



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 354 304**

51 Int. Cl.:
A61K 35/34 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04750822 .1**
96 Fecha de presentación : **26.04.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1617852**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.01.2006**

54 Título: **Células derivadas del músculo (MDCS) para promover y potenciar la regeneración y reparación de nervios.**

30 Prioridad: **25.04.2003 US 465846 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.03.2011

73 Titular/es: **The University of Pittsburgh
The Office of Technology Management
200, Gardner Steel Conference Center
Thackeray & O'Hara Streets
Pittsburgh, Pennsylvania 15260, US**

72 Inventor/es: **Huard, Johnny;
Chancellor, Michael, B. y
Minnery, Brandon**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

CAMPO DE LA INVENCION.

La presente invención se refiere de un modo general al uso de células derivadas de músculo, obtenidas preferentemente del músculo esquelético, llamadas MDCs (Muscle-Derived Cells) en el presente texto, para la promoción y la potenciación de la regeneración y la reparación de células nerviosas y tejido neuronal. La invención se refiere además a MDCs para su uso en métodos para la reparación de tejido nervioso, en particular en el sistema nervioso periférico, y a su capacidad para contribuir al desarrollo de tejido neuronal. Tales métodos son útiles para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso y para aliviar, reducir, mejorar o eliminar los síntomas de enfermedades neurológicas o neurodegenerativas en animales, incluyendo personas, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico.

FUNDAMENTO DE LA INVENCION

El sistema nervioso sirve como red de comunicaciones entre partes del cuerpo muy separadas, y actúa con rapidez para controlar las reacciones ante estímulos, para procesar la información y para producir complicados patrones de señales que gobiernan comportamientos complejos.

El sistema nervioso de los vertebrados, p. ej. de los mamíferos, consiste en el sistema nervioso central (SNC), que comprende el cerebro y la médula espinal, que está unido por nervios (también llamados células nerviosas, neuronas o células neuronales) a muchas estructuras periféricas, por ejemplo órganos sensoriales, músculos y glándulas. El SNC está también conectado a racimos de células nerviosas periféricas, llamados ganglios, que desempeñan un papel en la comunicación entre los sistemas nerviosos periférico y central. Aunque los patrones de las conexiones neuronales difieren ampliamente entre especies distintas, las propiedades de la neuronas individuales (o células nerviosas) son con mucho las mismas entre sistemas nerviosos animales. El sistema nervioso central maduro de los vertebrados, p. ej. de los mamíferos, está constituido por neuronas y células

gliales, p. ej. astrocitos y oligodendrocitos. Las células nerviosas, ganglios y órganos sensoriales comprenden el sistema nervioso periférico.

El sistema nervioso comprende gran número de células, que están altamente especializadas, pero que interaccionan entre ellas llevando a cabo tareas y funciones esenciales asociadas con su posición en el sistema. Por ejemplo, la unión neuromuscular, que forma la unión entre las células nerviosas y el músculo esquelético, está compuesta por tres tipos de células: una célula muscular, una célula nerviosa y una célula de Schwann. Cada una de ellas tiene un papel muy diferente, como se describe más adelante, pero trabajan juntas para permitir la estimulación y contracción muscular. La célula muscular es una célula de contracción especializada. Su citoplasma está lleno de filas organizadas de filamentos de proteína, incluyendo un número elevado de filamentos de actina. También están interdispersas muchas mitocondrias entre los filamentos de proteína, y suministran ATP como combustible del aparato contráctil.

La célula nerviosa de la unión neuromuscular estimula a la célula muscular para que se contraiga, transportando una señal excitadora al músculo desde el cerebro o la médula espinal. La célula nerviosa es muy alargada; su cuerpo principal, que contiene el núcleo, puede encontrarse a un metro o más de la unión del músculo. En consecuencia, el citoesqueleto de una célula nerviosa está bien desarrollado de forma que sea capaz de mantener la inusual forma de la célula, y para transportar materiales eficazmente desde un extremo de la célula al otro, a través de "prolongaciones" largas de las células nerviosas. La membrana plasmática de la célula nerviosa contiene bombas iónicas y proteínas de canal que han sido explotadas por las células nerviosas para que señales eléctricas o pulsos en forma de potenciales de acción puedan propagarse en una fracción de segundo desde uno a otro extremo de la célula, transportando de esta forma una señal para una actuación.

La última célula de la unión neuromuscular es la célula de Schwann. Las células de Schwann están especializadas para ser productoras de masa de la membrana plasmática que envuelve la porción alargada de la célula nerviosa. Las células de Schwann en el sistema nervioso periférico forman mielina y extienden muchas capas de membrana para formar una vaina aislante de mielina alrededor de las prolongaciones de células nerviosas (llamadas axones).

La generación de nuevas células nerviosas, conocida como proceso de neurogénesis, se completa típicamente al principio del periodo post-natal de la vida en los mamíferos vertebrados. Al final del periodo post-natal del desarrollo del mamífero, el SNC contiene un complemento completo de varios tipos de células nerviosas. La mayoría de los mamíferos adultos, tales como los seres humanos y los primates no humanos, son incapaces de producir nuevas células nerviosas, lo que conduce a serios problemas cuando una lesión o enfermedad causa daños a las células neuronales, o su muerte, y el tejido no puede ser reemplazado.

Los trastornos y enfermedades del SNC incluyen una diversidad de condiciones adversas tales como enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo la enfermedad de Parkinson y sus discinesias asociadas, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple (MS), la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la enfermedad de Huntington, la lesión cerebral aguda, por ejemplo el infarto cerebral, la parálisis cerebral, el traumatismo craneoencefálico, y otras disfunciones del SNC, por ejemplo la epilepsia, depresión, esquizofrenia y parálisis. Tales trastornos y enfermedades se están haciendo cada vez más evidentes a causa del envejecimiento de la población, que actualmente disfruta de una mayor perspectiva de vida y longevidad. Muchas de las enfermedades anteriores, en particular de la ancianidad, han sido asociadas con la degeneración o anomalías de las células en áreas concretas del SNC, de forma tal que las células del SNC o de la periferia no pueden realizar sus funciones normales. El funcionamiento anómalo de células nerviosas exis-

tentes, más que la pérdida completa de las células, abarca una gran área de trastornos, enfermedades y disfunciones del SNC. Las anomalías de las células neuronales pueden derivar de una puesta en marcha inapropiada de las neuronas o de una anormal síntesis, procesamiento y/o liberación de neurotransmisores. Otras enfermedades y trastornos en los que intervienen tejidos y células nerviosas dañadas o disfuncionales incluyen traumatismos o agresiones a los tejidos de varias clases, p. ej. traumatismo contuso, lesiones de espalda y glúteos, lesiones musculares, disfunción eréctil y similares.

La degeneración de los ganglios basales en el cerebro puede tener por resultado la aparición de enfermedades que tienen varios síntomas dependiendo de la localización en el cuerpo. Los ganglios basales comprenden muchas regiones separadas, incluyendo el núcleo estriado, esto es, que contiene el núcleo caudado y el putamen, el globo pálido, la sustancia negra, la sustancia innominada, el pálido ventral, el núcleo basal de Meynert (que envía proyecciones colinérgicas a la corteza cerebral), el área tegmental ventral y el núcleo subtalámico. Se ha encontrado que varias regiones de los ganglios basales han experimentado una degeneración, o una degeneración localizada, en particular enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer, o disfunciones y enfermedades motrices, tales como la corea de Huntington o la enfermedad de Parkinson.

Las enfermedades desmielinizantes incluyen patologías de células neuronales en el SNC y sistema nervioso periférico, que dan una conductancia de señales inadecuada dentro y entre estos sistemas. La mielina, la vaina celular, sirve para mejorar varias propiedades electroquímicas de los axones y prolongaciones axonales que están rodeadas por mielina, que también proporciona soporte trófico a la neurona. En el SNC, los oligodendrocitos producen mielina, mientras que las células de Schwann producen este material aislante en el sistema nervioso periférico. La enfermedad desmielinizante esclerosis múltiple (MS) y la distrofia muscular

son tipos de enfermedades que implican una disfunción neurológica para la cual se necesitan tratamientos.

La necesidad de nuevos tratamientos y soluciones para aliviar y superar enfermedades y trastornos neurodegenerativos del sistema nervioso central y del sistema nervioso periférico es perentoria. Aunque se han desarrollado varios tratamientos, hay inconvenientes que desvirtúan el uso prolongado de muchos tratamientos a causa de la ausencia de un efecto sostenido a largo plazo, las complicaciones asociadas con el uso y/o la falta de facilidad y eficacia del tratamiento a lo largo del tiempo. Por ejemplo, se han usado agentes neurolépticos y farmacéuticos para tratar trastornos del SNC con un éxito limitado. Surgen problemas debido a la limitada capacidad de los agentes farmacéuticos para atravesar la barrera hematoencefálica. También tiene lugar el desarrollo de tolerancia a los fármacos, especialmente cuando se administran fármacos a pacientes durante un tiempo, limitándose así la eficacia del tratamiento. Las contramedidas tales como el aumento de la cantidad de fármaco administrado para conseguir una mayor eficacia, pueden tener por resultado efectos secundarios adversos tales como, por ejemplo, la discinesia tardía, convulsiones y otros movimientos involuntarios. Se ha intentado el neurotrasplante usando técnicas de injerto, pero los tipos de células implicadas son con frecuencia incapaces de diferenciarse en el fenotipo neuronal apropiado, o son de corta vida después de la introducción en un hospedador o receptor.

Tanto la baja reposición de células en el SNC de los mamíferos, como la incapacidad de los mamíferos adultos para regenerar o reemplazar células neuronales después de una lesión o enfermedad, p. ej. una enfermedad neurodegenerativa, apoyan la noción de que el SNC del adulto no contiene ni puede generar células madre neuronales, o células tempranas, que muestren auto-renovación, generando así más células neuronales progenie. En general, varias marcas distintivas que son típicas de las células madre es que pueden renovarse y mantenerse a sí mismas, proliferar, generar mu-

cha progenie diferenciada y regenerar tejido después de una lesión o de una enfermedad. Las células madre son así típicamente pluripotenciales y funcionan reemplazando una pérdida de células después de una muerte celular natural o inducida, una enfermedad o una disfunción. La generación de nuevas células de SNC después de una lesión o muerte es rara entre las especies de mamíferos (Kaplan, 1981, *J. Compuesto. Neurol.*, 195:323; Bayer (1985, *Ann. New York Acad. Sci.*, 427:163; patente de EE.UU. n° 6.497.872), apoyando además la teoría de que el SNC del mamífero adulto no contiene células madre neuronales pluri- o multi-potenciales que puedan servir para reemplazar células neuronales perdidas como resultado de una lesión o de una enfermedad.

En términos del tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y lesiones nerviosas de varios tipos, existe la necesidad de una fuente de células reproducible y eficaz que esté disponible en las cantidades necesarias para la introducción o el trasplante a un hospedador en necesidad de tratamiento. Las publicaciones de varios tipos de células para ser usadas en el tratamiento de lesiones y enfermedades del sistema nervioso incluyen líneas de células de origen espontáneo, líneas de células inmortalizadas, cultivo de células neuronales primarias, células como se describen en la patente de EE.UU. n° 5.082.670 de Gage et al., que usan fibroblastos modificados genéticamente para producir tirosina hidroxilasa, permitiéndolas así producir dopamina para tratar la enfermedad de parkinson tras la implantación, y células como se describen en la patente de EE.UU. n° 6.497.872 de Weiss et al., que describe células madre neuronales aisladas de tejido neuronal adulto o fetal, tratadas con factor de crecimiento y a las que se ha dejado diferenciar en tipos de células neuronales antes del trasplante a un hospedador.

