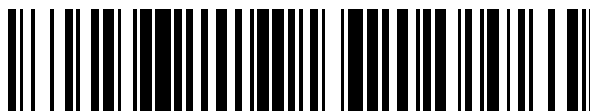


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 948 712**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/077** (2010.01)

**A61K 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2018 PCT/EP2018/085015**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2019 WO19115790**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2018 E 18815731 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2023 EP 3724319**

54 Título: **Procedimientos de obtención de células derivadas de músculo**

30 Prioridad:

**14.12.2017 EP 17207417**

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

**18.09.2023**

73 Titular/es:

**INNOVACELL AG (100.0%)**

**Mitterweg 24**

**6020 Innsbruck, AT**

72 Inventor/es:

**THURNER, MARCO;**

**MARGREITER, EVA;**

**SCHWAIGER, WOLFGANG;**

**ASIM, FAHEEM MUHAMMAD y**

**MARKSTEINER, RAINER**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 948 712 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos de obtención de células derivadas de músculo

La presente invención se refiere a procedimientos para obtener células derivadas del músculo esquelético (SMDC), y al uso de SMDC en un procedimiento para mejorar la conexión neuro-muscular y para su uso en el tratamiento de una disfunción muscular, en la que la disfunción muscular es la incontinencia, en particular una incontinencia urinaria y/o anal.

La capacidad de mantener la continencia es fundamental para nuestro bienestar como seres sociales. La pérdida de la continencia anal provoca discapacidades físicas, fisiológicas y sociales. Generalmente se piensa que la incontinencia anal afecta sobre todo a las personas mayores y discapacitadas, pero estos síntomas pueden presentarse en personas de cualquier edad. El espectro de la incontinencia anal, es *decir*, la pérdida de control del contenido del intestino, abarca desde pequeñas marcas de heces en la ropa interior, pasando por la pérdida de flatos, hasta episodios masivos de defecación incontrolada de heces blandas o sólidas. Las razones pueden ser múltiples y complejas. Independientemente de la calidad de vida extremadamente mermada del individuo afectado, la continencia anal alterada supone un factor de coste nada desdeñable para el sistema sanitario público. Además, la incontinencia anal es el segundo motivo más frecuente de hospitalización en las residencias infantiles (más frecuentemente que la demencia). Un tercio de los ancianos ingresados en residencias u hospitales sufren incontinencia fecal.

Dos músculos esqueléticos son importantes para el control voluntario de los órganos de la continencia: el *Musculus sphincter ani externus* y el *Musculus puborectalis* como parte del *Musculus levator ani*. Es probable que los restantes *Diaphragma pelvis* (*M. pubococcygeus*, *M. ischiococcygeus*, *M. iliococcygeus*) desempeñen un papel más o menos de apoyo. El esfínter anal externo se apoya en el *N. pudendus*. Ambos músculos, el *Musculus sphincter ani externus* y el *Musculus puborectalis*, pueden mantener un tono constante directamente proporcional al volumen/cantidad de llenado rectal, cuyo tono disminuye con el inicio del proceso de defecación. El tono constante de la línea de base del *M. puborectalis* produce una "contorsión" de la transición ano rectal hacia la sínfisis formando un ángulo de 90° entre el canal anal y el recto. Este ángulo anorrectal también contribuye al mantenimiento de la continencia anal. Otra función del *M. puborectalis* es retener las heces, al menos parcialmente formadas, si el esfínter anal externo está dañado.

El control de flatos o heces líquidas no es posible por *M. puborectalis*. La continencia anal para estos tipos de heces la proporciona una interacción de los esfínteres anal interno y externo. Las almohadillas hemorroidales proporcionan una oclusión hermética. En estado de reposo, el canal anal está ocluido por la actividad tónica constante de los esfínteres anales externos y la presión de reposo de la línea de base del esfínter anal interno. El esfínter anal interno, que es una continuación y ampliación de la capa de músculo liso circular del colon, proporciona alrededor del 75-85 % de la presión de la línea de base del canal anal cerrado. La actividad de este componente muscular liso se inhibe completamente con una distensión rectal, el llamado reflejo inhibitorio anal rectal. Esta relajación se acompaña de una contracción refleja del esfínter anal externo y del *M. puborectalis* para impedir la defecación.

Como se ha mencionado anteriormente, los procedimientos de tratamiento actuales tienen como objetivo principal la corrección quirúrgica del desgarramiento del esfínter. Esto conduce a una mejora a corto plazo de los síntomas mencionados anteriormente.

Las formas leves de incontinencia anal pueden tratarse con procedimientos conservadores, que pueden mejorar los síntomas. Sin embargo, en los casos más graves, la intervención quirúrgica correspondiente suele producir una mejoría a corto plazo con escasas probabilidades de éxito.

Los procedimientos conservadores de tratamiento comprenden un cambio en la dieta, además de un aumento de la ingesta de fibras, así como, en casos de sensibilidad anal alterada, el uso de tampones anales y enemas rectales. La ingesta de loperamida, en caso necesario, también en combinación con sustancias aglutinantes de ácidos biliares, reduce la motilidad intestinal y aumenta la presión del músculo del esfínter anal. Una nueva forma de terapia utiliza estrógenos aplicados localmente para mujeres posmenopáusicas; sin embargo, faltan estudios aleatorizados.

Sin embargo, un número distinto de pacientes requiere una intervención quirúrgica: Lo más frecuente es que la reparación del esfínter (aproximal o superpuesta) se aplique para el tratamiento agudo de lesiones traumáticas tras el parto, pero también de forma secundaria tras lesiones del esfínter anal causadas por otras circunstancias. Las perspectivas a corto plazo son buenas, los resultados a largo plazo son pobres.

Para la incontinencia urinaria de esfuerzo se ha propuesto inyectar células derivadas del músculo en el lugar lesionado para mejorar la incontinencia urinaria de esfuerzo. Sin embargo, la incontinencia urinaria de esfuerzo no es comparable a la incontinencia anal, ya que las causas de ambas enfermedades son completamente diferentes. Además, los dos sistemas (urinario *frente a* anal) tampoco tienen una función similar. El tracto urinario sólo debe proporcionar un control suficiente de los líquidos. El recto es capaz de controlar el contenido sólido, líquido y gaseoso. Esto requiere unos requisitos sensoriales completamente distintos. Por lo tanto, la anatomía es bastante diferente entre el tracto genitourinario y el recto. Por ejemplo, mientras que existe un músculo esfínter anal externo que rodea el recto, no hay ninguno equivalente que rodee completamente la uretra. Además, dorsalmente a la uretra apenas se encuentran músculos estriados en el varón adulto, mientras que el esfínter anal externo del recto es un músculo estriado completamente circular.

- Los mioblastos, precursores de las fibras musculares, son células musculares mononucleadas que difieren en muchos aspectos de otros tipos de células. Los mioblastos se fusionan de forma natural para formar miotubos multinucleados postmitóticos que dan lugar a la expresión y liberación a largo plazo de proteínas bioactivas. Los mioblastos se han utilizado para la liberación de genes en el músculo para enfermedades relacionadas con el músculo, como la distrofia muscular de Duchenne, así como para enfermedades no relacionadas con el músculo, por ejemplo, la liberación de genes de adenosina deaminasa humana para el síndrome de deficiencia de adenosina deaminasa; la transferencia de genes de proinsulina humana para la diabetes mellitus; y la transferencia de genes para la expresión de tirosina hidroxilasa para la enfermedad de Parkinson; la transferencia y expresión del Factor IX para la hemofilia B, la liberación de la hormona de crecimiento humana para el retraso del crecimiento.
- El uso de mioblastos para tratar la degeneración muscular, reparar el daño tisular o tratar enfermedades se describe en Patentes de EE.UU. 5.130.141 y 5,538,722. También se ha empleado el trasplante de mioblastos para la reparación de la disfunción miocárdica Robinson et al., 1995; Murry *et al.*, 1996; Gojo *et al.*, 1996; Zibaitis *et al.*, 1994.
- Los mioblastos también pueden utilizarse para reparar lesiones musculares relacionadas con el mantenimiento de la continencia, en particular la incontinencia urinaria y/o anal. Las células derivadas del músculo esquelético que comprenden los mioblastos se conocen como células progenitoras de los músculos esqueléticos que pueden sufrir diferenciación para reparar lesiones musculares en adultos.
- En el estado de la técnica se describen varios procedimientos para aislar células derivadas del músculo esquelético. Un procedimiento distinto para el aislamiento de células derivadas del músculo esquelético aplica una técnica de pre-placa. De este modo, se obtienen células de un tejido muscular y se transfiere consecutivamente una suspensión de células individuales del mismo a un recipiente de cultivo celular diferente, también conocido como pre-plateado, para eliminar las células no miogénicas, como los fibroblastos, y enriquecer las células miogénicas, como los mioblastos. Por ejemplo, Rando y Blau, 1994 describen tal purificación de mioblastos en cultivo celular (T. A. Rando y H. M. Blau, "Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy," J. Cell Biol., vol. 125, no. 6, pp. 1275-1287, Jun. 1994). El uso de múltiples etapas de pre-placa, en comparación con una sola pre-placa, mejoró la pureza y la supervivencia de los mioblastos, lo cual es necesario para el efecto del tratamiento en la terapia de transferencia de mioblastos (Z. Qu, L. Balkir, J. C. T. van Deutekom, P. D. Robbins, R. Pruchnic y J. Huard, "Development of Approaches to Improve Cell Survival in Myoblast Transfer Therapy", J. Cell Biol. vol. 142, no. 5, pp. 1257-1267, sep. 1998).
- También WO 2008/153813 describe el aislamiento de progenitores derivados de músculo a partir de biopsia de músculo esquelético utilizando la técnica de chapado. La biopsia se almacena primero a 4 °C, después se pican las células y se digieren utilizando una enzima como la colagenasa a 37 °C. Tras lavar la enzima de las células, éstas se cultivan en un matraz durante 30-120 minutos para permitir que las células de adhesión rápida se adhieran a las paredes, mientras que las células de adhesión lenta, es decir, las MDCS, permanecen en suspensión. Estas MDCS se transfirieron a un segundo matraz para un cultivo de 1-3 días. En el Ejemplo 2 se informa del aislamiento de MDCS a partir de músculo esquelético murino que da lugar a una población que comprende esencialmente células miogénicas - 87 % de células CD56" y 89 % de células desmina" - y 6,8 % de fibroblastos (0,3 % de células hematopoyéticas y ninguna célula endotelial). Estas MDC se modificaron genéticamente para expresar BMP-2 y se utilizaron *in vivo* para el tratamiento de defectos óseos. Las MDCS humanas se utilizaron con éxito para aumentar la densidad y el volumen óseos tras la estimulación *in vitro*.
- La desventaja de los procedimientos basados en técnicas de galvanoplastia previa es que la realización de varias etapas de galvanoplastia previa requiere mucho tiempo. Aunque las células fueron pasadas múltiples veces por preplateado, es necesario un nuevo re-plateado para alcanzar la cantidad deseada de células con una pureza efectiva (B. Gharaibeh et al., "Isolation of a slowly adhering cell fraction containing stem cells from murine skeletal muscle by the preplate technique," Nat. Protoc., vol. 3, no. 9, p. 1501, ago. 2008; A. Lu et al., "Isolation of myogenic progenitor populations from Pax7-deficient skeletal muscle based on adhesion characteristics," Gene Ther. vol. 15, no. 15, pp. 1116-1125, May 2008). Por lo tanto, el tiempo prolongado en cultivo y el mayor número de duplicaciones celulares del mioblasto durante la pre y la reimplantación pueden provocar senescencia acompañada de detención del crecimiento e incluso la imposibilidad de alcanzar la cantidad deseada de células para la transferencia de mioblastos (W. E. Wright y J. W. Shay, "Historical claims and current interpretations of replicative aging", Nat. Biotechnol, vol. 20, nº 7, pp. 682-688, jul. 2002). Además, la falta de sensibilidad del pre-plateado podría dar lugar a una disminución general del número de mioblastos aunque se consiguiera una mayor pureza (B. C. Syverud, J. D. Lee, K. W. VanDusen y L. M. Larkin, "Isolation and Purification of Satellite Cells for Skeletal Muscle Tissue Engineering", J. Regen. Med., vol. 3, no. 2, 2014).
- Otros procedimientos para aislar mioblastos, como la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) o la clasificación celular activada magnéticamente (MACS) parecían prometedores, pero debido al posible daño de las células al aplicar intensidades de láser de alto voltaje en FACS, así como a las preocupaciones sobre la retención de anticuerpos magnéticos utilizando MACS, estos procedimientos no son una opción superior para el aislamiento de mioblastos.
- En vista de estos inconvenientes de los procedimientos del arte previo, se necesitan nuevos procedimientos para el suministro de células derivadas de músculo esquelético (SMDC).

Este objeto se resuelve mediante la materia definida en las reivindicaciones.

Las siguientes figuras forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede comprenderse mejor haciendo referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

- 5 La Figura 1 muestra una imagen microscópica de contraste de fases (aumento 100x) de SMDC adherida a un matraz de cultivo celular estándar.

