este modo la coaptación y mejorando la función del músculo del esfínter anal mediante integración en las fibras de músculo estriado del músculo. Para este fin también pueden usarse fibroblastos que son capaces de construir una matriz extracelular que consiste en colágeno, que proporciona el efecto de refuerzo.

De acuerdo con la presente invención, las células mioblásticas autólogas administradas directamente al esfínter anal externo muestran supervivencia a largo plazo. Por lo tanto, la inyección de mioblastos autólogos da como resultado supervivencia a largo plazo segura y no inmunogénica de miofibras en el esfínter anal.

En una realización particular según la invención, se inyectan de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 μ l de una suspensión de células procedentes de músculo que comprende mioblastos (con una concentración de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 6×10^6 células por cada 100 μ l de solución de inyección) en el esfínter anal externo. El dispositivo de inyección puede estar conectado a un recipiente que contiene la suspensión celular para inyectar.

En otra realización, la etapa de inyección puede comprender varias inyecciones individuales, tales como de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 inyecciones de suspensión celular procedente de músculo, en las que en cada inyección se inyectan de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 μ l de una suspensión de células procedentes de músculo y en las que cada inyección se aplica a otra región del esfínter anal. Sin embargo, estos parámetros tienen que considerarse únicamente ejemplares y los expertos en la materia serán capaces de adaptar fácilmente estos procedimientos a las necesidades de tratamiento para cada paciente individual.

En otra realización de la presente invención, el movimiento del dispositivo de inyección hacia el esfínter anal externo se supervisa mediante medios de ecografía y/o EMG (electromiografía). En una realización particular, se introduce una sonda transrectal y la posición de la sonda transrectal se ajusta de forma óptima para el tratamiento del esfínter anal externo con los procedimientos según la invención. En otra realización particular, las células procedentes de músculo se implantan en el área que rodea el defecto del esfínter anal externo y/o especialmente en el área del defecto del esfínter anal externo. El paciente puede comenzar el día siguiente después de la inyección de células con ejercicios físicos para continuar el tratamiento de la incontinencia anal según la invención.

En otra realización, se repite el tratamiento. El tratamiento puede repetirse por ejemplo en un periodo de un año después del último tratamiento, después de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 meses después del último tratamiento o en un periodo de 1 a 8 semanas, preferentemente de 2 a 3 semanas o de 10 a 20 días después del último tratamiento. En particular, el tratamiento puede repetirse en un periodo de 2 a 3 semanas después del último tratamiento con células del mismo cultivo celular que se ha usado para el tratamiento previo. Este enfoque permite un volumen de inyección reducido por inyección y da a las células más tiempo para adaptarse e integrarse y a desarrollar el músculo. En una realización aún más específica, las inyecciones se repiten en intervalos temporales de 2 a 3 semanas hasta que se consigue una mejora de la continencia anal.

En particular, la presente invención comprende la inyección de las células mioblásticas en el esfínter anal externo, tal como en o adyacentes al sitio de lesión. El procedimiento de la presente invención es particularmente útil para el tratamiento de la incontinencia anal si el músculo *M. puborectalis* aún está intacto pero el esfínter anal externo está lesionado.

Como se ha mencionado anteriormente, una vía de penetración particular es a través de la piel de un paciente en paralelo al recorrido del recto. Sin embargo, también se contempla, que la penetración pueda realizarse directamente del recto en las cercanías del músculo lesionado. En particular, el procedimiento de penetración e inyección se supervisa mediante medios de captura de imágenes ecográficas. Adicionalmente, se contempla una vía de penetración alternativa para mujeres, es decir, inyección transvaginal. En este escenario, el dispositivo de inyección penetra la pared de la vagina y se mueve hacia delante hasta que alcanza el sitio de inyección deseado. En particular, el procedimiento de penetración e inyección se supervisa mediante medios de captura de imágenes sonográficos y/o de EMG (electromiografía) también en este escenario.

En otra realización, la inyección comprende inyectar las células procedentes de músculo en forma de una "banda de inyección". La "banda de inyección", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la disposición de células a lo largo de la longitud, o una parte de la longitud, de la pista de inyección, es decir, a lo largo del canal creado por la inserción de la aguja en el tejido muscular. En otras palabras, después de la inyección, se retira la aguja mientras que, al mismo tiempo, se expulsan células de la jeringa de una manera continua o intermitente cuando la aguja de inyección se mueve, en particular, se retrae a lo largo de la pista de inyección. Dicha distribución continua de células proporciona un suministro continuo de la solución de inyección, incluyendo células, a lo largo del canal de inyección que se forma cuando el dispositivo de inyección/aguja entra en el tejido muscular diana. En una realización

particular, la banda o el canal de inyección debería tener un diámetro de no más de aproximadamente 600 μm , ya que esto conduciría a necrosis de las células de mioblastos en el centro del canal de inyección y, posteriormente, da como resultado inflamación perjudicial y otros procesos.

D. Dispositivos de inyección y captura de imágenes ecográfica

El dispositivo de inyección para su uso con los procedimientos de la presente invención puede ser cualquier dispositivo capaz de penetrar en el tejido humano y capaz de suministrar soluciones, en particular soluciones que comprenden células procedentes de músculo a una localización deseada en el organismo de un sujeto, en particular de un sujeto humano. El dispositivo de inyección puede comprender, por ejemplo, una aguja hueca. El dispositivo de inyección también puede ser cualquier tipo de jeringa adecuada para inyectar células procedentes de músculo. En realizaciones más sofisticadas, el dispositivo de inyección puede ser por ejemplo una pistola de inyección, que inyecta la suspensión celular aplicando presión de aire. En particular, el dispositivo de inyección es adecuado para aplicaciones endoscópicas y cirugía endoscópica, respectivamente.