Así pues, hay una necesidad evidente y extensa del empleo de tipos de células fiables que tengan la facultad de apoyar el crecimiento y la supervivencia de las células nerviosas, de promover o potenciar la regeneración de ner-

vios lesionados, y de promover o potenciar la inervación de tejidos trasplantados o injertados para el tratamiento de una diversidad de lesiones, daños, trastornos o disfunciones, todos en relación con el sistema nervioso. Existe también la necesidad de células que puedan ser administradas localmente o sistémicamente a un tejido receptor, para reparar, mejorar, eliminar o recuperar una función asociada con la degeneración o la inflamación de los nervios periféricos, por ejemplo. La invención que se describe en el presente texto se dirige a tales necesidades en la técnica de la neuropatología y del tratamiento, mejora, reparación y recuperación de las enfermedades de los tejidos y de las células nerviosas.

15 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente solicitud se refiere al uso de MDCs autólogas para promover o potenciar la neurorecuperación después de una prostatectomía, y la recuperación de la función eréctil.

20 La presente invención proporciona también un uso terapéutico basado en células, para el tratamiento, la reparación o la ayuda en la recuperación de tejido muscular enfermo, lesionado, dañado o disfuncional, y el daño concomitante de tejidos o de células nerviosas, utilizando MDCs
25 aisladas y enriquecidas a partir de músculo esquelético, como se describe en el presente texto. En este aspecto, esta invención proporciona MDCs como terapia basada en células para el tratamiento de los daños del tejido nervioso que contribuyen a diversas disfunciones genitourinarias, en particular después de una cirugía pélvica radical, tal como
30 la prostatectomía, en particular la post-prostatectomía radical, en la que el tejido nervioso cavernoso y/o el tejido nervioso pélvico resultan dañados. También en este aspecto, esta invención proporciona MDCs como terapia basada en células para el tratamiento de la disfunción eréctil, que
35 frecuentemente acompaña a la prostatectomía, en particular después de la prostatectomía radical, en la que el tejido

del nervio cavernoso y/o el tejido del nervio pélvico resultan dañados. De acuerdo con la presente invención las MDCs promueven la supervivencia y la regeneración neuronal y también pueden apoyar la inervación de tejido que, por ejemplo, ha sido dañado, lesionado, enfermado o trasplanta-
do, permitiéndose así la reparación del tejido nervioso, y además proporcionar el tratamiento y la mejora de la disfunción asociada, tal como la disfunción eréctil, después de una cirugía.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un uso médico para el tratamiento o la reparación de los daños, lesiones o disfunciones tanto del tejido nervioso como del muscular al mismo tiempo, preferentemente en el mismo sitio o en la misma localización, tal como se ejemplifica mediante la reparación de los daños en el tejido nervioso que están asociados con la disfunción eréctil y el daño nervioso pélvico. En un aspecto en particular, las MDCs promueven o potencian la neurorrecuperación y la recuperación de la función eréctil después de una cirugía de próstata.

Hay aspectos, características y ventajas adicionales proporcionadas por la presente invención que serán evidentes a partir de la descripción detallada y ejemplos que siguen.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION.

La presente invención implica métodos de terapia basada en células para el tratamiento, la reparación, la mejora o el alivio de enfermedades neurodegenerativas, y la lesión, enfermedad, daño o disfunción de tejidos nerviosos y/o musculares y órganos que usan células derivadas de músculo (MDCs), p. ej. mioblastos, o células tempranas derivadas de músculo, aisladas de un material de partida de tejido muscular, tales como una población de músculo esquelético. Un método para obtener MDCs para tales tratamientos se describe en el presente texto; también se han descrito métodos en las solicitudes de patente de propiedad común y

pendientes en común con la presente, números de serie de EE.UU. 09/302.896 y 09/549.937.

La presente invención proporciona fuentes accesibles de células musculares somáticas tempranas, en particular
5 células autólogas, que son útiles en el tratamiento y la reparación de los daños neurodegenerativos, y de las enfermedades, trastornos y lesiones de las células nerviosas y los tejidos, tales como, por ejemplo, en enfermedades neuromusculares. En su caso, p. ej. para enfermedades, tras-
10 tornos, lesiones o disfunciones en las que están implicados tanto el tejido nervioso como el muscular, en particular en la misma proximidad, las MDCs sirven también ventajosamente para tratar y reparar lesiones, enfermedades, daños o disfunciones relacionadas con el músculo.

Además, y si se desea o se precisa, las MCDs pueden ser modificadas genéticamente para que contengan un vector de expresión, p. ej. de plásmido o viral, que contiene uno o más polinucleótidos heterólogos que se expresan y cuyos productos de expresión son producidos en el sitio en el que
20 los MDCs son introducidos *in vivo*. En consecuencia, las células pueden ser modificadas por ingeniería genética para que contengan una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican una o más biomoléculas activas, y para que expresen estas biomoléculas, incluyendo proteínas, polipéptidos,
25 péptidos, hormonas, metabolitos, fármacos, enzimas y similares. Así, las MCDs pueden servir para expresar sustancias biológicamente activas, p. ej. un neurotransmisor o factor de crecimiento, y pueden actuar como sistema de suministro local a largo plazo para tales sustancias, en el sitio, o
30 en sus proximidades, de la lesión, el daño, la enfermedad o la disfunción.

Las MCDs pueden ser modificadas por ingeniería genética mediante una diversidad de técnicas moleculares y métodos conocidos por los profesionales que poseen experiencia
35 en este campo, por ejemplo mediante transfección, infección, transducción, o inyección directa de DNA. La transducción, como se usa en el presente texto, se refiere co-

múnmente a células que han sido transformadas genéticamente para que contengan uno o más polinucleótidos que codifican productos extraños o heterólogos, por medio de la introducción de un vector viral o no viral en las células. Se prefieren los vectores virales. La transfección se refiere más comúnmente a células que han sido modificadas por ingeniería genética para que contengan uno o más polinucleótidos codificadores de productos extraños alojados en un plásmido o en un vector no viral. Las MDCs pueden ser transfectadas o transducidas por vectores diferentes y pueden así servir como vehículos de suministro de genes para permitir que productos génicos de interés se expresen y se produzcan en el sitio del tejido o el órgano, o en sus proximidades.

Aunque se prefieren los vectores virales, los profesionales que poseen experiencia en la técnica apreciarán que la ingeniería genética de células para que contengan secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen las proteínas o polipéptidos, o las citocinas, o similares, que se desean, puede llevarse a cabo por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.538.722, incluyendo fusión, transfección, lipofección mediada por precipitación con DEAE-Dextrano o fosfato cálcico (Graham y Van Der Eb, 1973, *Virology*, 52: 456-467; Chen y Okayama, 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7: 2745-2752; Rippe et al., 1990, *Mol. Cell. Biol.*, 10: 689-695); bombardeo de genes usando microproyectiles de alta velocidad (Yang et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 9568-9572); microinyección (Harland y Weintraub, 1985, *J. Cell Biol.*, 101: 1094-1099); electroporación (Tur-Kaspa et al., 1986, *Mol. Cell. Biol.*, 6: 716-718; Potter et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 7161-7165); liposomas cargados con DNA (vector) (Fraley et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 3348-3352); complejos de lipofectamina-DNA; sonicación de células (Fechheimer et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 8463-8467); transfección medida por un receptor (Wu y Wu, 1987, *J. Biol. Chem.*, 262: 4429-4432; Wu y Wu, 1988, *Biochemistry*, 27: 887-892); y simila-

res. En una alternativa, el vector retroviral o de plásmido puede ser encapsulado formando un liposoma, o acoplado a un lípido, y después puede ser introducido en una célula. Además, pueden emplearse cDNA, DNA producido por síntesis, o
5 DNA de cromosomas, como insertos vectoriales utilizando métodos y protocolos conocidos y puestos en práctica por los expertos en la técnica.

Se proporcionan protocolos estándar para producir retrovirus deficientes en replicación, que incluyen las etapas de 1) la incorporación de material genético exógeno a un plásmido, 2) la transfección de una línea de células de empaquetamiento con un plásmido y la producción de retrovirus recombinantes por la línea de células de empaquetamiento, 3) la recolección de partículas virales del medio de cultivo de tejidos, y 4) la infección de las células diana con partículas virales, por ejemplo en M. Kriegler, 1990, "Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual", W. H. Freeman Co., NY; y E. J. Murry, Ed., 1991, "Methods in Molecular Biology", vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, N.
15
20 J.

Los vectores de expresión que contienen todos los elementos necesarios para la expresión son disponibles comercialmente y conocidos por los expertos en la técnica. Véanse, p. ej., Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; F. M. Ausubel et al. (eds), 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, N.Y.; D. N. Glover (ed), 1985, *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes I y II; M. L. Gait (ed), 1984, *Oligonucleotide Synthesis*; Hames y Higgins (eds), 1985, *Nucleic Acid Hybridization*; Hames y Higgins (eds), 1984, *Transcription and Translation*; R. I. Freshney (ed), 1986, *Animal Cell Culture; Immobilized Cells and Enzymes*, 1986, (IRL Press); Perbal, 1984, *A Practical Guide to Molecular Cloning; The Series*, Methods in Enzymology, Academic Press, Inc.; J. H. Miller y M. P. Callos (eds), 1987, *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*,
25
30
35

Cold Spring Harbor Laboratory; Wu y Grossman (eds), *Methods in Enzymology*, Vol. 154; Wu (ed), *Methods in Enzymology*, Vol. 155.

Los ejemplos ilustrativos de vehículos o construcciones de vectores para la transfección o la infección de MCDs de acuerdo con una realización de la presente invención, incluyen vectores virales deficientes en la replicación, vectores de virus de DNA o virus de RNA (retrovirus), tales como los vectores virales de adenovirus, virus del herpes simplex, vectores de HIV modificado, y vectores virales adenoasociados. Se prefieren los vectores de adenovirus. Tales vectores incluyen uno o más promotores para la expresión de una molécula heteróloga, p. ej. una molécula bioactiva (p. ej. proteína, polipéptido, o péptido). Los promotores adecuados que pueden ser empleados incluyen, pero sin limitarse a ellos, promotores adenovirales, tales como el promotor tardío principal adenoviral; promotores heterólogos tales como el promotor de citomegalovirus (CMV); el promotor del virus sincitial respiratorio (RSV); promotores inducibles tales como el promotor MMT, el promotor de metalotioneína; promotores del choque térmico; el promotor de albúmina; el promotor de ApoAI; promotores de globina humana; promotores de timidina cinasa viral, tal como el promotor de la timidina cinasa del virus del herpes simplex; LTRs retrovirales (incluyendo LTRs retrovirales modificados); el promotor de β -actina; y promotores de la hormona humana del crecimiento. El promotor puede ser también el promotor nativo que controla la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido. Los vectores virales preferidos derivan típicamente de virus eucarióticos no citopáticos en los que genes no esenciales han sido reemplazados con la secuencia o las secuencias de ácidos nucleicos de interés. Los virus no citopáticos incluyen los retrovirus, que se replican por transcripción inversa de RNA viral genómico en DNA con la subsiguiente integración proviral en el DNA celular del hospedador.