La Figura 2 es un análisis FACS que muestra la pureza y viabilidad de SMDC. El histograma A es un análisis de CD56, y demuestra que el 99,3 % de las células son positivas para CD56. El histograma B muestra el análisis de viabilidad del 7AAD, y demuestra que el 98,77 % de las células son viables.

- 10 La Figura 3 muestra una imagen microscópica con un aumento de 100x de la pureza de SMDC demostrada por inmunotinción para el marcador miogénico desmina. Las células positivas aparecen con una tinción más oscura, mientras que las negativas no se tiñen.

La Figura 4 muestra una imagen microscópica de SMDC inducidas a diferenciarse a miotubos multinucleados. Los miotubos expresan la proteína desmina miogénica, como muestra la tinción oscura.

- 15 La Figura 5 muestra un análisis FACS de la tinción A2B5 de SMDC. La tinción de control del isotipo se muestra en el histograma A, comparada con la tinción del anticuerpo A2B5, que se muestra en el histograma B. El histograma B demuestra que el 96 % de las células son positivas para A2B5.

- 20 La Figura 6 muestra la expresión génica de las enzimas sintetizadoras del antígeno reactivo A2B5. Las lecturas medias por anotación génica de ST3GAL1, ST3GAL2 y ST3GAL3 sugieren una mayor expresión de estos ARNm en las SMDC obtenidos mediante la presente invención (ST3GAL1: 17,72 ST3GAL2 20,91 ST3GAL3 205,89) en comparación con la SMDC disponible en el mercado (ST3GAL1: 5,97 ST3GAL2 9,59 ST3GAL3 97,81).

- 25 La figura 7 muestra la comparación del % de células CD56 positivas en células obtenidas mediante el ejemplo 1, que significa con etapa de enfriamiento, o el ejemplo 9, que significa sin etapa de enfriamiento. Se demuestra que las células obtenidas mediante el ejemplo 1 contienen un % significativamente mayor ( $p < 0,05$  en una prueba t de student; \*) de células CD56 positivas (media $\pm$ SD: 93,28 $\pm$ 8,37) en comparación con las células obtenidas mediante el ejemplo 9 (media $\pm$ SD: 77,11  $\pm$  8,37 Datos presentados como media $\pm$ SD de células derivadas de biopsias musculares de tres donantes humanos individuales divididos por la mitad para realizar los procedimientos según el ejemplo 1 y 9 en células de los mismos donantes).

- 30 La Figura 8 muestra un análisis FACS que demuestra la expresión del marcador mesenquimal CD105 en SMDC. El histograma B es un análisis de CD105, y demuestra que el 98,69 % de las SMDC son positivos para CD105. El histograma A muestra el ajuste preciso del umbral de positividad al demostrar la positividad del control del isotipo en sólo el 0,31 % de las SMDC.

- 35 La figura 9 muestra la capacidad de regeneración neuromuscular de SMDC según la presente invención mediante la comparación de la actividad AChE (mU<sub>rel</sub> por g de proteína) entre SMDC CD56+ (que comprende aproximadamente el 100 % de células que expresan CD56) y SMDC CD56- (que comprende aproximadamente el 30 % de células CD56 positivas). La medición de la actividad AChE se realizó como se describe en el Ejemplo 11. CD56+ SMDC presentan significativamente ( $p < 0,05$  en la prueba t de Student; \*) una mayor actividad de AChE en comparación con CD56-SMDC. Datos presentados como media $\pm$ SEM de células derivadas de biopsias musculares de tres donantes humanos individuales.

- 40 La Figura 10 muestra la capacidad regenerativa neuromuscular de SMDC según la presente invención comparando la competencia de fusión ( % índice de fusión) entre SMDC CD56+ (que comprende aproximadamente el 100 % de células que expresan CD56) y SMDC CD56- (que comprende aproximadamente el 30 % de células CD56 positivas). La cuantificación de la competencia de fusión se realizó como se describe en el Ejemplo 12. Las SMDC CD56+ presentan un % de índice de fusión significativamente mayor ( $p < 0,05$  en una prueba t de Student; \*) que las SMDC CD56-. Datos presentados como media $\pm$ SEM de células derivadas de biopsias musculares de tres donantes humanos individuales.

- 45 El uso de la palabra "un" o "uno, una" cuando se utiliza en conjunción con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria puede significar "uno(a)", pero también es compatible con el significado de "uno(a) o más" "al menos uno(a)", y "uno(a) o más de uno(a)".

- 50 El término "aproximadamente" significa que se contempla el valor declarado, más o menos el 5 % del valor declarado, o el error estándar para mediciones del valor dado.

El término "incontinencia anal", tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier pérdida no deseada de contenido intestinal a través del ano, como flatos, heces líquidas o sólidas. El término comprende los tres grados de severidad: Grado 1 = sólo gaseoso, grado 2 = heces líquidas y blandas, grado 3 = heces sólidas y formadas.

El término "esfínter anal" o "aparato del esfínter anal", tal como se utiliza aquí, se refiere en particular al *Musculus sphincter ani externus* y al *Musculus puborectalis* como parte del *Musculus levator ani*. Sin embargo, también incluye *M. pubococcygeus*, *M. ischiococcygeus*, *M. iliococcygeus* y *N. pudendus*.

- 5 El término "célula derivada de músculo esquelético" o "SMDC" se refiere a células multinucleadas competentes para la fusión como, por ejemplo, mioblastos, que pueden ser células primarias y/o células cultivadas in vitro y, alternativamente, a otras células con potencial miogénico (por ejemplo, de tejido liposucionado u otros tejidos que albergan células madre, como la médula ósea). El término también comprende las células derivadas del tejido adiposo que pueden aislarse y utilizarse para el cultivo de células musculares esqueléticas. El término "célula derivada del músculo esquelético" o "SMDC" también se refiere a una población celular aislada del tejido muscular. Generalmente, 10 dicha población celular comprende otras células que no tienen potencial miogénico. Dichas células se denominan en el presente documento "células no miógenas" o "células no miógenas derivadas del músculo esquelético" y son preferentemente CD56 negativas y/o desmina negativas. Así, el término "célula derivada de músculo esquelético" o "SMDC", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere preferentemente a una población celular que comprende al menos 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 o 100 % de células multinucleadas competentes para la fusión.
- 15 El término "penetración", tal como se utiliza aquí, se refiere a un proceso de introducción de un dispositivo de inyección, por ejemplo una aguja, en un tejido corporal sin afectar todavía al proceso de inyección.

- El término "inyección", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la expulsión de una solución de inyección que comprende las células mencionadas anteriormente fuera de un dispositivo de inyección en un sitio específico dentro del cuerpo humano, en particular en o adyacente al tejido muscular que proporciona la continencia anal. El proceso de inyección puede ser, entre otros, estático, es decir, el dispositivo de inyección permanece en la posición alcanzada. Alternativamente, el proceso de inyección es dinámico. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente invención, la inyección se produce simultáneamente con la retracción del dispositivo de inyección del lugar de la inyección.
- 20

- El término "sitio de inyección", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un sitio del cuerpo humano, como por ejemplo cerca del tejido muscular que proporciona la continencia anal, en el que se inicia el proceso de inyección. El lugar de la inyección no tiene por qué ser idéntico al lugar donde termina el proceso de inyección.
- 25

- El término "dispositivo de inyección", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier dispositivo adecuado para penetrar en el tejido humano con el fin de alcanzar un sitio de inyección de interés y capaz de suministrar soluciones, en particular soluciones que comprenden células derivadas de músculo al sitio de inyección de interés.
- 30

El término "incontinencia fecal", tal como se utiliza aquí, se refiere únicamente a la pérdida no deseada de heces líquidas o formadas a través del ano.

- El término "incontinencia pasiva", tal como se utiliza aquí, se refiere a la falta de reconocimiento sensorial de la pérdida de heces. Esto incluye valores bajos de presión anal en la línea de base y una capacidad sensorial deficiente de la mucosa anal y rectal.
- 35

"Defecación imperiosa" o "urgencia imperiosa", tal como se utiliza aquí, se refiere a la falta de capacidad de una persona para retrasar la defecación durante más de cinco minutos. Un paciente así tiene que ir al baño inmediatamente.

- El término "CD56+" o "CD56 positivo" utilizado en el presente documento se refiere a una célula que expresa el marcador celular CD56. Los términos "CD56+" o "CD56 positivo" también pueden utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferentemente al menos el 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 o 99 por ciento de la población celular expresa el marcador celular CD56.
- 40

- El término "CD56-" o "CD56 negativo" utilizado en el presente documento se refiere a una célula que no expresa el marcador celular CD56. Los términos "CD56-" o "CD56 negativo" también pueden utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferentemente como máximo el 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 por ciento de la población celular expresa el marcador celular CD56.
- 45

- El término "A2B5+" o "A2B5 positivo" utilizado en el presente documento se refiere a una célula que expresa el marcador celular A2B5. Los términos "A2B5+" o "A2B5 positivo" también pueden utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferentemente al menos el 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 o 99 por ciento de la población celular expresa el marcador celular A2B5.
- 50

El término "A2B5-" o "A2B5 negativo" utilizado en el presente documento se refiere a una célula que no expresa el marcador celular A2B5. Los términos "A2B5-" o "A2B5 negativo" también pueden utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferentemente como máximo el 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 por ciento de la población celular expresa el marcador celular A2B5.

El término "desmina positiva", tal como se utiliza aquí, se refiere a una célula que expresa el marcador celular desmina. El término "desmina positiva" también puede utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferentemente al menos el 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 o 99 por ciento de la población celular expresa el marcador celular desmina.

5 El término "desmina negativa", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una célula que no expresa el marcador celular desmina. El término "desmina negativa" también puede utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferentemente como máximo el 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 por ciento de la población celular expresa el marcador celular desmina.

10 El término "CD105+" o "CD105 positivo" utilizado en el presente documento se refiere a una célula que expresa el marcador celular CD105. Los términos "CD105+" o "CD105 positivo" también pueden utilizarse para una población celular que comprenda diferentes tipos celulares, si preferentemente al menos el 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 o 99 por ciento de la población celular expresa el marcador celular CD 105.

15 El término "CD105-" o "CD105 negativo" utilizado en el presente documento se refiere a una célula que no expresa el marcador celular CD105. Los términos "CD105-" o "CD105 negativo" también pueden utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferentemente como máximo el 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 por ciento de la población celular expresa el marcador celular CD105.

20 El término "medios de diferenciación", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a medios de cultivo celular que inducen la fusión en células multinucleadas competentes para la fusión o células miogénicas como, por ejemplo, mioblastos. Sin embargo, dicho término se refiere también al medio de cultivo celular que no comprende ninguna sustancia necesaria para la inducción de la fusión, en caso de que las células multinucleadas competentes para la fusión o las células miogénicas sean capaces de fusionarse sin una inducción respectiva.

El término "medio de crecimiento celular", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier medio adecuado para la incubación de células de mamífero, como SMDC, que permita la fijación de dichas células de mamífero en la superficie de un recipiente de incubación.

25 La presente invención se refiere al objeto definido en las reivindicaciones.

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan procedimientos para obtener células derivadas de músculo esquelético (SMDC).

30 Un primer objeto de la presente invención se dirige a un procedimiento para obtener células derivadas de músculo esquelético (SMDC) como se define en la reivindicación 1. El proceso comprende las etapas de: (a) enfriamiento de una muestra obtenida a partir de tejido muscular esquelético en un tampón; b) procesamiento de la muestra y enfriamiento de la muestra procesada, en el que el enfriamiento se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 1 y 16 °C durante un tiempo comprendido entre 2 y 48 horas; (c) resuspender la muestra de la etapa (b) en medio con suero que comprenda al menos una enzima y calentar hasta 25-38 °C durante 1 a 20 horas; peletizar la muestra y (d) resuspender el pellet de la muestra de la etapa (c) para proporcionar una suspensión unicelular a partir de la muestra de la etapa (c), obteniendo así SMDC.

35 Los inventores encontraron que la realización del procedimiento de la presente invención permite ventajosamente la obtención y enriquecimiento de SMDC, exhibiendo alta capacidad miogénica, sin la necesidad de realizar etapas de pre-plateado. Estos SMDC enriquecidos son altamente puros para marcadores miogénicos como CD56 y desmina, lo que indica un mayor potencial miogénico evaluado, por ejemplo, mediante un ensayo de potencia adecuado. Además, el enriquecimiento de la SMDC antes de la siembra inicial es ventajoso, ya que las células tienen que someterse a menos subcultivo, lo que conduce a una menor cantidad de células senescentes y a una alta viabilidad gracias a la presente invención. Además, la presente invención genera células que no sólo expresan marcadores miogénicos como CD56 y desmina, sino también marcadores de células precursoras neuronales como A2B5, lo que sugiere también un potencial para el soporte neuro-muscular. De hecho, las SMDC obtenidas por la presente invención se diferencian de las células del estado de la técnica en su expresión génica de las enzimas sintetizadoras de antígenos reactivos A2B5 ST3GAL1 ST3GAL2 y ST3GAL3, necesarias para el soporte neuromuscular de los antígenos reactivos A2B5. Resumiendo, las SMDC enriquecidas obtenidas por la presente invención demuestran una alta pureza y viabilidad, por lo que se sugiere que tienen una alta eficacia clínica en el apoyo a la conexión neuro-muscular, así como en la regeneración de la debilidad muscular, especialmente en condiciones como la incontinencia urinaria y/o fecal.

