(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
19 de septiembre de 2019 (19.09.2019)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2019/175459 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
C12N 5/074 (2010.01) *A61K 35/34* (2015.01)
C12N 5/077 (2010.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2019/070167

(22) Fecha de presentación internacional:
12 de marzo de 2019 (12.03.2019)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201830244 12 de marzo de 2018 (12.03.2018) ES

(71) Solicitantes: **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Avda. de la Constitucion, 18, 41071 Sevilla (ES). **ADMINISTRACIÓN GENERAL DE LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE EUSKADI** [ES/ES]; C/Donostia-San Sebastian, 1, 01010 Vitoria-Gasteiz (ES).

(72) Inventores: **IZETA PERMISAN, Ander**; Paseo Dr. Begiristain, s/n, San Sebastian, 20014 Guipúzcoa (ES). **LÓPEZ DE MUNAIN ARREGUI, Adolfo**; Paseo Dr. Begiristain, s/n, San Sebastian, 20014 Guipúzcoa (ES). **NALDAIZ GASTESI, Neia**; Paseo Dr. Begiristain, s/n, San Sebastian, 20014 Guipúzcoa (ES). **GOICOECHEA BIANCHI, María**; Paseo Dr. Begiristain, s/n, San Sebastian, 20014 Guipúzcoa (ES). **HERRERA IMBRODA, Bernardo**; C/ Doctor Miguel Diaz Recio, 28, 29010 Málaga (ES). **LARA CABANÁS, María Fernanda**; C/ Doctor Miguel Diaz Recio, 28, 29010 Málaga (ES). **ARAGÓN CORTÉS, Isabel María**; C/ Doctor Miguel Diaz Recio, 28, 29010 Málaga (ES). **MACHUCA SANTA CRUZ, Francisco Javier**; C/ Doctor Miguel Diaz Recio, 28, 29010 Málaga (ES).

(74) Mandatario: **FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo**; Paseo de la Castellana 140, 3ª Planta., Edificio Lima, 28046 Madrid (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:
— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*
— *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))*

(54) **Title:** MULTIPOTENT PRECURSOR CELLS OBTAINED FROM THE CREMASTER MUSCLE AND USE THEREOF TO DEVELOP THERAPIES AND REGENERATIVE MEDICINE

(54) **Título:** CÉLULAS PRECURSORAS MULTIPOTENTES OBTENIDAS DEL MÚSCULO CREMÁSTER Y SU USO EN EL DESARROLLO DE TERAPIAS Y MEDICINA REGENERATIVA

(57) **Abstract:** The authors of the present invention propose that the use of multipotent precursor cells (myogenic, vascular and neural) isolated from the cremaster muscle has advantages for cell therapy in patients with urinary or anal incontinence with sphincter damage or for the treatment of small muscle groups, for example, in oculopharyngeal muscular dystrophy or facioscapulohumeral muscular dystrophy, the cells being used in a single treatment or a treatment combined with other active ingredients, or associated with a medical device.

(57) **Resumen:** Los autores de la presente invención proponen que el empleo de células precursoras multipotentes (miogénicas, vasculares y neurales) aisladas a partir del músculo cremáster presenta ventajas para la terapia celular en pacientes de incontinencia urinaria o anal con daño esfinteriano o en el tratamiento de grupos musculares de pequeño tamaño tales como la distrofia muscular oculofaríngea o la distrofia facioescapulohumeral, en tratamiento único o combinado con otros principios activos, o asociados a un dispositivo médico.

WO 2019/175459 A1

Células precursoras multipotentes obtenidas del músculo cremáster y su uso en el desarrollo de terapias y medicina regenerativa

La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina regenerativa y de la terapia celular, y específicamente se refiere al método de aislamiento y expansión de células precursoras multipotentes obtenidas del músculo cremáster humano, y a sus usos terapéuticos.

ESTADO DEL ARTE

Las células madre adultas se caracterizan por sus propiedades de autorrenovación y diferenciación a distintos linajes (multipotencia) a lo largo de la vida del individuo. En general, son responsables del mantenimiento de los órganos y tejidos en homeostasis y de su reparación en respuesta al daño tisular, sea éste traumático o degenerativo (1).