Los retrovirus han sido aprobados para experimentos de terapia génica humana. En general, los retrovirus son deficientes en replicación, es decir, son capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de elaborar una partícula infecciosa. Los retrovirus de los que pueden derivarse los vectores de plásmido retrovirales incluyen, pero sin limitarse a ellos, el virus de la leucemia murina de Moloney, el virus de la necrosis esplénica, retrovirus tales como el virus del sarcoma de Rous, el virus del sarcoma de Harvey, el virus de la leucosis aviar, el virus de la leucemia del mono gibón, el virus de la inmunodeficiencia humana, adenovirus, el virus del sarcoma mieloproliferativo, y el virus del tumor mamario. En general, los retrovirus usados para crear un vector viral son preferentemente debilitados o mutados de alguna forma para prevenir la transmisión de la enfermedad. Si se desea, pueden usarse vectores virales infecciosos deficientes en replicación para construir las células por ingeniería genética antes de la inyección *in vivo* en las mismas. En este aspecto, los vectores pueden ser introducidos en células productoras retrovirales para empaquetamiento anfotrófico. La expansión natural de células progenitoras derivadas de músculo en regiones adyacentes obvia un gran número de inyecciones en el sitio o los sitios de interés.

Típicamente los vectores son sustancialmente libres de cualquier DNA procariótico y pueden comprender un cierto número de secuencias de ácidos nucleicos funcionales distintas. Entre los ejemplos de tales secuencias funcionales se incluyen secuencias de ácidos nucleicos, p. ej. DNA o RNA, que comprenden secuencias reguladoras de la iniciación y la terminación de la transcripción y la traducción, incluyendo promotores (p. ej. promotores fuertes, promotores inducibles, y similares) y potenciadores, que son activos, por ejemplo, en células del esófago o del intestino delgado. También se incluye como parte de las secuencias funcionales un marco de lectura abierto (secuencia de ácidos nucleicos) que codifica una proteína, un polipéptido o un

péptido de interés. También pueden incluirse secuencias flanqueantes para la integración dirigida a un sitio. En algunas situaciones, la secuencia flanqueante en 5' permite la recombinación homóloga, cambiando así la naturaleza de la región de iniciación de la transcripción, para proporcionar transcripción inducible o no inducible para aumentar o disminuir el nivel de transcripción, como ejemplo.

El vector empleado generalmente incluye también un origen de replicación y otros genes que son necesarios para la replicación en las células hospedadoras, como emplean rutinariamente los profesionales que tienen experiencia en la técnica. Como ejemplo, el sistema de replicación que comprende el origen de la replicación y cualquier proteína asociada con la replicación codificada por un virus en particular, puede ser incluido como parte de la construcción. El sistema de replicación ha de elegirse de forma que los genes que codifican productos necesarios para la replicación no transformen finalmente a las propias MDCs. Tales sistemas de replicación están representados por adenovirus deficientes en replicación contruidos como se describe, por ejemplo, en G. Acsadi et al., 1994, *Hum. Mol. Genet.* 3: 579-584, y por el virus de Epstein-Barr. Ejemplos de vectores deficientes en replicación, en particular vectores retrovirales que son deficientes en replicación, son BAG, descrito por Price et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 156; y Sanes et al., 1986, *EMBO J.*, 5: 3133. 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.

En general, la secuencia de ácidos nucleicos que se desea que sea expresada por las MDCs es la de un gen estructural, o un fragmento, segmento o porción funcional del gen, que es heteróloga respecto a la célula que sirve como vehículo de suministro y que codifica una proteína o un producto polipeptídico deseados. El producto codificado y expresado puede ser intracelular, es decir, retenido en el citoplasma, el núcleo o un orgánulo de la célula, o puede

ser secretado por la célula. Para la secreción, puede ser conservada la secuencia señal natural presente en el gen estructural, o puede usarse una secuencia señal que no está presente naturalmente en el gen estructural. Cuando el polipéptido o el péptido es un fragmento o una proteína que es mayor, puede proporcionarse una secuencia señal de forma que, al tener lugar la secreción y el procesamiento en el sitio de procesamiento, la proteína deseada tenga la secuencia natural. Los ejemplos de genes de interés para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen genes que codifican factores de crecimiento de la célula, moléculas supresoras, factores de diferenciación de la célula, factores de señalización de la célula y factores de muerte celular programada.

Preferentemente está presente un marcador 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. Los ejemplos de genes marcadores usados comúnmente incluyen neomicina, dihidrofolato reductasa, glutamina sintetasa, y similares. El vector empleado incluye también generalmente un origen de la replicación y otros genes que son necesarios para la replicación en las células hospedadoras, como los que emplean rutinariamente los profesionales con experiencia en la técnica. Como ejemplo, puede incluirse como parte de la construcción el sistema de replicación que comprende el origen de replicación y cualquier proteína asociada con la replicación codificada por un virus particular.

En una realización, la construcción génica final contiene preferentemente al menos un gen o secuencia de polinucleótidos que codifica un producto, preferentemente un producto biológicamente activo, que es útil en el tratamiento de un trastorno dado del sistema nervioso central o periférico. En algunos casos, el producto biológicamente activo es útil en el tratamiento de un trastorno, enfermedad o disfunción relacionados con el músculo. En otros as-

pectos tales como el tratamiento a la vez de trastornos, enfermedades o disfunciones tanto de nervios como de músculos, se proporcionan uno o más genes o polinucleótidos que codifican un producto para afectar a las células o tejidos nerviosos, y uno o más genes o polinucleótidos que codifican un producto para afectar a las células o tejido muscular. Puede ser expresado y secretado un producto de factor de crecimiento; tal producto incluye proteínas, péptidos, mitógenos u otras moléculas que tienen un efecto sobre el crecimiento, la proliferación, la diferenciación o el tropismo. Los ejemplos no limitantes de productos de factor de crecimiento que pueden ser empleados para tratar trastornos del SNC incluyen factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina 3, neurotrofina 4, interleucinas, factores de crecimiento de fibroblastos 1 y 2 (FGF-1 y FGF-2), factores de crecimiento similares a la insulina, hormonas glucocorticoides, somatostatina, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), toxoide del tétanos, TGF-alfa y beta, factor de crecimiento epidérmico y ácido retinoico. Además, las MDCs pueden ser modificadas para que expresen y produzcan un receptor del factor de crecimiento, tal como los receptores para los factores de crecimiento antes mencionados, o la familia trk de receptores de neurotrofina (p. ej. trk, trkB, trkC), o para que expresen y produzcan un neurotransmisor, o receptores de los mismos, por ejemplo serotonina, L-dopa, dopamina, tachiquinina, sustancia P, epinefrina y norepinefrina, encefalina, GABA, acetilcolina, glutamato, glutamina, histamina y similares.

Para tratamientos basados en MDC, preferentemente se obtiene un explante de músculo esquelético a partir de una fuente humana o animal autóloga o heteróloga (p. ej. alogénica). Una fuente autóloga animal o humana es particularmente adecuada. Sin embargo, los donantes alogénicos, o donantes no autólogos, incluyendo fuentes de MCDs de donantes humanos adultos, humanos, embrionarios o placentarios, así

como fuentes xenogénicas, están comprendidos en la presente invención. En el caso del SNC, el uso de MDCs de donantes que son xenogénicas respecto del hospedador, puede no ser tan crítico como para otros sitios del cuerpo, ya que el propio SNC tiende a ser inmunoprivilegiado. Así, la respuesta inmunitaria a xenoinjertos, cuando hay uno, se reduce significativamente en relación con reacciones en alguna otra parte del cuerpo. Sin embargo, para asegurar que los xenoinjertos, cuando se utilizan, no son rechazados, puede emplearse un método para reducir o eliminar la respuesta inmunitaria a las células o tejidos introducidos o implantados. En consecuencia, los hospedadores o receptores pueden ser inmunosuprimidos, bien sea mediante el uso de fármacos inmunosupresores (p. ej. ciclosporina), o bien a través de tratamientos locales de inmunosupresión usando inmunosupresores aplicados localmente (p. ej. la patente de EE.UU. n° 5.026.365 de Rossini describe métodos de encapsulación para la inmunosupresión local). Los métodos alternativos pueden implicar reemplazo o el bloqueo (*knock out*) de genes usando recombinación homóloga, tal como ablacionar genes para que MHC o HLA reduzcan la antigenicidad de las células donantes; modificación de superficie; tiraje del tejido para que concuerden los tipos de histocompatibilidad del donante y el receptor, en particular para células de donante alogénico (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 6.497.872 de Weiss et al.).

Para introducir o trasplantar las MDCs y/o las composiciones que comprenden las MDCs de la presente invención en un hospedador receptor, que es preferentemente un mamífero, entre los que se incluyen seres humanos, se prepara una suspensión de MDCs mononucleadas, preferentemente de una fuente de músculo esquelético o una fuente de músculo esquelético autólogo como se describe en el presente texto. Las MDCs se introducen o se administran a tejidos u órganos de un receptor (un animal, p. ej. mamíferos, incluyendo seres humanos), en una cantidad efectiva para repoblar y regenerarse en el tejido u órgano. La cantidad efectiva de

MDCs para el tratamiento, la reparación, la promoción, la potenciación, o la mejora de una lesión, condición, patología, trastorno o daño a un tejido u órgano, puede ser determinada mediante técnicas clínicas estándar. Una "cantidad efectiva" o una "cantidad farmacéuticamente efectiva" de las MDCs se refiere a una cantidad efectiva para el tratamiento, la reparación, la promoción, la potenciación, la mejora y similar, de una enfermedad, condición, patología, trastorno, lesión, daño o disfunción para la cual las MDCs están siendo usadas de acuerdo con la presente invención. La cantidad efectiva de MDCs comprende la cantidad efectiva para apoyar la regeneración de nervios periféricos, en particular nervios autonómicos, lesionados durante una cirugía pélvica radical, en particular durante una prostatectomía radical; en otra realización una cantidad efectiva de MDCs comprende la cantidad efectiva para promover o potenciar la inervación de un tejido después de una prostatectomía. Si se usa otro agente terapéutico junto con las MDCs en una formulación para administración, la cantidad efectiva de agente terapéutico se refiere a una cantidad efectiva para promover el efecto terapéutico del agente terapéutico. La dosis precisa a emplear en la formulación dependerá también de la vía de administración, así como de las circunstancias de cada paciente, tales como su edad, salud y estadísticas vitales, y la gravedad de la enfermedad, condición o trastorno. La dosis debe decidirse de acuerdo con el criterio del médico, basado en la evaluación del paciente y en consideraciones de la situación psicológica del paciente y su historial médico. Además, opcionalmente pueden usarse ensayos *in vitro* para ayudar a determinar los intervalos de dosificación óptimos. Las dosis efectivas pueden ser extrapoladas a partir de curvas de respuesta a la dosis derivadas de sistemas de pruebas con modelos animales *in vitro* o *in vivo*.

Las MDCs pueden comprender composiciones, incluyendo suspensiones. Tales suspensiones contienen las MDCs de la presente invención en un vehículo, excipiente o diluyente

aceptable fisiológicamente. El número de células en una suspensión de MDC y el modo de administración pueden variar dependiendo del sitio y de la condición objeto de tratamiento. Como ejemplo no limitante de acuerdo con la presente invención, de aproximadamente $1 - 1,5 \times 10^4$ a $1,5 \times 10^{10}$, o de aproximadamente $1 - 1,5 \times 10^6$ a $1,5 \times 10^8$, o aproximadamente $1 - 1,5 \times 10^6$ MDCs, son inyectadas para el tratamiento de una zona de daños de tejido u órgano de aproximadamente 8 mm de diámetro, p. ej. a un área que comprende tejido muscular y/o nervioso. Se ha de entender que un médico con experiencia puede determinar y modular las cantidades de MDCs para su uso en tratamientos basados en MDC de acuerdo con los requerimientos, las limitaciones y/o las optimizaciones determinadas para cada caso. Los ejemplos adicionales no limitantes de composiciones que comprenden MDCs incluyen construcciones realizadas en el tejido, p. ej. andamiajes y matrices que contienen colágeno, submucosa del intestino delgado (SIS) y gel de SIS, por ejemplo, como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 10/081.835, pendiente en común con la presente. Tales construcciones son particularmente ventajosas para proporcionar una estructura soporte para las MDCs y para prevenir la migración indeseable de las MDCs desde el sitio de inyección o implante.