50 En una realización preferida de la presente invención, la etapa (a) comprende la realización de una biopsia muscular.

Dicha biopsia muscular que sirve como fuente de células derivadas del músculo puede obtenerse del músculo en el lugar de la lesión o de otra zona que pueda ser más fácilmente accesible para el cirujano clínico. El lugar de la biopsia no se limita a un músculo esquelético concreto y puede ser, por ejemplo, la parte superior del brazo. El tamaño de la biopsia puede comprender aproximadamente 1 cm × 1 cm × 1 cm o más.

55 Para utilizar mioblastos en el tratamiento de lesiones musculares, por ejemplo para el tratamiento de la incontinencia, dichos mioblastos se aíslan preferentemente a partir de una biopsia de músculo esquelético del sujeto a tratar.

En otra realización preferida, la etapa (a) se lleva a cabo a una temperatura inferior a 16°C, preferentemente en un intervalo de temperatura de 1 a 16°C, preferentemente de 4 a 10°C, en particular preferido a 7°C; y durante un tiempo en el intervalo de hasta 96 horas.

5 En consecuencia, se prefiere que el procedimiento de la presente invención se lleve a cabo en la etapa (a) a un intervalo de temperatura de 1 a 16°C o a cualquier temperatura entre este intervalo, como a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15°C, o cualquier temperatura intermedia dentro de este intervalo. En otra realización preferida de la presente invención, el intervalo de temperatura es de 6 a 8°C. En otra realización preferida, el intervalo de temperatura es inferior a 4°C, preferentemente entre 1 y 3°C.

10 Además, se prefiere que el procedimiento de la presente invención en la etapa (a) se lleve a cabo en un tiempo en el intervalo de hasta 96 horas, o cualquier tiempo dentro de este intervalo, tal como 12 a 96 horas, 12 a 72 horas, 12 a 48 horas, 24 a 96 horas, 24 a 72 horas, 24 a 48 horas, o cualquier otro intervalo intermedio.

Preferentemente, la etapa (b) comprende el uso de tijeras, bisturí, pinzas, filtro o molino de bolas y una centrifugadora. Sin embargo, es evidente para un experto en la materia que cualquier otro medio que permita picar o desmenuzar el tejido muscular esquelético está comprendido y de acuerdo con la presente invención.

15 El enfriamiento de la etapa (b) se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 1 y 16°C o a cualquier temperatura intermedia, como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15°C, o cualquier temperatura intermedia dentro de este intervalo. En otra realización preferida de la presente invención, la etapa (b) se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 4 y 8°C, en particular 4°C. En otra realización preferida, el intervalo de temperatura es inferior a 4°C, preferentemente en el intervalo de 1 a 3°C.

20 La etapa (b) de la presente invención se lleva a cabo durante un intervalo de tiempo distinto, concretamente en el intervalo de 2 a 48 horas, o cualquier tiempo dentro de este intervalo, como de 2 a 36 horas, de 2 a 24 horas, o cualquier otro intervalo intermedio.

25 En consecuencia, se prevé que la etapa (b) del procedimiento de la presente invención se lleve a cabo mediante el procesamiento del tejido muscular esquelético y el enfriamiento durante el periodo de tiempo distinto del tejido muscular esquelético procesado. El enfriamiento de la muestra se lleva a cabo después de la etapa de procesamiento. Los inventores descubrieron que el enfriamiento de la muestra procesada es ventajoso, ya que esto conduce a una disminución crucial de las células no miogénicas, como los fibroblastos, que se consigue ya que las células no miogénicas, como los fibroblastos, son sensibles a la temperatura, debido a una mayor actividad metabólica que las células miogénicas quiescentes. Debido a esta característica, las células no miogénicas, como los fibroblastos, mueren en condiciones de bajas temperaturas. Como consecuencia de esto, el enfriamiento en la etapa (b) del procedimiento de la presente invención proporciona un enriquecimiento de células miogénicas. Este enriquecimiento se consigue sin necesidad de realizar ninguna etapa previo a la galvanoplastia. Por lo tanto, el procedimiento de la presente invención proporciona un buen enriquecimiento y purificación de células miogénicas sin la necesidad de llevar a cabo etapas que consumen tiempo y dinero.

35 La importancia de la etapa de enfriamiento se demuestra en particular mediante los datos comparativos que se muestran en los ejemplos siguientes. Allí se muestra que la cantidad de células CD56 positivas es significativamente elevada. Las células CD56 positivas representan un marcador que demuestra la pureza de las SMDC obtenidas. Por lo tanto, el procedimiento de la presente invención representa un procedimiento que permite obtener SMDCs en mayor cantidad así como de mayor calidad en comparación con los procedimientos de la técnica anterior que no realizan una etapa de enfriamiento como se prevé en el procedimiento de la presente invención.

40 CD56 también conocida como molécula de adhesión celular neural (NCAM) es un marcador de compromiso miogénico expresado en mioblastos de músculo esquelético in vitro (Belles-Isles et al., 1993) y tejido muscular liso in vivo (Romanska et al., 1996). CD56 está presente en SMDC desmina+ competentes para la fusión. En particular, se ha demostrado que CD56 marca una población de SMDC que es capaz de formar miotubos multinucleados y expresar una mayor actividad enzimática de acetilcolinesterasa (AChE) que las SMDC CD56 negativas (Thurner et al., 2018). La alta actividad AChE de SMDC utilizada para tratar a pacientes con incontinencia fecal, de hecho, se ha relacionado con un alto éxito del tratamiento en términos de reducción de los síntomas de incontinencia fecal (Thurner et al., 2018). Por lo tanto, las SMDC altamente puras para CD56 y, por lo tanto, con alta actividad AChE son deseables para el tratamiento exitoso de pacientes con neuromiopatías y/o miopatías como la incontinencia fecal. La presente invención proporciona un procedimiento para aislar SMDC altamente puros para CD56 y con alta actividad AChE.

45 Preferentemente, se prevé que la etapa (c) comprenda llevar a cabo el tratamiento enzimático con una solución que comprenda una o más seleccionadas del grupo que consiste en tripsina, papaína, elastasa, hialuronidasa, colagenasa, desoxirribonucleasa y ADNasa. En una realización preferida, la etapa (c) prevé el uso de colagenasa.

50 De acuerdo con la presente invención, se prevé preferentemente que la resuspensión en la etapa (c) comprenda la centrifugación de la muestra de la etapa (b), descartando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento celular en un medio con suero que comprenda al menos una enzima. Además, en una realización preferida de la presente invención también se prefiere que se lleven a cabo una o más etapas de lavado con las células en la etapa (c), incluyendo el sometimiento a vórtex de las células en una solución adecuada, tal como un tampón. Según la invención,

la muestra resuspendida de la etapa (b) en el medio con suero que comprende al menos una enzima se centrifuga después del tiempo de incubación para granular las células de la muestra y desechar el sobrenadante que contiene enzima.

En una realización preferida particular de la invención la enzima en la etapa (c) es tripsina.

- 5 En otra realización preferida de la presente invención, la etapa (c) se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 25 y 38°C, preferentemente entre 36 y 38°C, en particular preferentemente a 37°C.

Preferentemente, la etapa (d) comprende preferentemente un procedimiento seleccionado de al menos uno de los siguientes: clasificación FACS, centrifugación, clasificación electrocinética, clasificación por acustoforesis, clasificación celular basada en microesferas y clasificación óptica.

- 10 Procedimientos para obtener una suspensión de células individuales son bien conocidos en la técnica. Un ejemplo de procedimiento de enriquecimiento adecuado es la clasificación celular activada magnéticamente (MACS®). El procedimiento MACS permite separar las células incubándolas con partículas (http://en.wikipedia.org/wiki/Magnetic\_nanoparticles) recubiertas de anticuerpos contra un antígeno de superficie determinado. Posteriormente, las células incubadas se transfieren a una columna colocada en un campo magnético.

- 15 En esta etapa, las células que expresan el antígeno y, por tanto, se adhieren a las nanopartículas permanecen en la columna, mientras que otras células que no expresan el antígeno fluyen a través de la columna. Mediante este procedimiento, las células pueden separarse positiva y/o negativamente con respecto al antígeno o antígenos particulares. Otro ejemplo de procedimiento de enriquecimiento adecuado es la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS®), como se describe, por ejemplo, en Webster et al. (Exp Cell Res. 1988 Jan; 174(1):252-65).

- 20 En otra realización preferida de la presente invención, se lleva a cabo otra etapa opcional (e) después de la etapa (d) que incluye la incubación de la suspensión unicelular obtenida en la etapa (d), en la que la incubación en la etapa (e) se lleva a cabo preferentemente a una temperatura comprendida entre 25 y 38°C, preferentemente entre 36 y 38°C, en particular preferentemente a 37°C, obteniéndose así SMDC adherentes.

- 25 Esta etapa adicional de incubación opcional permite dejar crecer las células para conseguir una mayor cantidad de SMDC. Un experto en la materia ajustará en consecuencia las condiciones de cultivo, como el medio y la temperatura, para obtener una cantidad máxima de SMDC.

De manera aún más preferida, se prevé que después de la etapa (e) se realice opcionalmente otra etapa (f) que comprende el descarte de las células no adherentes de la etapa (e), en la que la etapa (f) se realiza preferentemente después de al menos 6 horas a 4 días.

- 30 Según la presente invención, esta etapa opcional permite preferentemente que las células no miogénicas o las células que flotan en el recipiente de cultivo, como las células muertas, sean descartadas. De este modo se enriquecen aún más las células adherentes deseadas. Un experto en la materia realizará la etapa opcional (f) en un momento adecuado dentro del intervalo preferido de 6 horas a 3 días, dependiendo de la necesidad real de realizar dicha etapa. Si tal etapa opcional (f) es realmente necesaria, puede definirse por ejemplo con la observación de las células bajo un microscopio y determinar la cantidad de células no adherentes en el cultivo celular.

En una realización preferida adicional de la presente invención, después de la etapa (f) se realiza opcionalmente una etapa adicional (g) de propagación de las células adherentes de la etapa (e), la propagación en la etapa (h) comprende el cultivo de las células adherentes durante 1 a 5 pasajes hasta 70 a 80 % de confluencia.

- 40 De acuerdo con la presente invención, un experto en la materia es capaz de determinar la duración y la cantidad de pasadas necesarias para lograr la confluencia deseada del 70 al 80 %.

Una segunda materia de la presente invención está dirigida a una población celular de SMDC como se define en la reivindicación 9.

Al menos el 90 %, 95 % o 98 % o cualquier intervalo intermedio entre los valores mencionados de las SMDC son CD105 positivas, lo que significa que las SMDC expresan CD105 en su superficie celular.

- 45 CD105 también se conoce como Endoglin. Es una proteína homodímera de membrana integral de tipo I con subunidades de 90 kD que se encuentra en las células endoteliales vasculares y en los sincitiotrofoblastos de la placenta. CD105 se expresa débilmente en los fibroblastos estromales. También se expresa en monocitos activados y macrófagos tisulares. La expresión de CD105 aumenta en el endotelio activado en los tejidos que sufren angiogénesis, como en los tumores, o en casos de cicatrización de heridas o inflamación dérmica. CD105 es un componente del sistema receptor de TGF-β en las células endoteliales de la vena umbilical humana y se une a TGF-β1 y β3 con gran afinidad, pero no se une a TGF-β2. Se ha demostrado que los receptores TGF-β son necesarios para la diferenciación del músculo esquelético. De hecho, se demostró que el receptor TGF-β es necesario para el aumento de la miogenina, un factor de diferenciación del músculo esquelético, y la competencia de fusión de los mioblastos. Por lo tanto, las células CD105 positivas pueden ser preferibles para SMDC y SMDC obtenidas por los procedimientos divulgados en la presente invención.

Al menos el 90 %, 95 % o 98 % o cualquier intervalo intermedio entre los valores mencionados de las SMDC son desmina positivos, lo que significa que las SMDC expresan desmina en su superficie celular.

En otra realización preferida de la invención, las SMDC son Pax7 positivos, lo que significa que las SMDC expresan Pax7 en su superficie celular.

- 5 En otra realización preferida de la invención, las SMDC son Myf5 positivos, lo que significa que las SMDC expresan Myf5 en su superficie celular.