Eligiendo una aguja de inyección que tenga un diámetro particular, puede determinarse con exactitud el volumen de inyección por mm^3 . El diámetro de la aguja de inyección no superará normalmente los 5 mm, ya que esto puede conducir a daño de las estructuras musculares.

Pueden obtenerse medios de captura de imágenes ecográficas para supervisar la posición y acción del dispositivo de inyección mediante cualquier dispositivo de captura de imágenes ultrasónica convencional conocido en la técnica. Además de sondas ultrasónicas convencionales mono o biplanares, también pueden usarse nuevas tecnologías ultrasónicas, tales como, por ejemplo, ecografía tridimensional o ecografía de Doppler a color, etc. En una realización particular, como se ha analizado anteriormente, el dispositivo de inyección comprende un medio de captura de imágenes ecográfico.

Puede realizarse captura de imágenes ecográfica en modo radial o en modo longitudinal. El modo radial se usa con frecuencia cuando se introduce el dispositivo de inyección en el recto de un paciente ya que esto proporciona la situación exacta de la punta de la aguja de inyección en el sitio de inyección deseado. El modo longitudinal puede usarse si el procedimiento de inyección de las células procedentes de músculo en o adyacentes al tejido dañado debe supervisarse. Además, los modos también pueden combinarse, es decir, primero supervisar el procedimiento de penetración en un primer modo hasta que se alcanza el sitio de inyección, segundo supervisar en un segundo modo el procedimiento de inyección, cuando la aguja de inyección se retrae del sitio de inyección. Sin embargo, debe observarse que los procedimientos de la presente invención no son dependientes de la captura de imágenes ultrasónica.

E. Formas de incontinencia anal para tratar con la presente invención

En principio, puede tratarse cualquier tipo de incontinencia anal, ya que el refuerzo de los sistemas de músculos anales proporciona un mejor control del llenado rectal. Sin embargo, se trata la incontinencia anal que resulta de rotura perineal, especialmente si el sistema de esfínter anal y/o si el M. puborectalis está dañado y lesionado. Dicha rotura perineal puede resultar de una amplia diversidad de causas como se ha destacado anteriormente. Sin embargo, la causa de dicha rotura perineal no está en la limitación de la aplicación de los procedimientos de la presente invención. Los pacientes pueden tratarse con los procedimientos de la presente invención si padecen una rotura perineal del tercer o cuarto grado. Esto se aplica en particular a mujeres que padecen dicha rotura perineal después de parto con fórceps, la primiparidad, un peso del niño de más de 4 kg o como consecuencia de anomalías de posición del niño antes del nacimiento. Los procedimientos de la presente invención también pueden aplicarse después de lesión del sistema de esfínter anal y/o M. puborectalis debido a procedimientos quirúrgicos. Adicionalmente, los procedimientos de la presente invención pueden aplicarse si hay solamente incontinencia transitoria. Dicho tratamiento previene el desarrollo de incontinencia anal completa. Son patologías de incontinencia anal adicionales para tratar con los procedimientos de la presente invención incontinencia pasiva, incontinencia de heces y defecación imperativa.

Debería entenderse, y ya se ha indicado anteriormente, que los procedimientos según la presente invención no pueden usarse solamente para tratar pacientes que ya padecen incontinencia anal, es decir, que muestran síntomas de incontinencia anal, pero deben aplicarse a sujetos que no padecen aún incontinencia anal, pero con mayor riesgo de padecerla, por ejemplo, en casos en los que la musculatura rectal padecía daño de cirugía, nacimiento, accidentes y así sucesivamente. Otro ejemplo serían casos en los que la musculatura rectal se hizo más delgada que en un individuo sano o en los que se degradó debido a otras razones. Los procedimientos de la presente invención pueden proporcionar una profilaxis adecuada para prevenir la aparición de incontinencia anal.

F. Referencias

- Patente de los Estados Unidos n.º 5.130.141
- Patente de los Estados Unidos n.º 5.538.722
- Donnelly y col., Br. J. Obstet. Gynaecol., 104(3):311-315, 1997.
- Gojo y col., Cell Transplantation, 5:581-584, 1996.
- Hallgren y col., Dig. Dis. Sci., 39(12):2612-2618, 1994.

- Kenefick y col., Gut, 51(2):225-228, 2002.
Malouf y col., Dis. Colon Rectum, 44(4):595-600, 2001.
Malouf y col., Lancet, 355(9200):260-265, 2000.
5 Murry y col., J. Clin. Invest., 98:2512-2523, 1996. Rando y Blau, J. Cell. Biol., 125:1275-1287, 1994. Robinson y col., Cell Transplantation, 5:77-91. 1995. Vaizey y Kamm, Br. J. Surg., 92(5):521-527, 2005.
Zibaitis y col., Transplantation Proceed., 26:3294, 1994.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula procedente de músculo para su uso en la prevención y el tratamiento de la incontinencia anal en un sujeto, en el que dichas células son células mioblásticas, en el que dichas células son autólogas o heterólogas con respecto a dicho sujeto, y en el que la célula procedente de músculo es para ser administrada en el esfínter anal externo.
2. La célula procedente de músculo para su uso según la reivindicación 1, en el que los mioblastos se han obtenido de un donante y/o en el que la célula procedente de músculo es una célula primaria y/o en el que la administración de dicha célula se repite.
- 10 3. La célula procedente de músculo para su uso según la reivindicación 1 y 2, en el que dichas células se cultivan antes de la administración.
4. La célula procedente de músculo para su uso según las reivindicaciones 1 a 3, para ser administrada al esfínter anal externo de un sujeto, en el que dicho sujeto ha padecido una lesión rectal.