Las suspensiones de MDCs para administrar a un sujeto pueden comprender, por ejemplo, aproximadamente 10^4 a 10^{10} células/ml, o aproximadamente de 10^4 a 10^8 células/ml, o aproximadamente 10^4 a 10^6 células/ml, en una solución estéril, p. ej. solución salina fisiológica o medio completo modificado para contener el suero del sujeto, como alternativa al suero bovino fetal. Alternativamente, las suspensiones de MDC pueden ser en soluciones estériles libres de suero, tales como soluciones para crioconservación (Celix Laboratories, St. Paul, MN). Las suspensiones de MDC pueden ser introducidas, p. ej., por medio de inyección, en uno o más sitios del tejido donante. La introducción de MDCs, p. ej. por inyección o trasplante, a zonas de los sistemas

nerviosos central y periférico que han sido dañadas, permite la reparación de tal lesión o daño, tal como mediante la producción de tipos de células apropiadas, por la reparación de circuitos lesionados o dañados, por la promoción o la potenciación de la inervación de células nerviosas y/o por la provisión de neurotransmisores para restaurar o mejorar la función neurológica. Las MDCs proporcionan una fuente fiable de células que no son cancerígenas ni inmortalizadas por transfección o transformación.

Los modelos animales de trastornos neurológicos y daños del SNC o periférico son adecuados para la demostración de la eficacia de las MDCs usadas en el tratamiento de trastornos, daños o lesiones neurológicas. Por ejemplo, las MDCs pueden ser administradas a cualquier animal con síntomas neurológicos o neurodegenerativos anómalos obtenidos de cualquier manera, incluyendo el haber sido obtenidos como resultado de lesiones mecánicas, químicas o electrolíticas, de manipulaciones especiales, tales como aspiración de áreas neuronales, daños por congelación en tejidos o células neuronales, o procesos de envejecimiento. Ratones y ratas son ejemplos ilustrativos de sistemas modelo aceptables.

Las MDCs pueden ser administradas como preparado o composición aceptable farmacéuticamente o fisiológicamente, que contiene un vehículo, excipiente o diluyente aceptable fisiológicamente, y ser administradas a los tejidos del animal receptor de interés, incluyendo seres humanos y mamíferos no humanos. La composición que contiene MDC puede ser preparada resuspendiendo las células en un líquido o una solución adecuados tales como solución salina fisiológica estéril u otros líquidos acuosos inyectables aceptables fisiológicamente. Las cantidades de los componentes a usar en tales composiciones pueden ser determinadas de forma rutinaria por los profesionales que poseen experiencia en la técnica. También pueden administrarse factores de crecimiento o pueden ser co-administrados antes, después o con la administración de las MDCs.

Las MDCs, o las composiciones de las mismas, pueden ser administradas por vías parenterales de inyección, incluyendo las vías subcutánea, intravenosa, intramuscular e intraesternal. Otros modos de administración incluyen, pero sin limitarse a ellos, las vías intranasal, intratecal, intracutánea, percutánea, entérica, cánula de inyección, liberación programada en el tiempo, oral y sublingual. En una realización de la presente invención, la administración de las MDCs puede ser asistida mediante cirugía endoscópica.

Para la administración a un receptor, por ejemplo administración inyectable, la composición que comprende MDCs es una solución o una suspensión estéril, o puede ser resuspendida en vehículos acuosos u oleosos aceptables farmacéuticamente y fisiológicamente, p. ej. gel de SIS, que puede contener agentes conservantes, estabilizantes y materiales para hacer que la solución o la suspensión sea isotónica con los fluidos corporales (es decir, la sangre) del receptor. Entre los ejemplos no limitantes de los excipientes adecuados para ser usados aquí, se incluyen el agua, solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4), solución acuosa de cloruro sódico 0,15 M, dextrosa, glicerol, etanol diluido, y similares, y mezclas de los mismos. Son estabilizantes ilustrativos el polietilenglicol, proteínas, sacáridos, aminoácidos, ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos, que pueden ser usados bien sea solos o como mezclas. Las cantidades, así como las vías de administración usadas, se determinan sobre una base individual, y corresponden a las cantidades usadas en tipos similares de aplicaciones o indicaciones conocidas por los expertos en la técnica.

Para optimizar el éxito del tratamiento basado en células, por ejemplo en trasplantes e injertos de tejidos u órganos, se desea la concordancia inmunológica más estrecha posible entre el donante y el receptor. Si no se dispone de una fuente autóloga, pueden analizarse los antígenos de histocompatibilidad de Clase I y de Clase II de donante y receptor para determinar la concordancia más estrecha disponible. Esto reduce al mínimo o elimina el rechazo inmuni-

tario y reduce la necesidad de una terapia inmunosupresora o inmunomoduladora. Si se precisa, la terapia inmunosupresora o inmunomoduladora puede instaurarse antes, durante y/o después del procedimiento de inyección o de trasplante.

5 Por ejemplo, puede administrarse al receptor del trasplante ciclosporina A u otros fármacos inmunosupresores. También puede inducirse tolerancia inmunológica antes del trasplante por métodos alternativos conocidos en la técnica (p. ej. D. J. Watt et al, 1984, *Clin. Exp. Immunol.* 55: 419; D. Faustman et al., 1991, *Science* 252: 1701).

En una realización relacionada, pueden usarse cultivos de MDCs, o clones o subclones de las mismas, preparados como se describe en el presente texto, para cribar sustancias de ensayo, compuestos, fármacos, productos farmacéuticos, 15 productos químicos, y otros agentes, en relación con su potencial para actuar como fármacos neurológicos, que pueden mejorar o aumentar la capacidad de las MDCs para promover o potenciar el tratamiento y la reparación de los nervios. Estos materiales de ensayo, en cantidades variables y en 20 varias veces, pueden ser añadidos a las MDCs en cultivo. Las MDCs pueden examinarse entonces usando rutinas de ensayo tales como inmunotinción, para determinar si las células expuestas son inducidas a diferenciarse en un fenotipo neuronal en respuesta al material de ensayo.

25 Como es sabido convencionalmente en la técnica, pueden usarse reactivos disponibles comercialmente tales como anticuerpos, para determinar marcadores celulares e identificar proteínas de superficie, que típicamente se expresan en la superficie de las células. Por ejemplo, para tipos de 30 células nerviosas, el anticuerpo O4 (Boehringer Mannheim) se une a oligodendrocitos y sus precursores; varios anticuerpos disponibles se unen a astrocitos, p. ej. el anticuerpo RAN2 (ATCC TIB-119; así como ATCC CRL-2534, CRL-2535 o CRL-2541; y los anticuerpos contra el toxoide del tétanos 35 (TT, Boehringer Mannheim) se unen a neuronas. Otros anticuerpos dirigidos contra marcadores tales como desmina, CD56, Sca-1, etc. son disponibles para determinar los per-

files de marcadores de superficie de las células. Usando cultivos de MDCs, pueden llevarse a cabo cribados y métodos de ensayo para evaluar los potenciales efectos perjudiciales de agentes biológicos (p. ej. fármacos) sobre la proliferación, o sobre la supervivencia o la función de estas células usadas en los métodos descritos. Como guía, las células pueden ser sembradas en placa a una densidad de aproximadamente $5 - 10 \times 10^5$ células/ml o aproximadamente $5 - 10 \times 10^6$ células/ml.

Los efectos de los agentes biológicos sobre células tales como las células neuronales, o MDCs, se determinan basándose en diferencias significativas relativas a uno o más cultivos de control con respecto a cambios fenotípicos, relaciones de fenotipos expresados, viabilidad de las células y cambios en la expresión de los genes. Los ejemplos no limitantes de agentes biológicos incluyen factores tróficos que se añaden al medio de cultivo, tales como EGF, FGF, BDNF, CNTF, TGF α , GDNF y similares. Se sabe que el FGF aumenta la relación de neuronas; se sabe que el CNTF aumenta la relación de oligodendrocitos. Las alteraciones físicas para las células pueden analizarse observando la morfología de las células y el crecimiento mediante el microscopio. Pueden emplearse análisis electrofisiológicos para determinar si cualquiera de los agentes biológicos de ensayo afectan a las características de la membrana celular, tal como el potencial de membrana en reposo, potenciales evocados, la dirección y el carácter iónico del flujo de corriente, y la dinámica de los canales iónicos. Estos tipos de análisis pueden realizarse usando cualquier método llevado a la práctica en la técnica para hacer los análisis, por ejemplo registro de voltaje unitario simple extracelular, registro de voltaje intracelular, fijación de voltaje, fijación de parche y técnicas de imagen de calcio. Estos métodos pueden también incluir el uso de colorantes sensibles al voltaje, formación de imágenes ópticas y electrodos sensibles a iones. Tales células tratadas, que comprenden preferentemente una composición aceptable fisiológicamente, pueden ser

trasplantadas a animales para posterior evaluación *in vivo*, tal como para la determinación de la supervivencia a largo plazo, así como para varias características inmunológicas y bioquímicas, y en el tratamiento o apoyo del tratamiento de enfermedades y trastornos neurológicos.

Se apreciará que, de acuerdo con la presente invención, pueden derivarse materiales clonales aislados de la población de MDCs usando varios procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo puesta en placa de dilución limitante en medio para cultivo de tejidos. Los materiales aislados clonales comprenden células genéticamente idénticas que tienen su origen en una célula individual solitaria. Además, los aislados clonales pueden derivarse usando análisis de FACS seguido por dilución limitante, para conseguir que una sola célula por pocillo establezca una línea celular aislada clonalmente. Los aislados clonales de MDC pueden ser utilizados en los presentes métodos, así como para construir por ingeniería genética las células para la expresión de una o más moléculas bioactivas, o en terapias génicas.

En otra realización, las MDCs son primero infectadas con vectores virales preparados por ingeniería genética que contienen al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un producto deseado, suspendidos en un vehículo o excipiente aceptable fisiológicamente, tal como solución salina o solución salina tamponada con fosfato, y después son administradas en un sitio apropiado del hospedador. Consistentemente con la presente invención, el producto deseado es expresado por las células inyectadas que así introducen el producto en el hospedador. Los productos introducidos y expresados pueden ser utilizados para tratar, reparar o mejorar la lesión, la disfunción o la enfermedad, debido a la expresión a lo largo de periodos de tiempo prolongados por las MDCs de la presente invención, teniendo una supervivencia a largo plazo (mayor de 2 semanas, preferentemente mayor de 4 semanas, más preferentemente mayor de 6 semanas,

y, lo más preferentemente, mayor de 8 semanas) en el tejido hospedador.

A título ilustrativo, y sin que sea limitante, aproximadamente de 10^5 a 10^{12} , o de 10^6 a 10^{12} , o de 10^6 a 10^8 , o de 10^8 a 10^{12} , o de 10^8 a 10^{10} , o de 10^{10} a 10^{12} MDCs suspendidas en un medio fisiológicamente compatible pueden ser implantadas en el tejido deseado para la terapia génica de una persona de 70 kg. Este número de MDC de la presente invención puede ser producido a partir de una sola biopsia de 100 mg de músculo esquelético a partir de una fuente humana. Para el tratamiento de un sitio lesionado específico, una inyección de MDCs modificadas por ingeniería genética en un tejido o sitio lesionado dado comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de células en solución o suspensión, p. ej. de aproximadamente 10^5 a 10^6 células por cm^3 de tejido a tratar, en un medio aceptable fisiológicamente.