En el músculo estriado adulto, las células madre miogénicas son conocidas como "células satélite", debido a su posición superficial a las fibras musculares, aunque incluidas en la membrana basal que recubre las mismas (2). Sin embargo, el proceso de miogénesis es complejo y supone el paso de estas células por diversos estadios precursores (quiescencia, activación, proliferación y diferenciación) previos a su integración definitiva mediante su fusión con las fibras musculares en el marco del proceso regenerativo (3). Los marcadores reconocidos de las células satélite humanas incluyen Pax7, CD56, MyoD, M-cadherina y desmina, pero ninguno de ellos es considerado marcador específico de las mismas (4, 5).

Por otro lado, el nicho de las células satélite es complejo: está compuesto por otras células precursoras, como los precursores fibro-adipogénicos o FAPs, que influyen en la respuesta a daño y en la regeneración compensatoria del tejido (6). Además, la célula satélite forma parte del espacio intersticial muscular y su nicho es adyacente a capilares y terminaciones nerviosas que, a su vez, influyen en la activación o quiescencia de las células satélite mediante señalización directa o paracrina, así como generando células precursoras de linaje vascular o neural en respuesta a daño muscular (7, 8).

Por todo ello, sería deseable la obtención y caracterización de los diversos tipos de células precursoras multipotentes existentes en el músculo esquelético y ser capaces de diseñar protocolos que permitan su utilización, por separado o en combinación, en estudios clínicos de terapia celular y de desarrollo de fármacos que modulen su activación.

Se han publicado diversos protocolos de aislamiento de las células satélite humanas (o células precursoras miogénicas relacionadas) a partir de suspensiones celulares obtenidas del músculo esquelético, principalmente mediante la separación de subpoblaciones celulares en base a la expresión diferencial de marcadores de membrana. De hecho, esta ha sido un área especialmente activa de investigación en los últimos años. Así,

- Zheng y cols. definen una población "mioendotelial" CD45-CD56+CD34+CD144+, que es Pax7+, supone el 0.4% de la suspensión celular inicial aislada de músculo esquelético humano, y que es superior en cuanto a su capacidad regenerativa en comparación a los mioblastos CD56+, cuando es trasplantada a músculo de ratón (9).
- Distintos grupos de investigación han propuesto que las células mononucleadas CD133+ aisladas de músculo esquelético humano, aunque de naturaleza heterogénea, son capaces de generar células satélite tras su trasplante en ratón de manera más eficiente que los cultivos de mioblastos (10-12). Un ensayo clínico Fase I demostró que las células CD133+ aisladas de músculo son seguras para su uso en seres humanos (13), pero el uso de esta población celular no se ha generalizado debido a que existen problemas en su expansión celular que deben ser resueltos de cara a un mayor desarrollo de su aplicación clínica (5).
- Vauchez y cols. proponen que las células musculares que no expresan el marcador CD34 y que presentan actividad aldehído deshidrogenasa (ADLH+), pueden ser una subpoblación celular progenitora de músculo, distinta de las células satélite (ya que son CD56-) y también distinta de las células CD133+ (ya que no expresan este marcador). La población ADLH+CD34- no cultivada es heterogénea, representa en torno al 3% de la suspensión celular inicial, y tras su aislamiento y trasplante directo a músculo de ratón (en ausencia de cultivo) demuestran propiedades regenerativas (14). Estos resultados han sido corroborados posteriormente por otros grupos de investigación (15, 16).
- Pisani y cols. describen dos subpoblaciones celulares miogénicas en músculo esquelético humano. Una, que identifican con las células satélite es definida como células CD34-CD15-CD56+. Otro precursor miogénico de carácter "intersticial" y no satélite (ya que es Pax7-) ni CD133+ (ya que no expresan este marcador) es definido como CD34+CD15-CD56+ (17). En otro estudio, proponen el uso de la fracción CD34- de células musculares para evitar la formación de grasa por las células tras su trasplante a músculo de ratones (18).

El primer artículo carece de una validación del potencial regenerativo de estas poblaciones celulares en trasplantes *in vivo*, y el segundo estudio no enriquece suficientemente las poblaciones precursoras miogénicas.