Los antígenos reactivos A2B5 pertenecen a la familia de los gangliósidos de la serie c, una familia de glicolípidos que son más abundantes en el sistema nervioso, donde presentan funciones como la adhesión y el reconocimiento célula-célula, así como la transducción de señales. La pérdida de gangliósidos provoca graves defectos neurológicos, como defectos regenerativos de las motoneuronas en ratones deficientes en gangliósidos de la serie c (R. K. Yu, Y.-T. Tsai, T. Ariga, y M. Yanagisawa, "Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides-An overview," J. Oleo Sci., vol. 60, nº 10, pp. 537-544, 2011). También en la unión neuro-muscular (NMJ) se encontró una gran cantidad de gangliósidos. El tratamiento de la NMJ con anticuerpos antigangliósidos provocó un grave defecto en la NMJ, apoyando así la idea de que los gangliósidos son necesarios en la NMJ (J. J. Plomp y H. J. Willison, "Pathophysiological actions of neuropathy-related anti-ganglioside antibodies at the neuromuscular junction," J. Physiol, vol. 587, no. Pt 16, pp. 3979-3999, ago. 2009). Además, los gangliósidos marcan especialmente las células madre, consideradas con potencial regenerativo (R. K. Yu, Y.-T. Tsai, T. Ariga, y M. Yanagisawa, "Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides-An overview," J. Oleo Sci., vol. 60, nº 10, pp. 537-544, 2011). Los gangliósidos reactivos A2B5 son sintetizados por sialiltransferasas. Entre ellos, los de mayor actividad aceptora de glicoesfingolípidos *in vitro* y altamente expresados en el cerebro son ST3GAL1 y ST3GAL2 (E. R. Sturgill et al., "Biosynthesis of the major brain gangliosides GD1a and GT1b," Glycobiology, vol. 22, no. 10, pp. 1289-1301, Oct. 2012). El ARNm tanto de ST3GAL1 como de ST3GAL2 se expresa en la SMDC obtenida por la presente invención y se expresa en mayor cantidad en comparación con la SMDC disponible comercialmente. En conjunto, las SMDC con capacidad regenerativa miogénica que también expresan antígenos reactivos A2B5 podrían no sólo regenerar el músculo esquelético, sino también proporcionar apoyo neuromuscular, especialmente en la unión neuromuscular recién formada durante la regeneración muscular.

Las SMDC, que pueden utilizarse para el tratamiento de una disfunción muscular, en particular para el tratamiento de la incontinencia, como la incontinencia urinaria y/o anal, presentan preferentemente un patrón de expresión característico. Más del 90 %, 95 % o 98 % de dichos SMDC expresan CD56 y A2B5. Dichos SMDC no expresan CD34, Sca-1 y MyoD. Por lo tanto, el término "no expresan" significa que menos del 10 %, 5 % o 2 % de las SMDC expresan dichos marcadores. El patrón de expresión de la SMDC descrito anteriormente puede utilizarse para determinar el índice de miogenicidad del cultivo celular sin necesidad de diferenciación. Así, dicho patrón de expresión de la SMDC puede servir para verificar si las células derivadas del músculo esquelético pueden utilizarse para el tratamiento de una disfunción muscular, en particular para el tratamiento de la incontinencia, como la incontinencia urinaria y/o anal.

El SMDC puede obtenerse según un procedimiento de la presente invención.

35 De acuerdo con la presente invención, las SMDC obtenidas con el procedimiento de la presente invención pueden distinguirse claramente de las células de la técnica anterior en vista de la expresión distinta del marcador A2B5 y/o de las enzimas sintetizadoras de antígeno reactivo del marcador A2B5. Dado que los gangliósidos reactivos A2B5 son sintetizados por sialiltransferasas, estas sialiltransferasas pueden servir como marcador indirecto de la expresión de A2B5. Entre las tres sialiltransferasas importantes ST3GAL1, ST3GAL2 y ST3GAL3, las que tienen mayor actividad aceptora de glicoesfingolípidos *in vitro* y se expresan con mayor intensidad en el cerebro son ST3GAL1 y ST3GAL2 (E. R. Sturgill et al., "Biosynthesis of the major brain gangliosides GD1a and GT1b," Glycobiology, vol. 22, nº 10, pp. 1289-1301, oct. 2012). La detección de la expresión de ST3GAL1 y ST3GAL2 permite probar indirectamente la expresión de A2B5. Por lo tanto, el nuevo procedimiento de la presente invención permite obtener SMDC que son diferentes en comparación con las SMDC obtenidas con procedimientos conocidos en la técnica.

45 Divulgadas en el presente documento y que no forman parte de la invención son también SMDC que no están comprendidas en el enunciado de las reivindicaciones y que se caracterizan por la expresión de marcadores distintos. Las SMDC se caracterizan por la expresión positiva de uno, dos, tres, cuatro o cinco de los marcadores CD56, A2B5, CD105, desmina, Myf5 y Pax7. Dichas SMDC se caracterizan por la expresión de distintas combinaciones de marcadores seleccionadas entre la expresión positiva de al menos uno o más de los marcadores seleccionados entre CD56, A2B5, CD105, Myf5 y Pax7, y la expresión negativa de al menos uno o más marcadores seleccionados entre CD34 y MyoD. Preferentemente, al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % o cualquier intervalo intermedio entre los valores mencionados de las SMDC son positivos para uno o más de CD56, A2B5, CD105, Myf5 y Pax7, lo que significa que las SMDC expresan CD56, A2B5, CD105, Myf5 y/o Pax7 en su superficie celular. Además, se prefiere que como máximo el 59 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o 0 % de la población celular exprese uno de los CD34 y/o MyoD.

Las SMDC divulgadas que no forman parte de la invención se caracterizan preferentemente por la expresión positiva de CD56, A2B5, CD105, Myf5, Pax7, y la expresión negativa de CD34 y MyoD.

Otra materia de la presente invención se dirige a una población celular de SDMCs según las reivindicaciones 9 o 9 utilizada como composición farmacéutica.

De acuerdo con la presente invención, la SMDC obtenida según un procedimiento de la presente invención puede utilizarse como ingrediente activo dentro de una composición farmacéutica.

- 5 Otra materia de la presente invención está dirigida a SMDC obtenidas según un procedimiento de la presente invención para su uso en un procedimiento de mejora de la conexión neuro-muscular.

Preferentemente, las SMDC según la presente invención son para uso en un procedimiento de mejora de prevención y/o tratamiento de neuromiopatías y/o miopatías. Preferentemente, las SMDC son para uso en un procedimiento de prevención y/o tratamiento de neuromiopatías y/o miopatías como la incontinencia fecal y/o la incontinencia urinaria.

- 10 De acuerdo con la presente invención, las SMDC pueden utilizarse en un procedimiento que prevé preferentemente que las SMDC se inyecten en un sujeto que sufre de incontinencia. En general, la inyección de SMDC en un determinado tejido o lugar de lesión comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de células en solución o suspensión, preferentemente de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $6 \times 10^6$  células por 100  $\mu$ l de solución de inyección. La solución de inyección es un medio fisiológicamente aceptable, con o sin suero autólogo. El medio  
15 fisiológico aceptable puede ser, a modo de ejemplo no limitativo, una solución salina fisiológica o una solución amortiguadora de fosfatos.

Finalmente, otro objeto de la presente invención se dirige a SMDC obtenidos según un procedimiento de la presente invención para su uso en un procedimiento de tratamiento de una disfunción muscular, en el que la disfunción muscular es incontinencia, en particular una incontinencia urinaria y/o anal.

- 20 En principio, se puede tratar cualquier tipo de incontinencia anal, ya que el fortalecimiento de los sistemas musculares anales proporciona un mejor control del llenado rectal. Sin embargo, se trata la incontinencia anal que resulta de la rotura perineal, especialmente si el sistema del esfínter anal y/o si el M. puborectalis está dañado y lesionado. Dicha rotura perineal puede deberse a una amplia variedad de causas, tal y como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, la causa de dicha rotura perineal no es limitante para la aplicación de los procedimientos y SMDC de la presente  
25 invención. Los pacientes pueden ser tratados con los procedimientos y SMDC de la presente invención si sufren una rotura perineal de tercer o cuarto grado. Esto se aplica en particular a las mujeres que sufren dicha rotura perineal tras un parto con fórceps, dan a luz por primera vez, dan a luz a un niño de más de 4 kg de peso o sufren una secuela debida a anomalías de posición del niño antes del nacimiento. Los procedimientos y SMDC de la presente invención también pueden aplicarse después de una lesión del sistema del esfínter anal y/o M. puborectalis debida a procedimientos quirúrgicos. Además, los procedimientos y SMDC de la presente invención también pueden aplicarse si sólo hay incontinencia transitoria. Este tratamiento previene el desarrollo de una incontinencia anal completa. Otros estados patológicos de incontinencia anal que pueden tratarse con los procedimientos y SMDC de la presente invención son la incontinencia pasiva, la incontinencia fecal y la defecación imperativa.

- 30 Debe entenderse que los procedimientos y SMDC según la presente invención no sólo pueden utilizarse para tratar a pacientes que ya padecen incontinencia anal, es decir, que muestran síntomas de incontinencia anal, sino que pueden aplicarse a sujetos que aún no padecen incontinencia anal, pero con riesgo aumentado de padecerla, por ejemplo, en casos en los que la musculatura rectal sufrió daños por cirugía, nacimiento, accidentes, etcétera. Otro ejemplo serían los casos en los que la musculatura rectal se adelgazó más que en un individuo sano o en los que degeneró por otros motivos. Los procedimientos de la presente invención pueden proporcionar una profilaxis adecuada para prevenir la  
40 aparición de la incontinencia anal.

Las SMDC para uso en el tratamiento o profilaxis de la incontinencia son preferentemente homólogas al receptor.

- En una realización más preferida, dichas SMDC son autólogas o heterólogas del receptor. Dicha SMDC puede obtenerse, por ejemplo, mediante una biopsia del bíceps del receptor. Las SMDC autólogas reducen o minimizan el riesgo de reacciones alérgicas una vez inyectados en el receptor. Preferentemente, las SMDC son células  
45 multinucleadas competentes para la fusión o células miogénicas como los mioblastos. Más preferentemente, dichas SMDC son células humanas.

- Por lo tanto, la presente invención también proporciona un enfoque de profilaxis simple o procedimiento de tratamiento para mujeres y hombres con incontinencia urinaria y/o anal o en riesgo de desarrollar incontinencia urinaria y/o anal mediante el uso de células autólogas derivadas de músculo esquelético para mejorar sus esfínteres urinarios y/o  
50 anales. Esta terapia celular derivada del músculo permite reparar y mejorar el esfínter urinario y anal dañado. De acuerdo con la presente invención, el tratamiento comprende una aspiración con aguja para obtener células derivadas del músculo, por ejemplo, y un breve tratamiento de seguimiento para inyectar células cultivadas y preparadas en el paciente. También según la presente invención, las células autólogas derivadas del músculo esquelético (SMDC) recogidas y cultivadas para un paciente específico con incontinencia urinaria y/o anal pueden emplearse como agente no alérgico para aumentar el volumen de la pared urinaria y/o rectal, mejorando así la coaptación y el músculo del  
55 esfínter urinario y/o anal. En este aspecto de la invención, se realiza un simple trasplante autólogo de células musculares, como se ha comentado anteriormente.

De acuerdo con la presente invención, las células autólogas derivadas de músculo esquelético administradas directamente en el esfínter urinario y/o esfínter anal, muestran una supervivencia a largo plazo. Así pues, la inyección autóloga de mioblastos da lugar a una supervivencia segura y no inmunógena a largo plazo de las miofibras en el esfínter urinario y/o anal.

- 5 En una realización particular según la invención, se inyectan en el esfínter urinario entre 50 y 200  $\mu$ l de una suspensión celular derivada de músculo esquelético (con una concentración de entre  $1 \times 10^5$  y  $6 \times 10^6$  células por 100  $\mu$ l de solución de inyección). El dispositivo de inyección puede conectarse a un recipiente que contenga la suspensión celular que se va a inyectar. Para el tratamiento de la incontinencia anal se inyectan preferentemente entre 50  $\mu$ l y 1 ml, más preferentemente 0,5 ml, de una suspensión de células derivadas de músculo esquelético (con una concentración de entre  $1 \times 10^5$  y  $6 \times 10^6$  células por 100  $\mu$ l) en el esfínter anal externo. El dispositivo de inyección puede conectarse a un recipiente que contenga la suspensión celular que se va a inyectar.

- 10 La etapa de inyección puede comprender varias inyecciones individuales, como por ejemplo de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 inyecciones de suspensión celular derivada de músculo esquelético, en las que en cada inyección se inyectan de aproximadamente 50 a aproximadamente 500  $\mu$ l de una suspensión celular derivada de músculo esquelético y en las que cada inyección se aplica a otra región del esfínter anal. No obstante, estos parámetros han de considerarse meramente ejemplificativos y el artesano experto podrá adaptar fácilmente estos procedimientos a los requisitos de tratamiento de cada paciente individual.

- 15 El movimiento del dispositivo de inyección hacia el esfínter urinario y/o anal puede controlarse mediante sonografía y/o EMG (electromiografía). En una realización particular, se introduce una sonda transrectal y la posición de la sonda transrectal se ajusta de forma óptima para el tratamiento del esfínter urinario y/o anal con los procedimientos según la invención. En otra realización particular, las células derivadas del músculo esquelético se implantan en la zona que rodea el defecto del esfínter urinario y/o anal y/o especialmente en la zona del defecto del esfínter urinario y/o anal. El paciente puede comenzar al día siguiente de la inyección de células con ejercicios físicos para avanzar en el tratamiento de la incontinencia urinaria y/o anal según la invención.