En otra realización de la presente invención, pueden emplearse MDCs fetales embrionarias en metodologías y tratamientos de trasplante, bajo unas directrices apropiadas y condiciones y regulaciones aprobadas, con unos problemas, entre mínimos y nulos, de rechazo debido a potenciales incompatibilidades entre el donante y el hospedador. Por ejemplo, se encontró que las MDCs humanas procedentes de músculo fetal de un miembro son inmunotolerantes y muestran altos niveles de supervivencia, ya que podían persistir en ratones SCID durante más de 2 semanas después de la inyección (véase, por ejemplo, el documento PCT/US01/12084). Así, bajo las directrices, regulaciones y condiciones apropiadas, las MDCs fetales humanas pueden ser usadas y enriquecidas mediante sucesivas siembras en placa, para tratamientos y trasplante o injerto como se describe en el presente texto.

La presente invención comprende un método que implica el uso de MDCs como terapia basada en células, para el tratamiento de la disfunción eréctil que con frecuencia acompaña a la prostatectomía, en particular la prostatectomía radical, en la que el tejido nervioso, p. ej. el tejido

nervioso cavernoso, llega a dañarse. De acuerdo con la presente invención, las MDCs pueden ayudar a la inervación del tejido que, por ejemplo, ha sido dañado, lesionado, enfermado o trasplantado, permitiendo así la reparación del tejido nervioso, y además puede proporcionar tratamiento y mejora de la disfunción eréctil. Esta característica es particularmente ventajosa en métodos como se describen en los Ejemplos 2 y 3 en el presente texto. En una realización, la invención comprende un método para promover o potenciar la neurorrecuperación y la recuperación de la función eréctil después de la prostatectomía, que comprende administrar a un paciente en necesidad del tratamiento células derivadas de músculo (MDCs) autólogas en una cantidad efectiva para promover o potenciar la neurorrecuperación o la recuperación de la función eréctil en el paciente. En una realización, las MDCs son administradas en uno o más sitios de la anastomosis de la prostatectomía. Las MDCs pueden también ser administradas en, o alrededor de, los nervios cavernosos, nervios pélvicos, nervios hipogástricos, plexos pélvicos y ganglios autónomos pélvicos, o en el pene. En una realización, las MDCs son readministradas en un tiempo después de la prostatectomía, por ejemplo, 6 meses, 1 año o más, p. ej. mediante cistoscopia. En otra realización, las MDCs son enriquecidas a partir de una suspensión de células musculares, sembrando en placa la suspensión en al menos dos cultivos sucesivos, de forma que se eliminan los fibroblastos y las células no musculares, y se enriquece en una población final de MDCs mononucleadas, que comprende mioblastos como población de células derivadas de músculo enriquecida. En otra realización, las MDCs son administradas en una cantidad de aproximadamente 10^5 a 10^6 células por cm^3 de tejido del paciente. En otra realización, las MDCs son administradas junto con un vehículo, diluyente o excipiente aceptable fisiológicamente. En otra realización, se introduce en el paciente una población clonada de las MDCs.

EJEMPLOS

Los ejemplos descritos a continuación se proporcionan para ilustrar la presente invención y no son incluidos con el propósito de limitar la invención.

5

EJEMPLO 1

Materiales y métodos

Animales: Ratones normales (y ratones Mdx (C57BL/10ScSn DMD^{mdx}/J), si se usan), fueron adquiridos de Jackson Laboratories, los ratones mdx/scid, si se usan, fueron obtenidos a partir de la endogamia de ratones mdx y scid (C57BL/6J-Prkdc^{scid}/S2j, inmunodeficiente). El ratón mdx se caracteriza por la falta de distrofina en la membrana de las fibras musculares, que causa la degeneración y la necrosis de la fibra muscular. Todos los protocolos animales usados para estos experimentos fueron aprobados por el comité de la IACUC del Hospital Infantil de Pittsburgh (protocolos números 7/00 y 3/02).

Células derivadas de músculo (MDCs): Las MDCs fueron obtenidas a partir de músculo esquelético primario de ratones C57BL/6J (de 5 días de edad) usando una técnica de cultivo que implica la siembra en placas sucesiva o en serie de las células a lo largo de dos días o más, que da una población final enriquecida de MDCs mioblásticas mononucleadas, positivas para desmina que, como resultado del hecho de que la suspensión de células musculares se pasa en serie o sucesivamente a nuevas placas de cultivo a lo largo de al menos dos días, es esencialmente carente de fibroblastos y células no musculares y está enriquecida para la población final viable de MDCs cultivadas. Poblaciones clonales de células obtenidas por esta técnica pueden ser establecidas por protocolos que se ponen en práctica en la técnica, p. ej. dilución limitante.

Aislamiento y cultivo de MDC: Las MDCs fueron aisladas a partir de una muestra de tejido muscular de partida, p. ej. músculo esquelético, para obtener una población de MDCs enriquecida. Con este fin, se llevó a cabo una serie de

etapas de siembra en placa y cultivo, que tuvo por resultado el enriquecimiento de una población final de MDCs que fueron caracterizadas como células derivadas de músculo tempranas, tales como mioblastos, eran viables, no fibro-
5 blastos, positivas para desmina, mononucleadas y formaban miofibras. Las MDCs fueron aisladas al final de una siembra seriada en placa o un protocolo de pasaje/cultivo que comprende sucesivas puestas en placa de la muestra de células musculares de partida. Durante las sucesivas puestas en
10 placa de las células en nuevos recipientes de cultivo, las MDCs (incluyendo mioblastos y células derivadas de músculo tempranas) fueron enriquecidas y separadas de los tipos no MDC, p. ej. fibroblastos y adipocitos, células endoteliales y células de tejido conjuntivo. Las sucesivas siembras en
15 placa pueden llevarse a cabo durante más de aproximadamente 2 días, p. ej. aproximadamente 3 a 7 días, o 4 a 6 días, o 3 a 5 días, hasta que las MDCs proliferantes no fibroblastos como se ha descrito permanecieron y dominaron en los cultivos. Durante el periodo de cultivo, los fibroblastos
20 adherentes y las células no musculares fueron esencialmente agotadas de los sucesivos cultivos de células mediante el pasaje de la suspensión celular de células musculares a nuevas placas o matraces de cultivo de tejidos, que pueden estar o no recubiertas con colágeno. Después de la eliminación
25 ción inicial de los fibroblastos adherentes, que ocurrió de aproximadamente 1 a 24 horas después de poner la muestra de partida de células musculares en los recipientes de cultivo, las células se sometieron sucesivamente a pasaje a nuevos recipientes de tejido, esto es, nuevos discos o matraces
30 de cultivo, con medio de cultivo nuevo, p. ej. en intervalos de 24 horas, hasta que una población final de MDCs quedó enriquecida en los cultivos como células viables y en proliferación, con prácticamente ningún componente de células fibroblásticas, por ejemplo, al final de una serie de
35 aproximadamente 2 a 7 siembras en placa, 3 a 7 siembras en placa, 4 a 6 siembras en placa, o 3 a 5 siembras en placa. Esta población final de MDCs estaba enriquecida en células

que formaban fibras musculares, p. ej. células de mioblasto o células derivadas de músculo tempranas, y realizaron las funciones que se han descrito en el presente texto cuando son inyectadas o introducidas en tejidos u órganos animales, p. ej. tejido muscular, en los que las MDCs sobrevivieron, repoblaron y proliferaron. Si se desea, tales MCDs pueden ser también transfectadas o infectadas con vectores que pueden expresar productos génicos, p. ej. productos génicos heterólogos tales como factores de crecimiento, receptores de factor de crecimiento, neurotransmisores de péptido, o enzimas implicadas en la síntesis de neurotransmisores, incluyendo aquellos que son para aminoácidos, aminas biogénicas y neuropéptidos. En consecuencia, se obtuvieron y enriquecieron MCDs a partir de una suspensión de células musculares de partida sembrando en placa la suspensión en al menos dos cultivos sucesivos, para eliminar los fibroblastos y las células no musculares, y para enriquecer en una población final de células derivadas de músculo tempranas o mioblastos.

Para experimentos en particular usando ratones, se extirparon los músculos esqueléticos de los miembros traseros del ratón y los huesos fueron retirados. El músculo fue después picado formando una papilla grosera usando un bisturí. El tejido muscular fue disociado enzimáticamente a 37°C en colagenasa al 0,2%-Tipo XI (Sigma Aldrich) durante 1 hora, y después fue centrifugado a 3500 rpm durante 5 minutos. Las células se recogieron, se incubaron en dispasa (GIBCO BRL) preparada como HBSS de 2,4 U/ml (GIBCO BRL) durante 45 minutos, y después se incubaron durante 30 minutos en 0,1% de tripsina-EDTA (GIBCO BRL) diluido en HBSS. Después de la disociación enzimática, las células musculares fueron centrifugadas de nuevo a 3500 rpm y resuspendidas en medio de proliferación (PM) que contiene DME, suplementado para que contenga 10% de suero de caballo, 10% de FBS, 0,5% de extracto de embrión de pollo y 1% de penicilina-estreptomycin (todo ello adquirido de GIBCO BRL).

En estos experimentos, las MDCs fueron aisladas siguiendo un procedimiento de transferencia de cultivos en serie que implica pasajes sucesivos usando recipientes tales como frascos de cultivo de tejidos (o placas), p. ej. T25, T50, T150 (véase también los documentos U.S. Serie nº 09/302.896 y 09/549.937) para cultivar las células. Los recipientes pueden estar recubiertos con colágeno (colágeno tipo 1, Sigma Aldrich). Después de la resuspensión inicial en PM, la suspensión de células musculares de partida en este experimento se sembró en placa en frascos recubiertos de colágeno, p. ej. durante aproximadamente 2 horas. Después de dejarlas adherirse a los fibroblastos, p. ej. aproximadamente 1 a 2 horas, las células no fibroblásticas fueron transferidas a otros frascos. Después de aproximadamente un día, es decir 24 h, en el que las células fueron guardadas en un incubador a 37°C, 100% de humedad, 95% de aire y 5% de CO₂, las células viables de los frascos fueron recolectadas, centrifugadas a 3500 rpm durante aproximadamente 5 minutos, y sembradas en placa en nuevos frascos. En general, en este tiempo, aproximadamente 1×10^4 a 5×10^4 células viables fueron transferidas a nuevas placas de cultivo. Este procedimiento de transferencia en serie y siembra en placa de las células viables en nuevas placas o frascos de cultivo fue repetido, p. ej. en intervalos de aproximadamente 24 horas, hasta que en las siembras en placa últimas (también llamadas "preplacas"), los fibroblastos fueron agotados y los cultivos se enriquecieron en células mioblásticas derivadas de músculo tempranas, positivas para desmina. Al final del procedimiento de siembra en placa en serie, es decir, en el momento de la última puesta en placa, una población final enriquecida de MDCs comprendía células derivadas de músculo mononucleadas, positivas para desmina (más de aproximadamente el 50%) viables en crecimiento, que fueron usadas para inyecciones y fueron capaces de generar fibras musculares.

La técnica de siembra en placa y cultivo en serie se llevó a cabo a lo largo de un periodo de días hasta que so-

lamente MDCs que estaban agotadas en fibroblastos y células no musculares, y enriquecidas en células mioblásticas mononucleadas, permanecieron viables y en crecimiento en las placas de cultivo. El proceso en serie de siembra en placa y cultivo para conseguir MDCs viables en los cultivos implicó de aproximadamente 3 a 7 días, o aproximadamente de 3 a 6 días, después de la puesta en placa inicial de la muestra de células musculares. La sucesiva transferencia y puesta en placa de las células no fibroblásticas a nuevas placas/frascos permitió un enriquecimiento de MDCs tempranas positivas para desmina, mononucleadas y no fibroblásticas que generaron miofibras en entornos apropiados después de la inyección a animales.