- Lecourt y cols. corroboran lo anterior, identificando una subpoblación CD56+ en cultivos de mioblastos que es miogénica y mutuamente excluyente con una subpoblación CD15+ que no es miogénica (19).
- Castiglioni y cols. proponen una estrategia de selección negativa para cinco marcadores (CD45, CD11b, GlyA, CD31, CD34), seguida de selección positiva de las células CD56+ITGA7+ como estrategia de aislamiento de las células satélite de músculo esquelético fetal y adulto (20). En adultos, las células satélite así definidas suponen aproximadamente el 1.5% de la suspensión celular. Los autores calculan que existen unas 3600 células satélite por gramo de músculo, lo que a nivel práctico impide su aislamiento en cantidades suficientes para su uso en clínica. A nivel de marcadores, este estudio demuestra que las células satélite fetales expresan además CD144, CD146 y CD133, mientras que las células satélite adultas son CXCR4+.
- En concordancia con lo anterior, Bareja y cols. proponen la selección de células satélite humanas basada en la expresión de CD56 y CXCR4. Concretamente, seleccionan la población CD11b-CD31-CD34-CD45-CXCR4+CD56+ de músculo esquelético. Las células satélite así definidas suponen aproximadamente el 2% de la suspensión celular y son capaces de regenerar músculo in vivo tras su trasplante a músculo de ratón (21).
- Tamaki y cols. proponen la selección de células precursoras miogénicas de músculos abdominales y de los miembros inferiores, basada en la combinación de marcadores CD34-CD45-CD29+ (22). Estas células fueron capaces de regenerar músculo en el trasplante in vivo a músculo de ratón. Sin embargo, la proporción de células positivas para CD29 es demasiado alta para ser una población homogénea, en torno a un 10-12% del total, lo que indica que el protocolo de purificación de esta subpoblación podría refinarse.
- En esta línea, Xu y cols. proponen que, tras una selección negativa para eliminar las células endoteliales (CD31+) y células del sistema inmune (CD45+), la combinación de marcadores CD56+/CD29+ selecciona específicamente las células satélite de diversos músculos esqueléticos humanos, que suponen aproximadamente el 1% de la suspensión celular inicial (23). En ensayos de trasplante a ratones de las células recién aisladas (no cultivadas), esta subpoblación es la única capaz de generar fibras regenerativas, dando lugar a células satélite funcionales que colonizan el nicho

en la fibra muscular receptora y son capaces de responder a un segundo daño en el tejido. Siendo esta aproximación altamente prometedora, hay que tener en cuenta que el número de células obtenido en la realidad fue 40-100 veces menor al que se esperaba en base al cálculo teórico de las células satélite preexistentes.

- En concordancia parcial con lo anterior, Charville y cols. proponen que las células satélite humanas se pueden aislar de diversos músculos con la combinación de marcadores CD31-CD34-CD45-CD29+EGFR+ (24). Este estudio propone la inhibición de la ruta de p38MAPK para lograr una expansión de las células satélite indiferenciadas en el cultivo *in vitro*, que además aumenta posteriormente entre 3 y 7 veces la capacidad de regeneración muscular al ser trasplantadas al músculo de ratón. Los autores atribuyen estas mejoras a la disminución de la diferenciación y el rejuvenecimiento de las células satélite al ser cultivadas en presencia de un inhibidor de p38MAPK.
- Alexander y cols. proponen que CD82 es un marcador expresado por las células satélite humanas y que puede ser utilizado para su aislamiento, aunque no es específico de las mismas porque sigue expresándose en células precursoras miogénicas activadas o en proceso de diferenciación. Además, su expresión está disminuida en pacientes de distrofia muscular, lo que comprometería su posible uso en terapia en algunos tipos de enfermedades (25).
- En concordancia parcial con lo anterior, Uezumi y cols. proponen que, partiendo de cultivos de células CD56+ humanas, las células positivas para los marcadores de membrana CD82, CD274 y CD318 son las células satélite sublaminares, mientras que CD201 es marcador del precursor adipogénico residente en músculo ó FAP (26). Las células satélite aisladas a partir de cultivos de mioblastos CD56+ son definidas en este estudio como CD56+CD82+CD318+PDGFRα-CD201-.