- 20 El tratamiento puede repetirse. El tratamiento puede repetirse, por ejemplo, en el plazo de un año después del último tratamiento, después de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 mes(es) después del último tratamiento o en el plazo de 1 a 8 semanas, preferentemente de 2 a 3 semanas, o de 10 a 20 días después del último tratamiento. En particular, el tratamiento puede repetirse entre 2 y 3 semanas después del último tratamiento con células procedentes del mismo cultivo celular que se utilizó para el tratamiento anterior. Este enfoque permite reducir el volumen de cada inyección y da a las células más tiempo para adaptarse, integrarse y desarrollar el músculo. En una realización aún más específica, las inyecciones se repiten en intervalos de tiempo de 2 a 3 semanas hasta que se consigue una mejora de la continencia urinaria y/o anal.

- 25 Como se ha mencionado anteriormente, una vía de penetración particular es a través de la piel de un paciente en paralelo al curso del recto. Sin embargo, también se contempla que la penetración pueda producirse directamente desde el recto en las proximidades del músculo lesionado. En particular, el proceso de penetración e inyección se supervisa mediante medios de formación de imágenes sonográficas. Además, se contempla una vía de penetración alternativa para las mujeres, es decir, la inyección transvaginal. En este caso, el dispositivo de inyección penetra en la pared de la vagina y se desplaza hacia delante hasta alcanzar el punto de inyección deseado. En particular, el proceso de penetración e inyección se supervisa también en este caso por medios de imagen sonográficos y/o EMG (electromiografía).

- 30 En otra realización, la inyección comprende inyectar las células derivadas del músculo esquelético en forma de "banda de inyección" "Banda de inyección", tal como se utiliza aquí, se refiere a la disposición de las células a lo largo de la longitud, o de una parte de la longitud, de la vía de inyección, es decir, a lo largo del canal creado por la inserción de la aguja en el tejido muscular. En otras palabras, tras la inyección, la aguja se retira mientras que, al mismo tiempo, las células son expulsadas de la jeringa de forma continua o intermitente con la aguja de inyección se mueve, en particular, retraída a lo largo de la pista de inyección. Esta dispensación constante de células proporciona un suministro continuo de la solución de inyección, incluidas las células, a lo largo del canal de inyección que se forma cuando el dispositivo de inyección/aguja penetra en el tejido muscular diana. En una realización particular, la banda o canal de inyección debe tener un diámetro no mayor de aproximadamente 0,8 mm, ya que de lo contrario esto conduciría a la necrosis de las células derivadas del músculo esquelético en el centro del canal de inyección, y en consecuencia, daría lugar a inflamación perjudicial y otros procesos.

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

Eligiendo una aguja de inyección que tenga un diámetro particular, el volumen de inyección por  $\text{mm}^3$  puede ser exactamente predeterminado. El diámetro de la aguja de inyección no suele superar los 5 mm, ya que puede dañar las estructuras musculares.

5 Los medios de formación de imágenes sonográficas para supervisar la posición y la acción del dispositivo de inyección pueden lograrse mediante cualquier dispositivo estándar de formación de imágenes ultrasónicas conocido en la técnica. Además de las sondas ultrasónicas estándar mono o biplanares, también pueden utilizarse nuevas tecnologías ultrasónicas, como, por ejemplo, la sonografía 3D o la sonografía Doppler en color, *etc.* En una realización particular, como se ha indicado anteriormente, el dispositivo de inyección comprende un medio de formación de imágenes sonográficas.

10 Los siguientes ejemplos explican la presente invención pero no se consideran limitativos.

### Ejemplo 1 - Obtención de la SMDC

15 Para obtener SMDC, se tomó una biopsia de músculo esquelético de *M. pectoralis major* o *M. biceps brachii* de un paciente incontinente. Para tomar la biopsia, primero se abrió la piel mediante una incisión de aproximadamente 1 cm de longitud por encima del músculo hasta llegar a la fascia del *M. pectoralis major*. Tras abrir la fascia, se tomó 1  $\text{cm}^3$  de tejido muscular (biopsia). La biopsia se transfirió directamente a un medio de transporte de biopsias preenfriado a aproximadamente 4°C y compuesto por medio basal F10 de Ham suplementado con Gentamicina (1-5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de concentración final). La biopsia se almacenó durante aproximadamente 26 horas a 1-11°C dentro del medio de transporte de la biopsia. A continuación, la biopsia se transfirió a una placa de Petri llena de 1x PBS. El tejido muscular se separó del tejido conjuntivo utilizando pinzas estériles y un bisturí. A continuación, el tejido muscular se transfirió a otra placa de Petri llena de 1x PBS y se diseccionó en trozos de 2-3  $\text{mm}^2$  utilizando un bisturí. Tras una etapa de transferencia adicional como el anterior, las piezas de tejido se cortaron en trozos de 1 mm. Finalmente, las piezas se transfirieron a un tubo de centrifugación lleno de 1x PBS y se centrifugaron durante 10 minutos a 1300 rpm. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el tejido muscular se resuspendió en 1x PBS suplementado con 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Gentamicina. A continuación, la suspensión de tejido muscular se enfrió a 2-8°C durante 48 horas. Tras el enfriamiento, la suspensión de tejido muscular se centrifugó durante 10 minutos a 1300 rpm, se retiró el sobrenadante y se añadieron 2,5 ml de una solución de digestión que contenía 1-5 mg/ml de colagenasa, 2-4 % v/v de tampón Hepes, 0,1-10 % v/v de suero fetal de ternera y 5-10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Gentamicina en Ham's F10. A continuación, la suspensión de tejido muscular se incubó de 6 a 20 horas a 37°C, 5 % de  $\text{CO}_2$ . A continuación, se centrifugó la suspensión a 1300 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en un medio que contenía 10-20 % v/v de FCS, 1-3 ng/ml de bFGF y 3-10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Gentamicina en Hams F10 y se sembró en frascos de cultivo celular. Las SMDC adheridas al fondo del matraz de cultivo se mantuvieron cambiando el medio cada 3-4 días y subcultivándolas tras desprenderse una vez alcanzada la confluencia. Se realizaron subcultivos hasta alcanzar de  $1 \times 10^7$  a  $5 \times 10^7$  de SMDC.

35 El recuento de células se realizó según el manual del chemometec nucleocounter™. Este procedimiento utiliza la tinción con propidio yoduro de los núcleos y calcula el número de células en 0,2 ml. Antes del recuento automático, se mezclaron 100  $\mu\text{l}$  de una suspensión celular con 200  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis reactivo A (para permeabilizar la membrana celular) y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de tampón estabilizador del reactivo B. La suspensión se mezcló, se recogió con una nucleocasette™ y finalmente se midió.

40 La Figura 1 muestra la morfología de SMDC en copos de cultivo celular estándar obtenida por la presente invención visualizada por microscopía de contraste de fase.

### Ejemplo 2 - Citometría de flujo

45 El análisis por citometría de flujo se realizó en un citómetro de flujo Guava easyCyte 6HT 2L (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Brevemente, las células se cosecharon mediante tripsina a 37°C durante 5 min, se centrifugaron a 400 rcf y se resuspendieron en 1x PBS suplementado con 1 % FCS. Las células en una concentración de 40000/reacción se incubaron con 5  $\mu\text{L}$  de anticuerpo anti-CD56-PE (Beckman Coulter Inc., Francia), isotipo IgG1-PE (Beckman Coulter), isotipo Alexa488 (Sigma), anti-CD105-PE (Beckman Coulter Inc., Francia) o A2B5-Alexa488 (Millipore) durante 15 min en un tubo Eppendorf® de 1,5 mL a 4° C en oscuridad. Las células se lavaron con 1 mL de PBS, se centrifugaron a 400 rcf y se resuspendieron en 200  $\mu\text{L}$  de 1x PBS para el análisis FACS en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Tras lavar y resuspender, cada reacción recibió 5  $\mu\text{l}$  de colorante de viabilidad 7-aminoactinomicina D (Beckman Coulter Inc., Francia) y la placa se incubó durante 10 minutos a 4 °C. Los eventos celulares se adquirieron con ayuda del software Guava InCyte™ v.2.3. Se generaron histogramas y gráficos de puntos con un mínimo de 3000 eventos y un caudal de muestra de 1,8  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . La tinción positiva se obtuvo por comparación con el control de isotipo establecido como al menos 99 % negativo.

**Ejemplo 3 - Inmunoquímica**

En primer lugar, se desechó el sobrenadante de los platos de cultivo celular y las células se lavaron tres veces con PBS. La permeabilización y fijación se llevó a cabo cubriendo las células con una solución de formaldehído al 4 % (v/v; diluido en PBS) durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron con PBS tres veces  
 5 después de cada etapa de incubación realizado. A continuación, se cubrieron las células con 500 µl de bloque de hidrogenoperóxido (Thermo Fisher Scientific) y se incubaron durante cinco minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios (desmina) en una concentración final de 40 µg pro ml (p/v) se pipetearon sobre las células y se incubaron durante al menos 90 minutos (37°C, 5 % de CO<sub>2</sub>). A continuación, se cubrieron las células con 500 µl de anticuerpos secundarios conjugados con biotina (cabra anticonejo, policlonal, Thermo Fisher Scientific) y se incubaron  
 10 en las mismas condiciones que los anticuerpos primarios, pero durante 60 minutos como mínimo. Para la visualización de las uniones de anticuerpos, había que añadir 500 µl de peroxidasa de estreptavidina de rábano picante (Vectorlabs) en una concentración final de 2-5 µg/ml (diluida en PBS) e incubar a 37° C, 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 20 minutos, seguido de cubrir las células con 500 µl de solución única de cromógeno, que se retiraba al cabo de 5 a 15 minutos. Se realizó un último lavado con PBS antes de poder observar los resultados. Las células teñidas con desmina positiva por  
 15 inmunocitoquímica se visualizan en color rojo oscuro.

**Ejemplo 4 - Pureza de la SMDC**

Se analizó la pureza de los marcadores miogénicos CD56 (NCAM) y desmina en las SMDC obtenidas por el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. El porcentaje de células positivas para CD56 se midió por citometría de flujo como se describe en el Ejemplo 2. Las SMDC obtenidas mediante la presente invención como se indica en el Ejemplo  
 20 1 contenían un 99,3 % de células CD56 positivas (Figura 2A) y un 98,77 % de células viables (Figura 2B). Además, la expresión de desmina de un lote representativo de SMDC obtenido por el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 se analizó mediante inmunocitoquímica como se describe en el Ejemplo 3. La Figura 4 demuestra la gran pureza de las SMDC obtenidas mediante el Ejemplo 1, ya que la mayoría de las células son positivas para la tinción con desmina  
 25 (Figura 3).

**Ejemplo 5 - Diferenciación celular**

La diferenciación de mioblastos humanos a miotubos sincitiales tiene lugar cuando se sustituye el medio de crecimiento por un medio de diferenciación libre de suero. El medio de diferenciación de células musculares  
 30 esqueléticas (Promo Cell) se complementó con un paquete de suplementos del medio de diferenciación de células musculares esqueléticas (como se describe en el protocolo de la empresa, de la que se ha obtenido el medio) y 250 µl de gentamicina. Para el inicio de la diferenciación, se sembraron células (en medio de crecimiento) en placas de 4 o 24 pocillos (60000-480000 células) previamente contadas como se explica en el Ejemplo 1. Una vez adheridas las células a la placa (durante toda la noche), se desechó el medio de crecimiento, se lavaron las células una vez con  
 35 medio de diferenciación y se cubrieron con 500 µl de medio de diferenciación.

**Ejemplo 6 - Potencia miogénica de las SMDC**

Las SMDC de linaje miogénico son capaces de fusionarse y formar miotubos sincitiales *in vitro* que son representativos de las fibras musculares esqueléticas *in vivo*. Así pues, la potencia miogénica de la SMDC se comprobó mediante  
 40 diferenciación *in vitro*. Las células obtenidas descritas en el Ejemplo 1, se indujeron a diferenciarse como se describe en el Ejemplo 5 para comprobar la potencia miogénica. Las SMDC formaron miotubos enormes que eran positivos para desmina (tinción como se describe en el Ejemplo 3), como se muestra a partir de un lote representativo de SMDC en la Figura 4. Los resultados confirmaron la potencia miogénica de la SMDC, necesaria para regenerar funcionalmente el tejido muscular esquelético.