Citometría de flujo: Para determinar la expresión del marcador de superficie, las MDCs fueron incubadas con anticuerpos monoclonales anti-ratón de rata, tanto directos como conjugados con biotina (p. ej. anticuerpos específicos para c-kit, CD34, CD56, Sca-1 y CD45; todos los anticuerpos de Pharmingen) durante 30 minutos, y se añadió conjugado de estreptavidina-aloficocianina a las células marcadas con anticuerpos biotinilados durante 20 minutos. Las células marcadas se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) usando el software Cell Quest.

Histología: Las secciones de músculo y tejido fueron fijadas en glutaraldehído al 1%, se incubaron durante la noche con sustrato X-gal a 37°C, y después se contratiñeron con eosina. La co-localización de β -galactosidasa/GFAP/Hoechst para revelar células derivadas del donante se realizó con anticuerpos primarios contra anti- β -galactosidasa de ratón (1:100, Chemicon, Temecula, CA).

Análisis estadístico: Se realizaron medidas del área de los nervios, así como del diámetro de las miofibras en tejidos inyectados con MDC y con placebo (inyección simulada o *sham*), mediante análisis de imágenes asistido por ordenador de secciones de músculo teñidas mediante histoquímica e inmunohistoquímica. Se usó un test de la *t* en pareja

para comparar las diferencias entre los tejidos inyectados con MDC y con inyección simulada *sham* (placebo). Un nivel de $P < 0,05$ fue considerado significativo para las diferencias entre los valores medios.

5

EJEMPLO 2

Este ejemplo describe la neurorecuperación y la mejora de la función eréctil usando MDCs en un modelo de ratas de disfunción eréctil posterior a una prostatectomía radical. A pesar de los avances en técnicas quirúrgicas, la disfunción eréctil (ED) es una complicación común en los hombres que han sido sometidos a una prostatectomía radical. En respuesta a indicaciones ambientales y de acuerdo con la presente invención, se encontró que las MDCs promueven y/o potencian la regeneración axonal en los sistemas nerviosos central y periférico. A la vista de la capacidad de las MDCs para facilitar la regeneración de los nervios periféricos, se realizaron experimentos para evaluar las MDCs como terapia para la disfunción eréctil posterior a una prostatectomía radical.

Se tomó una biopsia de músculo esquelético del miembro posterior de un ratón adulto normal y se sometió a la técnica de la preplaca para obtener MDCs como se ha descrito. MDCs de ratón alogénico aisladas a partir de la técnica de siembra en placa/cultivo (es decir, a los aproximadamente 5 a 6 días de cultivo en serie fueron transducidas con retrovirus modificado por ingeniería genética para expresar el gen reportero de la β -galactosidasa. La sección transversal o transección del nervio cavernoso en ratas fue usada como modelo de disfunción eréctil posterior a una prostatectomía radical. Los tres grupos experimentales incluían: (1) un grupo de control o testigo (C, $n = 5$); (2) un grupo sometido a la transección bilateral del nervio cavernoso con inyección simulada (T, $n = 6$); y (3) un grupo sometido a la transección bilateral del nervio cavernoso que recibió inyecciones de MDC (3×10^5 células(cada lado) en el sitio de la transección (M, $n = 6$). Dos semanas después de la ciru-

gía, se introdujo un tubo PE 20 conectado a un transductor de presión en el cavernoso, y se midieron las presiones intracavernosas (ICP) durante la estimulación eléctrica (20 Hz, 0,5 ms, 10 V) del nervio pélvico. Los animales fueron
5 después sacrificados y los tejidos que rodean el sitio de la transección del nervio cavernoso fueron retirados para tinción con LacZ.

Los valores de ICP máximos para los grupos C, T y M fueron $115 \pm 11,2$ cm de H₂O, $25,4 \pm 6,6$ cm de H₂O y $52,5 \pm$
10 $9,5$ cm de H₂O, respectivamente. La ICP del grupo tratado con MDC (grupo M) fue significativamente mayor que la del grupo inyectado con placebo ($p < 0,05$). La tinción para LacZ reveló muchas células LacZ (+) alrededor del área inyectada con MDC. Los resultados demuestran una evidencia
15 inmunohistológica y funcional para la capacidad de las MDCs para reparar nervios periféricos lesionados y mejorar la función eréctil. De acuerdo con la presente invención, la disfunción eréctil es una condición candidata para el tratamiento usando MDCs en el momento de la prostatectomía ra-
20 dical.

EJEMPLO 3

Este ejemplo describe un estudio y protocolo clínicos, y la experimentación relacionada, para investigar un trata-
25 miento para prevenir, reducir o mejorar los problemas de la incontinencia urinaria por estrés y la disfunción eréctil, en el momento de la cirugía de prostatectomía radical, inyectando MDCs autólogas.

Hombres de al menos 18 años de edad con cáncer de
30 próstata y que están a punto de ser sometidos a cirugía de prostatectomía radical, y habiendo dado resultados negativos en los análisis de hepatitis B, hepatitis C, VIH y alergias a proteína bovina, pueden ser escogidos para su participación en el estudio. Los pacientes elegibles que
35 dan su consentimiento a su participación en el estudio visitan la clínica urológica para un procedimiento ambulatorio inicial en el que se recogen células musculares usando

una técnica de biopsia con aguja. Los especímenes o piezas de la biopsia son procesados mediante una técnica de siembra en placa/cultivo de células sucesiva, que tiene por resultado una población final enriquecida de células derivadas de músculo, mononucleadas, en proliferación, viables y no fibroblásticas (células de mioblastos) que pueden dar lugar a miotubos. El procesamiento de las células sigue las normas de buena práctica de los tejidos para prevenir la contaminación y para preservar la función y la integridad del tejido, e incluye procedimientos definidos para el manejo, el procesamiento y la identificación de células y tejidos. La población final enriquecida de MDCs se expande en cultivo para obtener números crecientes de células para su uso subsiguiente.

15 Varias semanas más tarde, las MDCs aisladas y expandidas se congelan y se envían al médico investigador. Las MDCs expandidas son suministradas al clínico congeladas en un medio criogénico que contiene albúmina de suero humano (HSA). Las MDCs se descongelan después y se diluyen con solución salina fisiológica para ser inyectadas al paciente por el médico o el clínico. Los materiales en contacto con el tejido periuretral del paciente incluyen las propias MDCs del paciente, el medio criogénico en el que se suspende y se envía, y la solución salina fisiológica usada para diluir la mezcla para inyección.

25 La suspensión resultante es inyectada en la anastomosis uretral del paciente en el momento de su cirugía de prostatectomía radical bajo visión directa. Los pacientes son evaluados en relación con la aparición de efectos secundarios adversos e incontinencia urinaria y función sexual al cabo de 1, 3, 6 y 12 meses después del tratamiento. Si no hay mejoría en el seguimiento de 6 meses, los pacientes pueden elegir entre recibir un tratamiento repetido con la inyección de células musculares, mediante un breve procedimiento de inyección citoscópica ambulatoria, sin repetir la biopsia muscular.

Se espera que el efecto del tratamiento inicial surja de la masa física añadida resultante de la suspensión de MDC inyectada. Sin embargo, las células pueden permanecer viables y persistir donde fueron inyectadas para un efecto
5 de larga duración. En definitiva, y sin ánimo de vincularse a ninguna teoría, el entorno de tejido "instruye" a las MDCs inyectadas para remodelarse en el tejido pareciéndose al esfínter uretral natural, lo que, a su vez, mejora la incontinencia a lo largo del tiempo. Además, la inyección
10 de MDCs en el sitio de las anastomosis de la prostatectomía radical puede servir para proteger los nervios penianos durante la recuperación, y promover o potenciar el retorno de la función eréctil.

Este ejemplo comprende un estudio a escala pequeña, en
15 un solo centro, de hasta 20 pacientes, tendente a identificar la seguridad y eficacia potencial del tratamiento propuesto. Los pacientes sirven como sus propios controles, con medidas cuantitativas y cualitativas de la incontinencia y la función eréctil establecidas antes del tratamiento
20 y varias veces después del tratamiento. Se hace el seguimiento de los pacientes durante un año después del tratamiento. Para la inyección, las MDCs autólogas se suspenden en solución salina.

El protocolo que sigue se emplea en el momento de la
25 cirugía de prostatectomía radical:

1. Usando técnicas estándar, el paciente se prepara para prostatectomía radical. La inyección de MDC se realiza al concluir la intervención quirúrgica, después de que la próstata ha sido extirpada y el cuello de la vejiga y la
30 uretra han sido re-anastomizadas.

2. La suspensión de MDCs congelada se descongela diluyéndola con un volumen igual de solución salina fisiológica, y se aspira en una jeringuilla.

3. La jeringuilla pre-llenada se une a la aguja de
35 la jeringuilla de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

4. Bajo visión directa, se introduce la punta de la aguja en la uretra y el tejido periuretral y se inyecta lentamente la suspensión de MDC preparada. Esto se hace en tres localizaciones alrededor de la anastomosis.

5 5. Se registra la posición o las posiciones y el volumen de la suspensión de células que se ha inyectado.

En el momento de la inyección citoscópica a los 6 meses, si no hay mejoría y el paciente pide repetir la inyección, se sigue el protocolo siguiente:

10 1. Usando técnicas estándar, el paciente se prepara para una cistoscopia con la administración de la anestesia apropiada para la inserción del cistoscopio.

2. Se prepara el cistoscopio con lente y aguja transuretral, teniendo cuidado de observar que la punta de la aguja está contenida dentro de la vaina del cistoscopio distal.

3. Se hace avanzar con cuidado el cistoscopio a la localización deseada.

20 4. Se descongela la suspensión de MDC diluyéndola con un volumen igual de solución salina fisiológica, y se aspira en una jeringuilla.

5. Se conecta la jeringuilla pre-llenada al cistoscopio de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

25 6. Bajo visión directa, se introduce la punta de la aguja en el mecanismo del esfínter uretral y la suspensión de MDC preparada se inyecta lentamente en la pared uretral submucosal.

30 7. Se continúa la inyección hasta que se observa el cierre uretral, usando múltiples localizaciones periuretrales, si es necesario.

8. Se registra la posición o las posiciones y el volumen de la suspensión de células que se ha inyectado.

35 El adiestramiento y la experiencia que se requieren para el uso de la inyección de MDC incluyen estar familiarizado con la prostatectomía radical, la cistoscopia y la inyección de agentes de volumen periuretrales.

Los clínicos y médicos expertos en la técnica saben que la incontinencia urinaria por estrés y la disfunción eréctil son las dos complicaciones más comunes y más molestas de una operación radical de cáncer de próstata. La in-

5 continencia urinaria por estrés debida a deficiencia intrínseca del esfínter (ISD) resulta de una malfunción intrínseca del esfínter uretral distal. En el hombre, la ISD se desarrolla normalmente después de una prostatectomía radical. La prevalencia de la incontinencia posterior a una

10 prostatectomía sigue aumentando, en paralelo al aumento del número de intervenciones quirúrgicas realizadas anualmente. En una serie de 60 pacientes, el 67% de la incontinencia posterior a la prostatectomía fue debida a ISD solo, usando la técnica de LPP como base para esta evaluación (Carlson,

15 K. V. y Nitti, V. W., Prevention and management of incontinente following radical prostatectomy. *Urol Clin North Am*, 28: 595. 2001). En otro estudio llevó a cabo una evaluación urodinámica de prospección en 20 pacientes que habían sido sometidos a una prostatectomía radical; en 17 de los 20 pa-

20 cientes se encontró una componente de presión del esfínter uretral intrínseca post-operatoria (Pfister, C. et al., Assessment of the intrinsic urethral sphincter componente function in postprostatectomy urinary incontinente. *Neurol Urodyn*, 21: 194, 2002).