A pesar de todos estos avances recientes, las células satélite aún presentan importantes problemas de cara a su posible aplicación clínica como medicamento de terapia celular. El número de células satélite que se obtiene de las biopsias musculares de pequeño tamaño (típicamente de 50-100 mg) que se utilizan normalmente en clínica es muy limitado. Se calcula que hay entre 500 y 1000 células satélite por milímetro cúbico de fibra en el músculo humano, aunque su número es variable entre los distintos grupos musculares en función del área y densidad de las miofibras (23). Además, estas células se expanden insuficientemente *ex vivo* o pierden

sus características de célula madre como consecuencia del cultivo *in vitro.* Esto se ha demostrado tanto en células satélite de ratón (27, 28) como humanas (29, 30). Es más, los protocolos de aislamiento y caracterización de las células satélite humanas se encuentran todavía en desarrollo, a diferencia del ratón donde se conoce mejor su biología (31).

Por estas razones, los cultivos celulares denominados como "mioblastos" han sido los más usados en clínica hasta el momento. Los mioblastos (32) son una mezcla heterogénea de células en suspensión obtenidas de biopsias musculares, normalmente utilizadas directamente (sin purificar), o semi-purificadas mediante un mínimo enriquecimiento basado en la selección positiva de las células que expresan el antígeno de membrana CD56 (33). En general, los investigadores del campo consideran que los mioblastos son células precursoras miogénicas, en un estadio intermedio entre las células satélite y los miocitos terminalmente diferenciados, aunque esto es difícil de precisar dada la heterogeneidad de estos cultivos (incluidos los obtenidos a partir de la fracción celular CD56+). Los cultivos de mioblastos así obtenidos se expanden *in vitro* con relativa facilidad (34, 35), por lo que han sido utilizados en diversos ensayos clínicos en indicaciones relacionadas con músculo esquelético y cardiaco, en los que los resultados obtenidos han sido decepcionantes (36-40).

Los motivos del fracaso clínico de los mioblastos pueden ser múltiples, pero están probablemente relacionados con las condiciones de expansión celular (41, 42). Cuando los medios y condiciones de cultivo favorecen la proliferación, es fácil que provoquen también la excesiva diferenciación celular, lo que resulta en baja supervivencia, capacidad migratoria y fusogenicidad cuando estas células expandidas *in vitro* son trasplantadas a zonas de daño muscular *in vivo* (5, 43). Ejemplos de señalizaciones implicadas en la regulación de la expansión *vs* diferenciación de las células satélite de ratón incluyen los niveles de oxígeno presentes en la cámara de cultivo (44), cambios en el metabolismo celular (45-47), las efrinas y sus receptores (48), la ruta de los FGF (49), la ruta de Notch (50), SOX7 (51), TAZ/YAP (52) y la ruta TGFbeta/Smad (53), entre otros. Aun así, es importante señalar que la gran mayoría de estudios al respecto están realizados en modelos animales y su traslación a las células humanas es incierta (54).

En el ratón, es conocido que los cultivos de mioblastos retienen una subpoblación celular minoritaria (de ciclo celular más lento), que además es la responsable de la toma del trasplante una vez inyectados los cultivos en el animal receptor, mientras que

el resto de células entra en apoptosis en las primeras horas tras el trasplante (55). La pre-selección de estas células de ciclo lento previo al trasplante mejoró mucho los resultados del mismo (56).

Con respecto a los cultivos de mioblastos humanos, se sabe que estos cultivos heterogéneos son capaces de regenerar el músculo (57) e incluso generar células satélite humanas tras su trasplante a ratones (58). Laumonier y cols. proponen que los cultivos de mioblastos humanos retienen una población de células satélite "reserva", identificada como CD45-CD34-CD144-CD56+CD146+ tras 5-7 días de cultivo (59). Estas células son Pax7+MyoD-Myf5+ (es decir, similares a las células satélite quiescentes) y muestran mejor supervivencia que los mioblastos tras su trasplante a ratón.

En el mejor de los casos, se cree que los cultivos de mioblastos pueden tener éxito en la reparación de músculos pequeños como los afectados en la distrofia muscular oculofaríngea. Sin embargo, en los ensayos clínicos en marcha se están inyectando cantidades muy elevadas de células (cientos de millones; (60)), lo que indica que el potencial de regeneración de estos cultivos es claramente mejorable y que sería deseable obtener poblaciones celulares más puras que permitan reducir la expansión de los productos de terapia celular (para evitar los riesgos asociados a los largos periodos de expansión requeridos). Alternativamente o en paralelo, podría ser útil también la co-inyección de otras células precursoras que faciliten la regeneración, revascularización y reinnervación del área dañada.