**Ejemplo 7 - Análisis de la expresión génica**

Las SMDC obtenidas mediante el Ejemplo 1 se sembraron, siguiendo el recuento de células también descrito en el Ejemplo 1, a una densidad de 500 000 células por pocillo en placas de 6 pocillos (NUNC Thermo Scientific) hasta un  
 50 70 por ciento de confluencia, después se aisló el ARN total utilizando el kit de aislamiento de ARN RNeasy (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ARN se evaluó mediante análisis de microfluidos utilizando electroforesis en gel desnaturalizante y el bioanizador Agilent 2100. La preparación de las muestras para la hibridación de micromatrices se llevó a cabo como se describe en los manuales del sistema Ovation PicoSL WTA System V2 y del módulo de biotina NUGEN Encore de NuGEN Technologies, Inc, San Carlos, CA, EE.UU.). En resumen, 7,5 ng de ARN total se transcribieron inversamente en ADNc de doble cadena en un proceso de dos etapas,  
 55 introduciendo una secuencia de etiqueta SPIA. El ADNc purificado con microesferas se amplificó mediante una

reacción de amplificación SPIA seguida de una purificación adicional con microesferas. Se fragmentaron 4,5 µg de ADNc de SPIA, se marcaron terminalmente con biotina y se hibridaron en matrices de expresión génica humana Affymetrix Prime View durante 16 h a 45 °C en un horno de hibridación GeneChip 640. Los arreglos hibridados se lavaron y tñeron en una estación Affymetrix Fluidics FS450, y las señales fluorescentes se midieron con un escáner Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G. Las funciones de fluidica y escaneado se controlaron mediante el software Affymetrix GeneChip Command Console v4.1.3. El procesamiento de las muestras se realizó en un proveedor de servicios y centro de Affymetrix, "KFB - Center of Excellence for Fluorescent Bioanalytics" (Regensburg, Alemania; www.kfb-regensburg.de). Las señales resumidas del conjunto de sondas en escala log2 se calcularon utilizando el algoritmo RMA (1) con el software Affymetrix GeneChip Expression Console v1.4. Con el fin de comparar los resultados de expresión génica de la SMDC obtenida mediante el Ejemplo 1 con la SMDC obtenida mediante procedimientos del estado de la técnica, los datos de expresión génica de la SMDC disponible comercialmente (Lonza) publicados por Abujarour et al., 2014 (R. Abujarour et al., "Myogenic differentiation of muscular dystrophy-specific induced pluripotent stem cells for use in drug discovery", *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 3, n.º 2, pp. 149-160, feb. 2014) se descargó de una base de datos adjunta a una publicación (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/geo/DATA/supplementary/series/GSE46633/GSE46633\_RA\_W.tar; último acceso 21.07.2017). La comparación de la expresión génica de la SMDC obtenida mediante el Ejemplo 1 con la SMDC analizada por Abujarour et al., 2014 se realizó comparando el promedio de lecturas por anotación de diferentes genes aplicando el software Partek Flow según la empresa proveedora (Partek Inc.). Por lo tanto, una media más alta de lecturas por anotación representa una mayor abundancia del ARNm anotado, lo que significa una mayor expresión génica.

#### **Ejemplo 8 - Características de apoyo neuromuscular de la SMDC**

La característica de soporte neuromuscular de SMDC obtenida empleando el Ejemplo 1 se determinó mediante la unión positiva del anticuerpo A2B5 a la superficie celular de SMDC según se realizó mediante citometría de flujo (descrito en el Ejemplo 2). Como se muestra en la Figura 5, el 96,16 % de las SMDC obtenidas mediante el Ejemplo 1 son positivas para el anticuerpo reactivo A2B5, lo que demuestra que, además de su compromiso miogénico (expresión de desmina, CD56), las SMDC también presentan características neuronales. Para comparar la característica de soporte neuromuscular de la SMDC obtenida por la presente invención con el mioblasto aislado por procedimientos del estado de la técnica, se analizó la expresión génica de las enzimas esenciales para la formación de gangliosidos reactivos A2B5 que presentan la mayor actividad aceptora de glicosíngolípidos *in vitro* ST3GAL1 y ST3GAL2 de la SMDC, como se indica en el Ejemplo 7. Tanto la expresión de ARNm de ST3GAL1 como de ST3GAL2 fue mayor en las SMDC obtenidas mediante la invención aquí propuesta en comparación con las SMDC disponibles comercialmente, como se muestra en la Figura 5. Además, también la expresión de ST3GAL3 fue mayor en las SMDC obtenidas mediante el Ejemplo 1.

#### **Ejemplo 9 - Obtención de células sin enfriamiento tras la disección del tejido**

Como ejemplo comparativo, el procedimiento de la presente invención se ha llevado a cabo omitiendo la etapa de enfriamiento. Para obtener la SMDC, se tomó una biopsia de músculo esquelético de M. pectoralis major o M. biceps brachii de un paciente con incontinencia. Para tomar la biopsia, primero se abrió la piel mediante una incisión de aproximadamente 1 cm de longitud por encima del músculo hasta llegar a la fascia del M. pectoralis major. Tras abrir la fascia, se tomó 1 cm<sup>3</sup> de tejido muscular (biopsia). La biopsia se transfirió directamente a un medio de transporte de biopsias preenfriado a aproximadamente 4°C y compuesto por medio basal F10 de Ham suplementado con Gentamicina (1-5 µg/ml de concentración final). La biopsia se almacenó durante aproximadamente 26 horas a 1-11°C dentro del medio de transporte de la biopsia. A continuación, la biopsia se transfirió a una placa de Petri llena de 1x PBS. El tejido muscular se separó del tejido conjuntivo utilizando pinzas estériles y un bisturí. A continuación, el tejido muscular se transfirió a otra placa de Petri llena de 1x PBS y se diseccionó en trozos de 2-3 mm<sup>2</sup> utilizando un bisturí. Tras una etapa de transferencia adicional como el anterior, las piezas de tejido se cortaron en trozos de 1 mm. Finalmente, las piezas se transfirieron a un tubo de centrifugación lleno de 1x PBS y se centrifugaron durante 10 minutos a 1300 rpm. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el tejido muscular se resuspendió en 1x PBS suplementado con 8 µg/ml de Gentamicina. La suspensión de tejido muscular se centrifugó durante 10 minutos a 1.300 rpm, se retiró el sobrenadante y se añadieron 2,5 ml de una solución de digestión que contenía 1-5 mg/ml de colagenasa, 2-4 % v/v de tampón Hepes, 0,1-10 % v/v de suero fetal de ternera y 5-10 µg/ml de gentamicina en Ham's F10. A continuación, la suspensión de tejido muscular se incubó de 6 a 20 horas a 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub>. A continuación, se centrifugó la suspensión a 1300 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en un medio que contenía 10-20 % v/v de FCS, 1-3 ng/ml de bFGF y 3-10 µg/ml de Gentamicina en Hams F10 y se sembró en frascos de cultivo celular. Las SMDC adheridas al fondo del matraz de cultivo se mantuvieron cambiando el medio cada 3-4 días y subcultivándolas tras desprenderse una vez alcanzada la confluencia. Se realizaron subcultivos hasta alcanzar de 1×10<sup>7</sup> a 5×10<sup>7</sup> de SMDC.

**Ejemplo 10 - Expresión de marcadores de células mesenquimales de SMDC**

La expresión de marcadores mesenquimales de SMDC obtenidos mediante el empleo del Ejemplo 1 se determinó mediante la unión del anticuerpo anti-CD105, anti-CD105-PE (Beckman Coulter Inc., Francia), a la superficie celular de SMDC medida por citometría de flujo (descrita en el Ejemplo 2). Como se muestra en la Figura 8, el 98,69 % de las SMDC obtenidas mediante el Ejemplo 1 se detectan como positivas para el anticuerpo reactivo CD105 cuando el umbral de positividad se fijó de acuerdo con el control de isotipo (0,31 % positivo), lo que sugiere que las SMDC son células mesenquimales y/o de origen mesenquimal.

**Ejemplo 11 - Medición de la actividad acetilcolinesterasa de la SMDC**

Para medir la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE), se sembraron 200 000 SMDC en un pocillo recubierto de gelatina de una placa de 24 pocillos y se indujeron a diferenciarse como se explica en el Ejemplo 5. Seis días después del inicio de la diferenciación, se retiró cuidadosamente el medio de diferenciación de la placa de 24 pocillos y se añadieron inmediatamente 300  $\mu$ l de solución de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) 0,5 mM (preparada en tampón fosfato, pH 7,2 con 0,1 % de triton X-100). Tras 2 minutos de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, se añadieron 50  $\mu$ l de yoduro de acetiltiocolina (ATI) 5,76 mM (preparado en agua destilada). El contenido de la reacción se incubó durante 60 minutos a 30 °C en la oscuridad, seguido de la medición de la densidad óptica (DO) a 412 nm (OD412nm) en un lector de microplacas Anthos Zenyth 340rt (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido). También se incluyó una reacción en blanco, compuesta por todos los reactivos excepto las células. Los valores de OD412nm corregidos se obtuvieron restando la medición media en blanco de la OD412nm media. La actividad AChE en mU relativas (AChE mUrel) se calculó según la ecuación de la línea recta de una curva estándar. La curva estándar se obtuvo midiendo diluciones de 4-500 mU/ml de una reserva de AChE de 50 U/mL listo para usar (de Electrophorus electricus, AAT Bioquest® Inc., Sunnyvale, CA, EE.UU.). Las diluciones estándar se prepararon en tampón fosfato (pH 7,2 con 0,1 % de Triton X-100) y se utilizaron inmediatamente. Para el análisis de la enzima estándar AChE, se mezclaron 200  $\mu$ l de cada dilución con 300  $\mu$ l de DTNB 0,5 mM y 50  $\mu$ l de ATI 5,76 mM, respectivamente, y se midió la DO412nm después de 60 minutos en una placa de 24 pocillos. Para normalizar las concentraciones de proteínas específicas del tipo de célula, la actividad AChE de la cantidad medida de células se dividió por el contenido total de proteínas de estas células, lo que dio como resultado la actividad AChE en mUrel por g de proteína (AChE mUrel/g proteína). Para analizar la cantidad total de proteína dentro de una población celular, una alícuota de células adherentes diferenciadas según el Ejemplo 5 se lavó primero dos veces con PBS, se cubrió posteriormente con PBST (0,1 % Triton X-100) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se resuspendió el lisado y se transfirió a un tubo Eppendorf®, se agitó brevemente en vórtex y se centrifugó durante 4 minutos a 1200\*g. Por último, el sobrenadante claro se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo y se determinó la concentración de proteínas utilizando el Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, MA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante midiendo la DO a 540 nm con un lector de microplacas Anthos Zenyth 340rt (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido).

**Ejemplo 12 - Cuantificación de la competencia de fusión SMDC**

La competencia de fusión de las SMDC se basa en su capacidad para formar miotubos multinucleados y representa su potencia miogénica. La competencia de fusión se cuantifica como índice de fusión, que representa el número de núcleos localizados dentro de miotubos multinucleados, definidos como células que contienen al menos 3 núcleos, dividido por el número total de núcleos en el campo microscópico observado. Para determinar el índice de fusión de las SMDC, se sembraron 2\* 10<sup>5</sup> células en placas de 24 pocillos recubiertas de gelatina y se indujo su diferenciación cambiando el medio de crecimiento al medio de diferenciación del músculo esquelético 24 horas después de la siembra. Tras 6 días de diferenciación, las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con PFA al 4 % durante 10 minutos. A continuación, las células se lavaron tres veces con PBS y se tiñeron con una solución de Hoechst33342 de 2  $\mu$ g/mL durante 20 minutos. Para cada muestra se capturaron al menos tres campos durante la obtención de imágenes de inmunofluorescencia y se superpusieron con imágenes de contraste de fase para facilitar la detección de núcleos y límites celulares. El índice de fusión se calculó para cada campo visual capturado dividiendo el número de núcleos dentro de los tubos por el número total de núcleos por campo tras calcular la media de todos los campos analizados. Sólo se consideraron miotubos las células que tenían al menos 3 núcleos. Para el análisis estadístico se analizaron al menos 3 poblaciones derivadas de diferentes pacientes para cada grupo de células.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para obtener células derivadas de músculo esquelético (SMDCs), el procedimiento comprende las etapas de:
  - 5 (a) Enfriamiento de una muestra obtenida a partir de tejido muscular esquelético en un tampón;
  - (b) procesamiento de la muestra y enfriamiento de la muestra procesada, en el que el enfriamiento se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 1 y 16°C durante un tiempo comprendido entre 2 y 48 horas;
  - (c) resuspender la muestra de la etapa b) en medio con suero que contenga al menos una enzima y calentar a 25-38°C durante 1 a 20 horas; granular la muestra y
  - 10 (d) resuspender el precipitado de la muestra de la etapa c) para obtener una suspensión de células individuales de la muestra de la etapa c), obteniendo así SMDC.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa (a) se lleva a cabo a una temperatura inferior a 16°C, preferentemente a una temperatura comprendida entre 1 y 16°C, preferentemente entre 4 y 10°C, en particular preferentemente a 7°C; y durante un tiempo comprendido en el intervalo de hasta 96 horas.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa (b) comprende el uso de tijeras, bisturí, pinzas, 15 filtro o molino de bolas.
4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el enfriamiento en la etapa (b) se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 4 a 8 °C, en particular preferentemente 4 °C y durante un tiempo en el intervalo de 2 horas a 48 horas.
5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa (c) comprende realizar el 20 tratamiento enzimático con una solución que comprende una cualquiera o más seleccionadas del grupo que consiste en tripsina, papaína, elastasa, hialuronidasa, colagenasa, desoxirribonucleasa y ADNasa.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa (c) se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 36 y 38°C, en particular preferentemente a 37°C.
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la etapa (d) comprende 25 preferentemente un procedimiento seleccionado de al menos uno de los siguientes: clasificación FACS, centrifugación, clasificación electrocinética, clasificación por acustoforesis, clasificación celular basada en microesferas y clasificación óptica.
8. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que:
  - 30 después de la etapa d) se realiza otra etapa e) que incluye la incubación de la suspensión unicelular obtenida en la etapa d), en la que la incubación en la etapa e) se realiza preferentemente a una temperatura comprendida entre 25 y 38°C, preferentemente entre 36 y 38°C, en particular preferentemente a 37°C, obteniéndose así SMDC adherentes, y
  - 35 después de la etapa (e) se realiza opcionalmente otra etapa (f) que comprende el descarte de las células no adherentes de la etapa (e), en la que la etapa (f) se realiza preferentemente después de al menos 6 horas a 4 días, y
  - después de la etapa (f) se lleva a cabo opcionalmente otra etapa (g) de propagación de las células adherentes de la etapa (e), la propagación en la etapa (h) comprende el cultivo de las células adherentes durante 1 a 5 pasajes hasta una confluencia del 70 al 80 %.
9. Una población celular de SMDC, en la que la población comprende al menos un 90 % de células CD56 positivas, 40 un 90 % de células A2B5 positivas, un 90 % de células CD105 positivas y un 90 % de células desmina positivas, y menos del 10 % de la población expresa CD34, Sca-1 y MyoD.
10. Una población celular de SMDC según la reivindicación 9 obtenida en un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
11. La población celular de SMDCs según la reivindicación 9 o 10 para su uso como composición farmacéutica.
- 45 12. La población celular de SMDCs según la reivindicación 9 o 10 para su uso en un procedimiento de prevención y/o tratamiento de neuromiopatías y/o miopatías, preferentemente para su uso en un procedimiento de prevención y/o tratamiento de neuromiopatías y/o miopatías tales como incontinencia fecal y/o incontinencia urinaria.
13. La población celular de SMDCs según la reivindicación 9 o 10 para su uso en un procedimiento de tratamiento de 50 una disfunción muscular, en el que la disfunción muscular es la incontinencia, en particular una incontinencia urinaria y/o anal o fecal.
14. La población celular de SMDC para uso según las reivindicaciones 12 o 13, en la que la población celular según la reivindicación 9 o 10 es para uso en un procedimiento de tratamiento de la incontinencia urinaria y la población