25 La disfunción eréctil (ED) se define como la constante incapacidad para conseguir o mantener una erección adecuada para la satisfacción sexual. Se estima que la ED afecta a aproximadamente 30 millones de hombres solo en los EE.UU. (World Health Organization Internacional Consultation on

30 Impotence. (WHO, 1st Internacional Consultation in Impotence, Plymbridge Distributors Ltd. Plymouth, GB, 1998). Datos sobre la calidad de vida han documentado la importancia de la disfunción eréctil para otras condiciones crónicas de la salud, tales como la depresión. Como tal, la ED es devastadora no solo para el varón afectado sino también para su

35 pareja sexual. A pesar de los avances en las técnicas quirúrgicas, la ED aparece aún normalmente después de que el

varón ha sido sometido a una prostatectomía radical. La recuperación puede prolongarse en aquellos cuyas erecciones vuelven, observándose lentas mejorías en la iniciación y mantenimiento de una erección hasta 36 meses post quirúrgicamente. El traumatismo asociado con la eliminación de la próstata que cubre los haces neurovasculares puede producir neuropraxia. Además, la inflamación local y la respuesta inmunitaria pueden también causar ED. El tratamiento convencional, por ejemplo con viagra, no siempre es eficaz o seguro para los hombres con un historial de enfermedad cardiovascular.

Las pruebas no clínicas de la inyección de MDC en el tracto urinario inferior han sido realizadas en varios estudios con animales. En resumen, tales estudios incluyen: 1) una evaluación preliminar de la persistencia y diferenciación de MDC después de la inyección en la pared de la vejiga de un modelo de ratón; 2) una estimación de la persistencia de MDC inyectada en comparación con colágeno bovino inyectado en un modelo de rata autólogo; 3) evaluación de MDCs alogénicas inyectadas periuretralmente en un modelo de incontinencia en ratas; 4) resultado de la MDC en el modelo de incontinencia post-prostatectomía; y 5) efecto de la inyección de MDC en la disfunción eréctil en el modelo de prostatectomía. Tales estudios proporcionan modelos de factibilidad para tratamiento humano usando MDCs e inyección después de la cirugía de próstata.

Modelo de incontinencia por estrés post-prostatectomía: Para producir una deficiencia intrínseca de esfínter similar a la de la SUI posterior a la prostatectomía radical en pacientes humanos, los tejidos circundantes laterales a la uretra media fueron cauterizados en ratas Sprague Dawley hembras adultas ($n = 16$). Una semana después de la cauterización, $1,5 \times 10^6$ MDC, transfectadas con Lac Z, fueron inyectadas periuretralmente en la uretra media. Las 16 ratas fueron divididas en 3 grupos, y evaluadas a las 2, 4 o 6 semanas después de la inyección de MDC. Como testigos, 9 ratas fueron sometidas a cauterización seguida por la in-

yección con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), una semana más tarde. La función del esfínter fue estudiada usando la técnica de la mesa vertical inclinada/pinza de presión intravesical para medir las presiones del punto de pérdida (LPPs: Leak Point Pressures). La localización de la MDC fue establecida usando tinción rápida de cadena pesada de miosina y Lac Z.

La electrocauterización de la uretra no tuvo efecto sobre la función de la vejiga. Las LPPs medias de las ratas 2, 4 y 6 semanas después de la inyección de MDC fueron $38,2 \pm 2,2$ cm de H_2O , $43,1 \pm 2,6$ cm de H_2O y $51,5 \pm 0,9$ cm de H_2O , respectivamente. Las LPPs medias de las ratas 2, 4 y 6 semanas después de la inyección de HBSS fueron $17,2 \pm 1,4$ cm de H_2O , $26,9 \pm 1,9$ cm de H_2O y $25,5 \pm 1,3$ cm de H_2O , respectivamente. En comparación con los grupos testigo coincidentes en el tiempo, los valores incrementados de las LPPs en cada grupo inyectado con MDC fueron significativamente más altos ($p < 0,001$). Los análisis histológicos indicaron que la MDC contribuyó a la regeneración del músculo estriado y el nervio. Así, la inyección de MDC periuretral reparó el esfínter uretral dañado de ratas en ISD.

Modelo de disfunción eréctil posterior a la prostatectomía: El nervio que inerva el cavernoso es crucial en la iniciación y el mantenimiento de una erección en los varones. La lesión de este nervio es la principal fuente de disfunción eréctil después de una prostatectomía radical. El propósito de este experimento era determinar si las MDCs promueven y/o potencian la regeneración axonal periférica, resultando así una recuperación más rápida de la disfunción de la erección en un modelo de prostatectomía radical en ratas.

En este experimento, y de un modo similar a lo descrito en el Ejemplo 2, se obtuvieron MDCs a partir de músculo esquelético, a través de cultivos sucesivos, como se describe en el presente texto, para enriquecer en células derivadas de músculo tempranas que incluyen mioblastos. Se usó la transección del nervio cavernoso como modelo de dis-

función eréctil posterior a la prostatectomía radical. Los tres grupos experimentales incluían un grupo testigo (C, n = 6); un grupo con el nervio cavernoso seccionado bilateralmente (T, n = 6); un grupo con el nervio cavernoso seccionado bilateralmente e inyección de vehículo (V, n = 6); y un grupo con el nervio cavernoso seccionado bilateralmente, con inyecciones (3×10^5 células cada lado) en el sitio de la lesión (M, n = 6). Dos semanas después de la cirugía, se cortó la sínfisis del pubis y el hueso pélvico se retrajo lateralmente para exponer el nervio cavernoso distal. Se puso un electrodo de estimulación en el nervio pélvico y un electrodo de registro se colocó distalmente al sitio de la lesión. Los potenciales de acción compuesta (CAP) fueron medidos después de cada estímulo (X Hz, 0,25 ms, 10 V). Un tubo PE 20 conectado a un transductor de presión fue introducido en el cavernoso y se midieron las presiones intracavernosas (ICP) durante la estimulación eléctrica (20 Hz, 0,5 ms, 10V) del nervio pélvico.

Los resultados de este experimento indicaron que la amplitud de los CAP del nervio cavernoso fue mayor en el grupo M en comparación con los grupos T y V. Sin embargo, los CAPs del grupo M no fueron tan grandes como los del grupo testigo. El valor medio de la ICP máxima para el grupo M ($52,5 \pm 9,5$ cm de H_2O) fue también significativamente mayor que el valor correspondiente al grupo T ($25,4 \pm 6,6$ cm de H_2O), ($p < 0,05$). La ICP del grupo C fue $115 \pm 11,2$ cm de H_2O . Este análisis demostró que los CAP pueden servir como un buen indicador de la recuperación del nervio, como se observa a partir de su correlación con la ICP después de la estimulación en campo eléctrico. La aplicación de la MDC facilitó la recuperación del CAP y mejoró la función eréctil en ratas lesionadas en el cavernoso, en comparación con la lesión en grupos inyectados con solamente placebo. En consecuencia, en un modelo de ED que implica daño en el nervio peneano, la inyección de MDCs alrededor del sitio del daño del nervio mejoró la función eréctil, apoyando así el uso de MCDs como agentes que facilitan la recuperación

de las disfunción eréctil después de una prostatectomía radical.

Análisis y valoración del riesgo: Los riesgos asociados con la prostatectomía radical en varones están completamente separados de la inyección de MDCs. Los riesgos asociados con la participación en el estudio clínico que implica la inyección de MDC para tratar la ED incluyen los relacionados con lo que sigue:

Cistoscopia: Se espera que los riesgos de la cistoscopia sean infrecuentes (aparecen en 1 a 10% de las personas) e incluyen la posibilidad de molestias, hemorragia e infección. Los efectos secundarios que son raros (se espera que aparezcan en menos de un 1% de las personas) incluyen incapacidad para orinar después del procedimiento y punción de la vejiga.

Biopsia muscular: las expectativas de riesgos de la biopsia muscular son infrecuentes (aparecen en 1 - 10% de las personas) e incluyen la posibilidad de infección en la herida, hematoma y dolor.

Punción venosa: Los riesgos de la punción venosa incluyen hemorragia, molestias, aturdimiento, dolor, moradura y, raramente, una infección en el sitio en el que se extrae la sangre.

Inyección celular: El riesgo potencial de la inyección celular incluye una respuesta inmunitaria, aunque es de esperar que este riesgo sea mínimo porque se usan células autólogas y los pacientes son cribados en cuanto a la reacción potencial contra trazas de proteínas bovinas que pudieran estar presentes.

Cateterismo urinario: Se espera que los riesgos del cateterismo urinario sean infrecuentes (dándose en un 1 - 10% de la gente), e incluyen la posibilidad de incapacidad transitoria para orinar, molestias durante la introducción del catéter, infecciones del tracto urinario, hemorragia y molestias o dolor.

Estudio urodinámico: Los riesgos del estudio urodinámico son similares a los del cateterismo urinario e incluyen la

posibilidad de incapacidad transitoria para orinar, molestias durante la introducción del catéter, infecciones del tracto urinario y hemorragia.

Prueba de punción de piel bovina: El riesgo potencial de

5 la prueba de alergia de punción de la piel para determinar si un paciente es alérgico a la proteína bovina (de vaca) puede incluir una pequeña cantidad de hemorragia, dolor, erupción cutánea o posiblemente choque anafiláctico. Es de esperar que los riesgos adicionales sean comparables a los
10 asociados con el tratamiento estándar usando inyecciones de colágeno e incluyen la posibilidad de incontinencia continuada, aumento de la incontinencia, retención de orina, infección, obstrucción de la salida de la vejiga, fiebre, formación de tumor, desplazamiento del material inyectado y
15 una reacción alérgica contra los reactivos inyectados. Se espera que los riesgos de la inyección celular sean mínimos debido al uso de células autólogas y se basan en los resultados satisfactorios en estudios con modelos animales.

20 **Objetivos de la investigación clínica:**

Reivindicaciones y rendimiento deseado a verificar

El objetivo del estudio es identificar la seguridad y la potencial eficacia del tratamiento propuesto. El rendimiento deseado del tratamiento con MDC incluye una seguridad
25 razonable en términos de la incidencia de volumen de orina residual, infección del tracto urinario, otros efectos adversos y eficacia en la prevención de la incontinencia urinaria y la disfunción sexual en términos de una calidad de vida (QOL) del paciente mejorada, mejor presión
30 del punto de fuga (LPP), y mejor número de episodios de incontinencia por un periodo de 24 horas.

Riesgos de efectos adversos previsibles a evaluar.

Los riesgos de hemorragia y punción son evaluados mediante cistoscopia después de la inyección. Los riesgos de
35 incontinencia continuada, infección del tracto urinario, retención de orina, desplazamiento de células infectadas y reacción alérgica contra los reactivos inyectados son eva-

luados mediante un informe del paciente, un diario registrado de evacuación del paciente y el seguimiento clínico al cabo de 1, 3, 6 y 12 meses después del tratamiento.

Hipótesis específicas a evaluar.

- 5 Las hipótesis a evaluar son que el tratamiento con MDC es razonablemente seguro en términos de la incidencia de hemorragias, punción, infección del tracto urinario, orina retenida tras la micción, y se observa evidencia de la eficacia en una mejor calidad de vida (QOL), número reducido
10 de episodios de incontinencia por cada periodo de 24 horas, y aumento de LPP y mejora en la función eréctil.

Diseño de la investigación:

- Descripción del tipo de investigación a realizar con base
15 lógica para la elección.