Con estos antecedentes, es fácil comprender que determinar las condiciones ideales de aislamiento y expansión de precursores miogénicos humanos (bien las propias células satélite musculares o bien precursores intermedios entre éstas y los mioblastos), así como de otros precursores multipotentes presentes en el músculo humano, es un objetivo de gran importancia para la obtención de una(s) población(es) celular(es) que tenga(n) utilidad clínica en regeneración miogénica.

De manera consistente con los estudios previamente mencionados sobre la actividad aldehído deshidrogenasa en células satélite, la adición de ácido retinoico al medio de cultivo de mioblastos humanos parece favorecer la retención de características de célula madre y la ausencia de diferenciación gracias a un menor estrés oxidativo (61). En mioblastos humanos, se ha demostrado además que la inhibición de la ruta de TGFbeta por LY364947 y el uso de Geraldol y Bromopride aumentan la proliferación celular, mientras que los compuestos Pratol, Limonin e Idirubin aumentan la diferenciación (62).

Existen también aproximaciones distintas al cultivo clásico de mioblastos, en condiciones de adhesión a un soporte bidimensional. Así, el crecimiento de células derivadas de músculo de ratón y rata en cultivo tridimensional en forma de mioesferas flotantes enriquece las mismas en células Pax7+MyoD+, potencialmente células satélite musculares, que se diferenciaron *in vitro* a células contráctiles mononucleadas y contribuyeron a la regeneración de fibras musculares tras su trasplante a músculo de ratón (63). Estudios posteriores han demostrado que las mioesferas de ratón contienen al menos dos subpoblaciones celulares, una célula precursora miogénica (posiblemente célula satélite) que es ITGA7+Myf5+MyoD+Pax7+ y otra célula precursora no miogénica (posiblemente el precursor fibroadipogénico- FAP) caracterizada como PDGFRα+Sca-1+ (64, 65). Es importante señalar que ambas células precursoras son clave para el correcto funcionamiento del músculo, tanto en homeostasis como en regeneración, por lo que el cultivo de mioesferas tendría la ventaja añadida de proveer de al menos dos tipos de células precursoras, en vez de uno.

De hecho, es probable que el cultivo de mioesferas contenga también un tercer tipo de células precursoras, los precursores neurales, tal y como hemos demostrado previamente en la caracterización de esferas miogénicas aisladas de la dermis de ratón (66).

Aun así, el estudio de las miosferas derivadas de músculo humano está en su infancia. El primer estudio publicado con miosferas humanas presenta una metodología pobremente descrita, pero propone la existencia en las miosferas de una población de células precursoras “mesenquimales” definida como CD31-CD34-CD45-CD56-CD117-CD29+CD73+CD90+CD105+, posiblemente no miogénica en trasplante a músculo de ratón, aunque este hecho no llegó a investigarse (67). Un segundo artículo define la existencia de una célula precursora miogénica en mioesferas derivadas de biopsias obtenidas del músculo omohioideo en pacientes con carcinoma de cabeza y cuello (68). Las biopsias fueron de un mínimo de 100 mg para poder establecer el cultivo esferogénico, y se pudieron expandir durante 20 semanas (18 pases), aunque los cultivos comenzaron a crecer más lento tras la semana 16. Estas células precursoras, posiblemente células satélite se definen como CD34-CD45-Pax7+CD56+ALDH1+ y, sorprendentemente, se definen también como Oct3/4+Nanog+Sox2+, indicando su estado de pluripotencia en estas condiciones de cultivo. Sólo el 50% de estas células expresaron desmina y MyoD en pases tempranos, demostrando la heterogeneidad de la subpoblación a estudio. Una causa adicional de preocupación con este estudio es la posible contaminación con células cancerosas.

No existen más publicaciones, hasta donde conocemos, describiendo aproximaciones basadas en el cultivo tridimensional de miosferas a partir de músculo esquelético humano.

La regeneración muscular mediante protocolos de terapia celular basados en células precursoras miogénicas, vasculogénicas y que promuevan la reinnervación puede tener aplicación en diversas disfunciones del músculo esquelético y cardiaco, como las miopatías congénitas (69), las distrofias musculares y otras enfermedades degenerativas neuromusculares (70), la disfunción cardiaca (71), la pérdida de masa muscular volumétrica, la caquexia o la sarcopenia (72).