celular de SMDC se proporciona en una solución de inyección de suspensión celular de 50 a 200  $\mu$ l con una concentración de  $1 \times 10^5$  a  $6 \times 10^6$  células por 100  $\mu$ l de solución de inyección para inyección en el esfínter urinario.

- 5 15. La población celular de SMDC para uso según las reivindicaciones 12 o 13, en la que la población celular según la reivindicación 9 o 10 es para uso en un procedimiento de tratamiento de la incontinencia anal y la población celular de SMDC se proporciona en una solución de inyección de suspensión celular de 50  $\mu$ l a 1 ml con una concentración de  $1 \times 10^5$  a  $6 \times 10^6$  células por 100  $\mu$ l de solución de inyección para inyección en el esfínter anal externo, en particular, donde el procedimiento de tratamiento de la incontinencia anal comprende de 20 a 40 inyecciones de suspensión celular derivada de músculo esquelético, donde en cada inyección se inyectan de 50 a 500  $\mu$ l de suspensión celular derivada de músculo esquelético y donde cada inyección se aplica a otra región del esfínter anal.

10

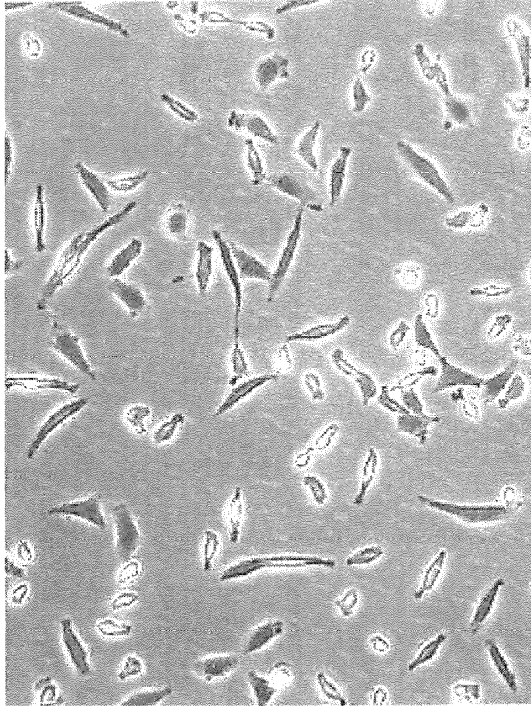
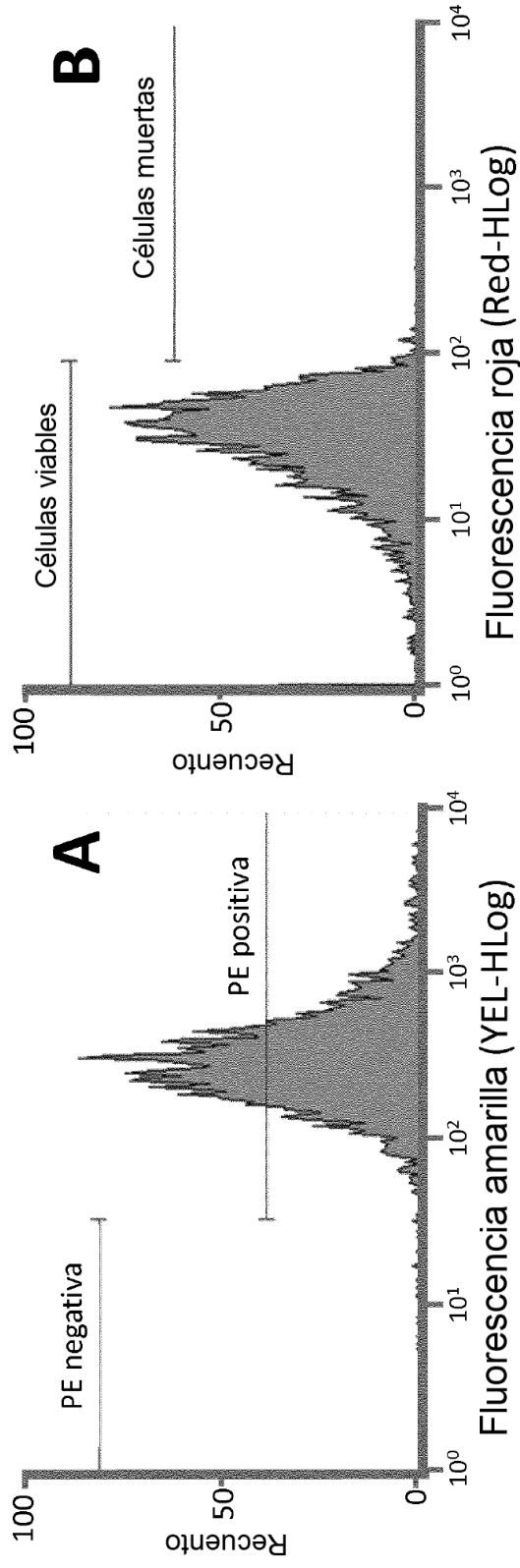


Fig. 1

Fig. 2



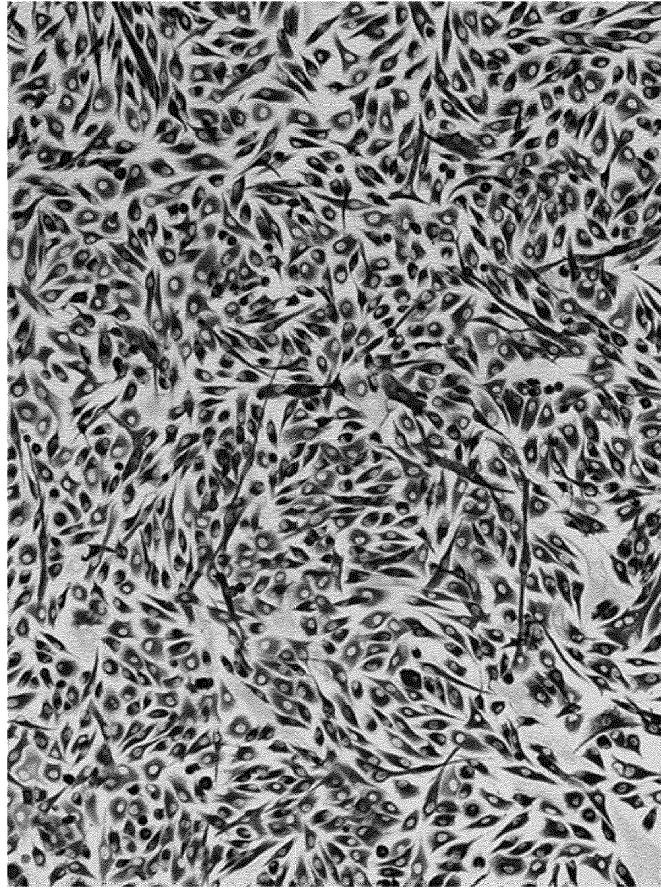


Fig. 3



Fig. 4

Fig. 5

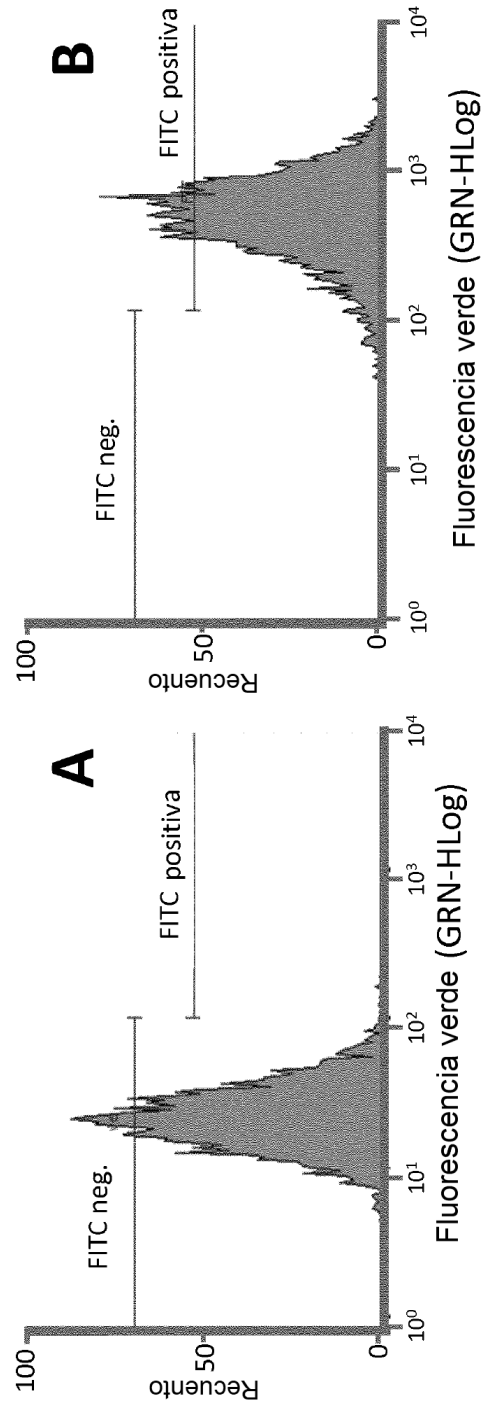
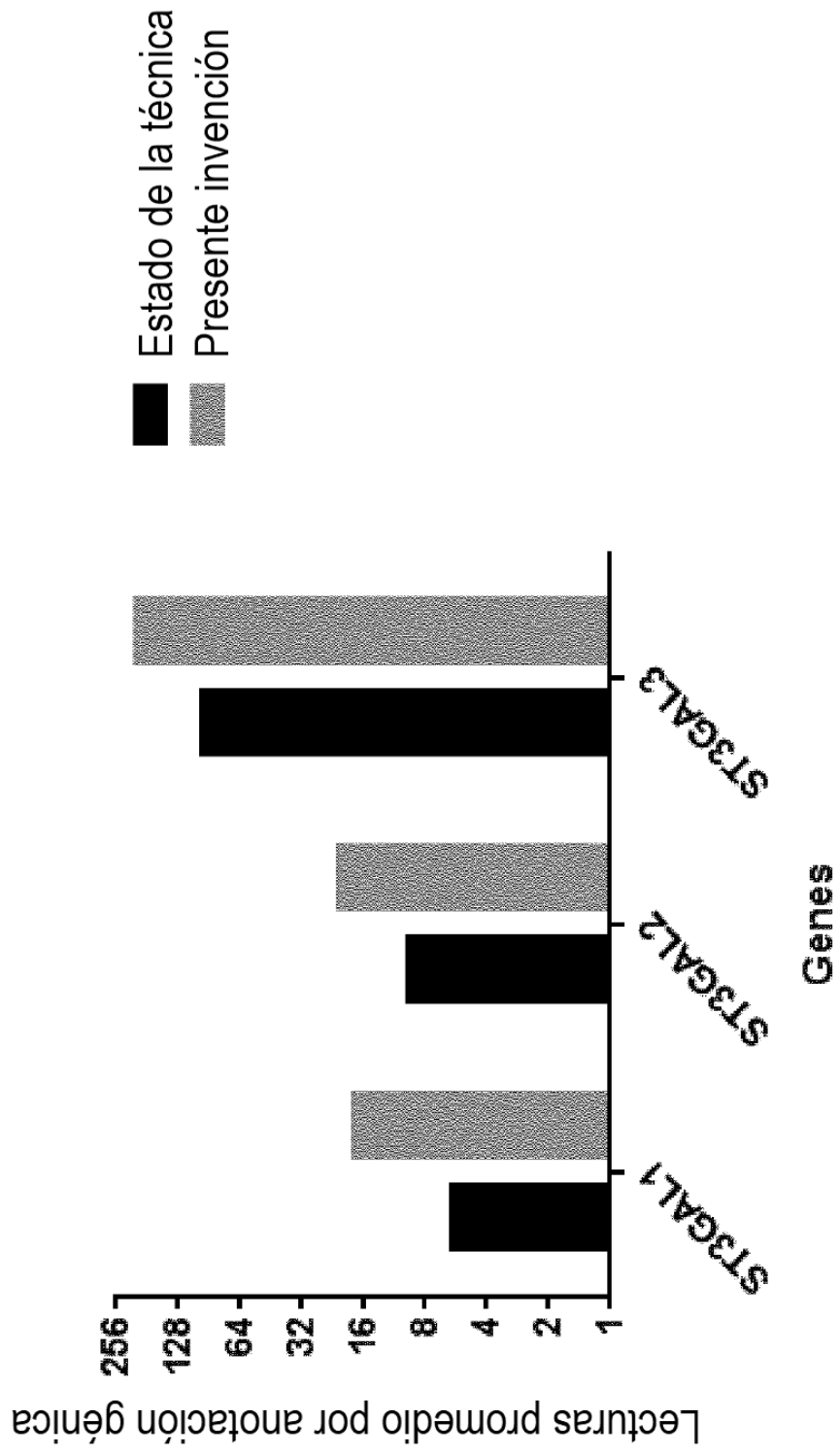