- Este estudio es diseñado como estudio prospectivo a pequeña escala, en un solo centro, en el que hasta 20 pacientes hacen las veces de sus propios controles o testigos. Este diseño es apropiado para la identificación preliminar de la seguridad y la eficacia potencial del tratamiento propuesto.
20

Población testigo.

- Los pacientes sirven como sus propios controles en este estudio, con medidas cuantitativas y cualitativas de la incontinencia evaluadas antes del tratamiento en comparación con las mismas medidas evaluadas a diversos tiempos después del tratamiento.
25

Medidas tomadas para evitar tendencia.

- La confianza en medidas objetivas tales como el diario vesical incluyendo la recogida de compresas cada 24 horas y la frecuencia de episodios de incontinencia, servirán para minimizar el potencial de tendencia con el uso de los pacientes como sus propios controles.
30

Puntos finales primarios y secundarios (resultados).

- 35 Los puntos finales primarios incluyen: incidencia de efectos secundarios adversos; LPP de Valsalva, que se observa mediante un estudio urodinámico; frecuencia de episo-

dios de incontinencia registrados en el diario vesical; y puntuaciones de la UCLA de la continencia y la función sexual para el cáncer de próstata. Los puntos finales secundarios incluyen: vigilancia de la calidad de vida del paciente/satisfacción del paciente (a la salida); y volumen de orina residual.

Variables a medir con base lógica para su selección.

Las variables que hay que evaluar en los participantes del estudio incluyen el historial médico, signos vitales, diario vesical, función sexual, CBC, hemoquímica, análisis de orina, estado de gravidez, alcance de la hipermovilidad uretral (si la hay), volumen de orina residual y aspecto uretral mediante cistoscopia, presión en el punto de fuga mediante urodinámica.

Métodos y programación en el tiempo para la evaluación, el registro y el análisis de las variables.

Para el registro de datos se utilizan formularios de datos estandarizados. El historial médico, examen físico, signos vitales, hemoquímica, análisis de orina y estado de gravidez se determinan por métodos estándar. La continencia y la función sexual se evalúan mediante el diario vesical y completando el UCLA Prostate Cancer Index. El aspecto visual de la uretra y la vejiga se evalúa mediante cistoscopia. La presión del punto de fuga (LPP) se evalúa mediante urodinámica. El volumen de orina residual posterior a la evacuación se establece por una técnica de ultrasonidos estándar. La programación para la evaluación de las variables se presente en la siguiente tabla de Programa de Eventos:

30

Programa de Eventos

EVENTO	Cribado	Biopsia	RRP/inyección	M-1	M-3	M-6	M-12
Historial médico	X						
Signos vitales	X	x1/x2	x1/x2	X	X	X	X
Lista de medicaciones	X	X		X	X	X	X
Examen físico	X						X
Prueba cutánea de alergia	X						
Estudio urodinámico						X	

Cistoscopia						X	
Volumen de orina residual (por US)	X			X	X	X	X
Distribución del diario vesical (incluyendo recogida de compresa en 24 h)	X			X	X	X	X
UCLA Prostate Cancer Index	X			X	X	X	X
Cuestionario de mejoría global	X			X	X	X	X
Aparición de efectos secundarios adversos		x2	X	X	X	X	X
Revisión del diario vesical		X		X	X	X	X
Lab:							
CBC/Hemoquímica	X						X
Virus de transmisión hemática	X						
Cultivo de orina	X						
Análisis de orina (incluyendo tira reactiva*)	X		X	X	X	X	X

M-1: mes 1 después de la inyección

x1: antes de biopsia/inyección

* una prueba positiva con tira reactiva requerirá cultivo de orina

5 x2: después de biopsia/inyección

Además de los eventos programados presentados en la tabla, se establece contacto telefónico con los pacientes dentro de las 24 a 48 horas de la inyección para evaluar la aparición de cualquier posible efecto adverso. El seguimiento de pacientes que reciben una segunda inyección a los 6 meses reanuda el programa para la primera inyección (es decir, 24 - 48 horas, y 1, 3, 6 y 12 meses después), para un tiempo total en el estudio de 15 o bien 18 meses.

15 Criterios para la inclusión y la exclusión.

Los hombres elegibles para la participación en el estudio deben cumplir los siguientes criterios de inclusión:

- (i) haber proporcionado consentimiento informado por escrito;
- (ii) tener al menos 18 años de edad;
- (iii) tener cáncer de próstata localizado y estar programado para cirugía de prostatectomía radical;
- (iv) tener revestimiento mucosal viable a lo largo del tracto urinario y la vejiga;
- (v) haber dado negativo para hepatitis B, hepatitis C y HIV;
- (vi) haber dado negativo para la sensibilidad a posibles cantidades traza de proteína bovina;
- (vii) tener un cultivo

de orina negativo, o cultivo positivo con expectativas de aclaramiento en el tiempo de tratamiento; (viii) tener una expectativa de vida de al menos 1 año; (ix) estar de acuerdo en estar disponible para las evaluaciones de seguimiento, según requiera el protocolo; y (x) tener los valores de PTT INR dentro del margen normal. Los hombres en los que se da cualquiera de los criterios de exclusión que siguen han de ser excluidos del reclutamiento: (i) tener reflujo vesicouretral conocido, vejiga superactiva, inestabilidad del detrusor o alta inestabilidad a la presión; (ii) estar bajo medicación actual por incontinencia urgente; (iii) tener incontinencia urinaria de etiología neurogénica; (iv) tener una sonda permanente; (v) tener trastornos neuromusculares; (vi) tener diabetes; (vii) tener fibrosis del tejido en los sitios de inyección probables; (viii) tener cualquier condición que podría conducir a complicaciones post-operatorias importantes, incluyendo infección actual, u orina residual elevada por obstrucción de la salida de la vejiga (esto es, PVR > 150 mL repetidas veces); (ix) tener obesidad mórbida (definida como 45 kg sobre su peso corporal ideal) o no ser de esperar un beneficio del tratamiento; (x) tener condiciones actuales o agudas que implican cistitis o uretritis; (xi) tener un sistema inmunitario comprometido debido a un estado patológico o esteroides o inmunosupresores crónicos; o (xii) tener cualquier condición que imposibilite el tratamiento debido a contraindicaciones y/o advertencias en la etiqueta del producto de control.

Después de consentir en la participación en el estudio y de cumplir todos los criterios de admisión, los pacientes son enrolados en el estudio en el momento de la recogida de la biopsia de músculo. Los pacientes que consienten en la participación en el estudio y satisfacen los criterios de entrada en el mismo, son instruidos en métodos para completar un diario de estudio de tres días. Se rellena un cuestionario sobre la función de la vejiga y la función sexual y un cuestionario de mejora global. Los pacientes han entregado también muestras de sangre y orina para análisis de

laboratorio, incluyendo cribado para virus de transmisión hemática. Los pacientes se someten a ultrasonidos para la determinación del volumen de orina residual. Además, los pacientes se someten a una prueba cutánea de alergia para
5 determinar si son sensibles a posibles cantidades traza de proteínas bovinas.

Aproximadamente dos semanas más tarde, los pacientes visitan la clínica urológica para un procedimiento ambulatorio inicial en el que se recolectan células de músculo
10 usando una técnica de biopsia con aguja. Aproximadamente cuatro semanas después de la biopsia, los pacientes vuelven al hospital para su intervención de prostatectomía radical en la que las propias células del paciente procesadas son inyectadas periuretralmente usando una pequeña aguja. El
15 paciente proporciona también sus diarios de estudio para evaluación, completa los cuestionarios de QOL y de mejoría global, entrega una muestra de orina para análisis de laboratorio, y se presta a la determinación mediante ultrasonidos de su volumen de orina residual.

A aproximadamente entre 24 y 48 horas después de la inyección, se entra en contacto telefónico con los pacientes para determinar si se han presentado efectos secundarios adversos. Los pacientes vuelven para seguimiento al cabo de los meses 1, 3, 6 y 12. En cada seguimiento, los
20 pacientes entregan sus diarios vesicales en los que se incluye la recogida de compresas de 24 h, rellenan un cuestionario de QOL, se prestan a la toma de muestras de análisis y orina para análisis, y se someten a ultrasonidos para la determinación del volumen de orina residual. En el tiempo correspondiente a los 6 meses, los pacientes también se
25 someten a una cistoscopia para la evaluación del aspecto del tejido uretral y a un estudio urodinámico para evaluar la presión del punto de fuga. Si no hay mejoría en el 6° mes de seguimiento, los pacientes pueden optar por la repetición del tratamiento con la inyección con células de músculo, sin repetir la biopsia de músculo. En este caso el
30 seguimiento retorna al programa para la primera inyección
35

(es decir, 24 - 48 horas, y 1, 3, 6 y 12 meses de seguimiento). Se usa una aguja para biopsias para la recogida de tejido muscular. Se usa solución salina fisiológica para la dilución y la descongelación de las MDCs congeladas, que se congelan en un medio criogénico que contiene HSA. Las MDCS
5 pueden contener trazas de suero bovino.

Los pacientes permanecen en el estudio hasta que han completado un seguimiento de 12 meses después de la inyección de sus MDCs. Si en algún momento algún paciente afirma
10 que ya no desea seguir participando en el estudio, puede retirarse del mismo sin perjuicio y sin pérdida de las atenciones. A discreción del investigador principal, los pacientes pueden ser retirados del estudio si se considera que es lo mejor para su atención médica. A los pacientes
15 que eligen retirarse del estudio se les pide que completen los procedimientos de visita de salida, pero no son obligados a ello.

Se han previsto hasta 20 pacientes por estudio. Se cuenta de antemano con que el reclutamiento podría completarse en un año. Cada uno de los pacientes reclutados recibe una inyección inicial, permitiéndose una inyección adicional en el mes 6° de seguimiento si el paciente no mejora o ha regresado a la línea base. Los pacientes son objeto de seguimiento durante un año a partir de la última inyección.
20 Las muestras de tejido del paciente son conservadas por el responsable del estudio durante 18 meses después de la inyección de MDCs, y después de ello son destruidas.
25

REIVINDICACIONES

1^a. Células derivadas de músculo (MDCs) autólogas, excluyendo las MDCs embrionarias humanas, para ser usadas
5 en promover o potenciar la neurorrecuperación después de la prostatectomía, y la recuperación de la función eréctil, comprendiendo dicho uso administrar dichas MDCs a un paciente en necesidad de las mismas.

10 2^a. Células derivadas de músculo (MDCs) autólogas según la reivindicación 1^a, en donde las MDCs son administradas:

- a) en uno o más sitios de la anastomosis de la prostatectomía;
- 15 b) en, o alrededor de, los nervios cavernosos, nervios pélvicos, nervios hipogástricos, plexos pélvicos y ganglios autónomos pélvicos;
- c) en el pene;
- d) en una cantidad de aproximadamente 10^5 a 10^6 células por cm^3 de tejido del paciente; o
- 20 e) junto con un vehículo, diluyente o excipiente aceptable fisiológicamente.

3^a. Células derivadas de músculo (MDCs) autólogas según la reivindicación 1^a, que comprende además la re-administración citoscópica de MDCs al paciente después de la cirugía.

4^a. Células derivadas de músculo (MDCs) autólogas según la reivindicación 1^a, en donde las MDCs son:

- a) enriquecidas a partir de una suspensión de células musculares, sembrando en placa la suspensión en al menos dos cultivos sucesivos, de forma que se eliminan los fibroblastos y las células no musculares, y se enriquece en
35 una población final de MDCs mononucleadas, que comprende mioblastos; o

b) obtenidas a partir de tejido del músculo esquelético.

5 5^a. Células derivadas de músculo (MDCs) autólogas según la reivindicación 1^a, en donde una población clonada de las MDCs es introducida en el receptor.