Fig. 6



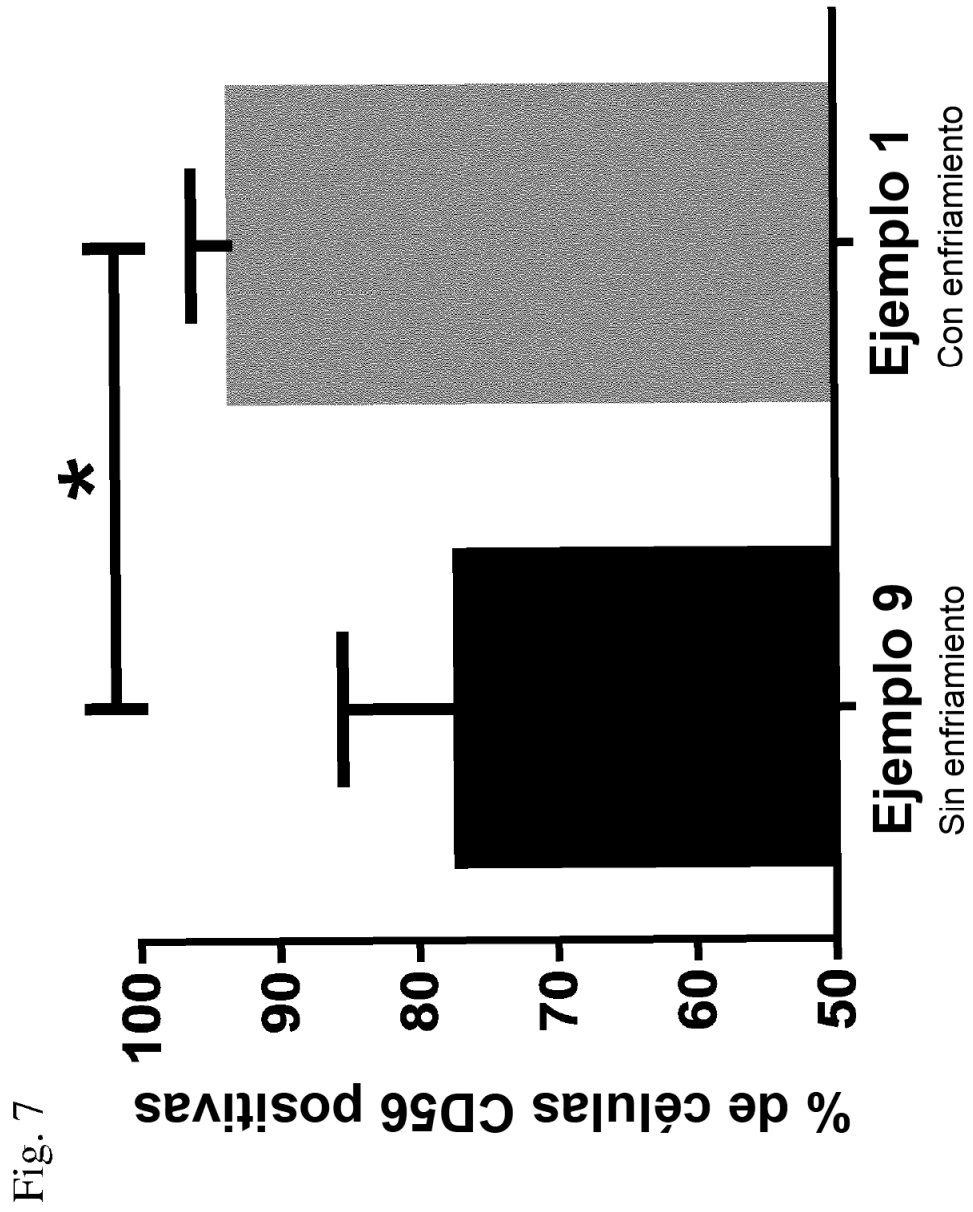
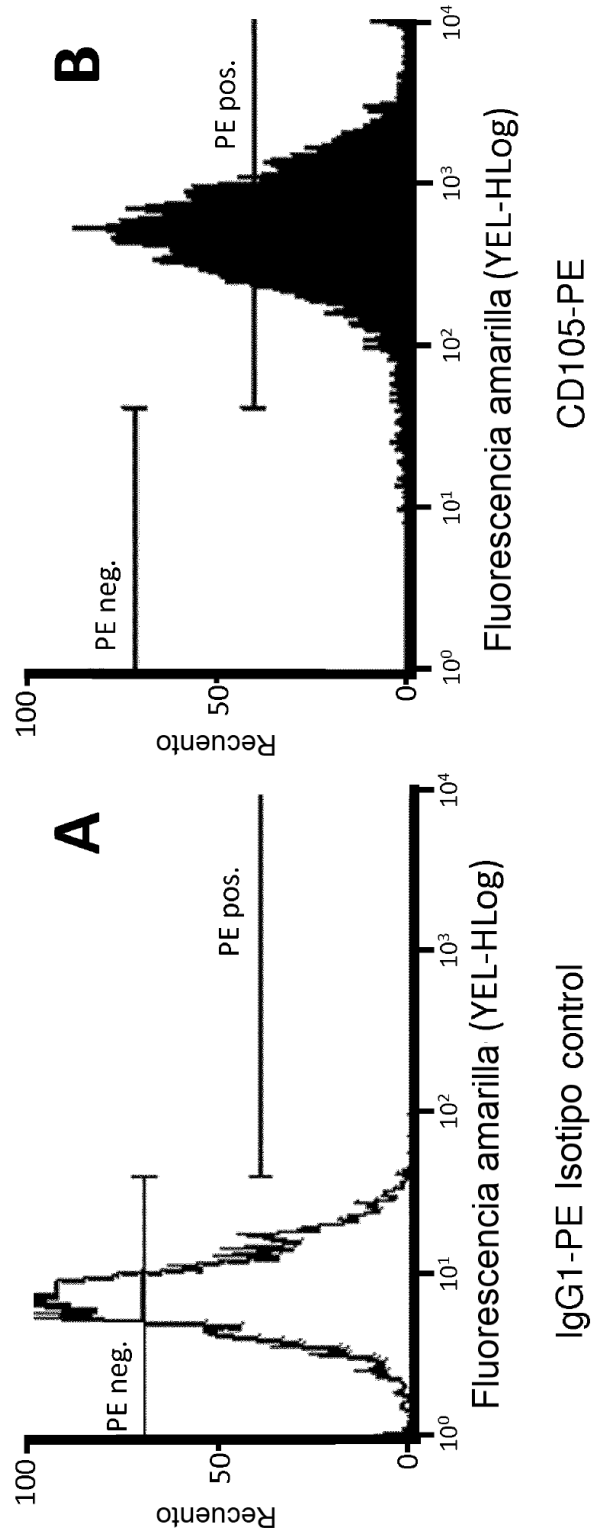


Fig. 8



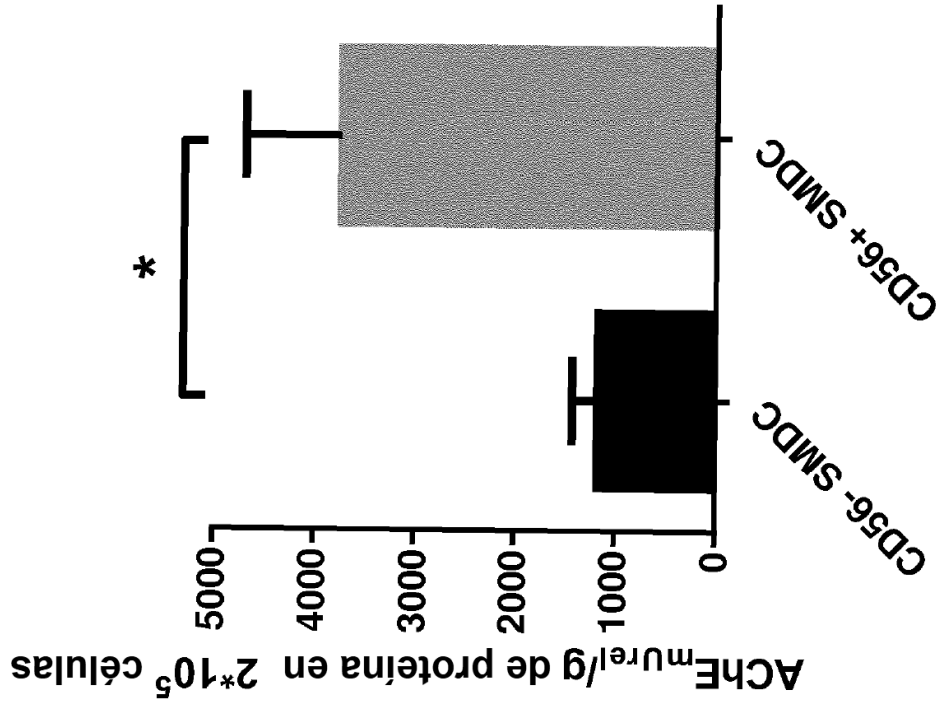


Fig. 9

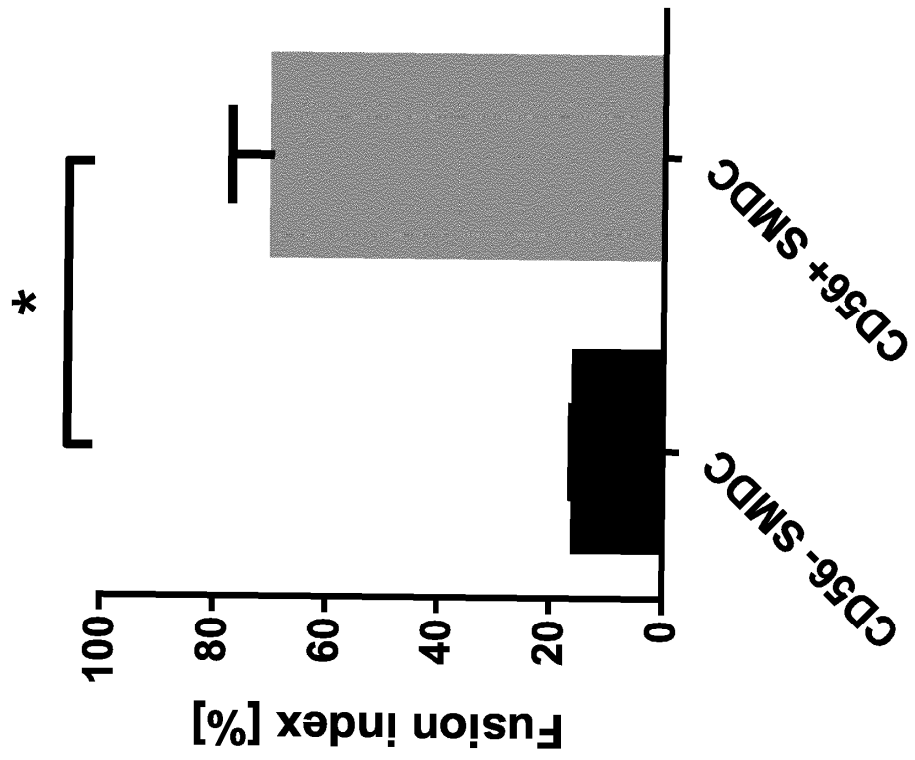


Fig. 10