Sin embargo, algunas de estas enfermedades afectan a grandes masas de tejido muscular y esto compromete la viabilidad de su aproximación terapéutica por terapia celular. Algunos investigadores consideran que el tratamiento de grupos musculares de pequeño tamaño, como los afectados en la distrofia muscular oculofaríngea o la distrofia facioescapulohumeral, puede tener mayores posibilidades de éxito (5, 43). En este sentido, las deficiencias del esfínter urinario (73) y anal (74) pueden ser una excelente diana para este tipo de terapias, ya que el volumen de músculo a regenerar en los esfínteres es relativamente pequeño (5, 75) y el déficit muscular es accesible mediante aproximaciones quirúrgicas mínimamente invasivas. Para ello es necesario establecer los modelos adecuados de enfermedad, dada la gran variabilidad asociada a la patología observada en clínica (76).

Es importante tener en cuenta que las células satélite podrían presentar identidades divergentes en base a su localización axial/anatómica o el tipo de fibra muscular del que provienen (3). Así, por ejemplo, el represor transcripcional Prox1 es característico de las fibras musculares lentas y se expresa en las células satélite (77). En los protocolos clínicos publicados hasta el momento, las células miogénicas se han aislado de músculos diversos y no necesariamente idénticos o próximos (desde un punto de vista anatómico o de biología del desarrollo) a los del área prevista de aplicación (5). Sin embargo, no es descartable que el uso de células precursoras obtenidas de regiones similares a las regiones diana pueda tener ventajas asociadas en lo que respecta a la funcionalidad, capacidad de adaptación o supervivencia de las mismas. Algunos ejemplos similares en este sentido pueden ser (a) la obtención de mioblastos CD56+ del músculo piramidal en pacientes que van a sufrir una prostatectomía radical (78) y (b) la extracción de mioblastos del músculo recto abdominal (79), de manera que puedan ser utilizados posteriormente en casos de incontinencia urinaria.

La incontinencia urinaria (IU) es una patología prevalente, que afecta a más de 200 millones de mujeres y a un 17% de varones en todo el mundo; aunque su diagnóstico puede estar infraestimado. Datos en modelos animales sugieren que la inyección de células precursoras puede mejorar la función debilitada del esfínter (75). De hecho, los ensayos clínicos que han utilizado inyección autóloga de células precursoras musculares obtenidas a partir de biopsias de músculo demuestran que esta terapia es segura y presenta resultados aceptables. Sin embargo, hasta ahora la terapia celular para la regeneración del esfínter urinario no ha logrado consolidarse en la práctica clínica, ya que la estandarización de esta metodología experimental podría ser compleja. Por lo tanto, son necesarios nuevos enfoques de investigación y perspectivas para garantizar el uso de esta terapia como una opción de tratamiento real (73, 80). Es importante señalar que las células precursoras musculares utilizadas hasta el momento han sido cultivos de mioblastos autólogos expandidos. Por lo tanto, sería de esperar la existencia de porcentajes relativamente bajos de células satélite (o incluso células precursoras en estadios intermedios de diferenciación) en las suspensiones celulares heterogéneas utilizadas para tratar a estos pacientes. Por otro lado, los cultivos de mioblastos carecen de precursores vasculares y neurales que promuevan la revascularización y reinnervación del nuevo tejido.

La terapia celular aparece como una oportunidad única para estas enfermedades degenerativas, por lo que obtener una célula humana o mezcla de células con capacidad miogénica y regenerativa, y que se pueda trasplantar de manera autóloga o alogénica (en presencia de un régimen inmunosupresor), supondría un avance para el tratamiento específico de dichas enfermedades.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención proponen que el empleo de células precursoras multipotentes (miogénicas, vasculares y neurales) aisladas a partir del músculo cremáster presenta ventajas para la terapia celular en pacientes de incontinencia urinaria o anal con daño esfinteriano o en el tratamiento de grupos musculares de pequeño tamaño tales como la distrofia muscular oculofaríngea o la distrofia facioescapulohumeral, en tratamiento único o combinado con otros principios activos, o asociados a un dispositivo médico.

El cremáster es un músculo estriado (aunque carece de inserción en tendón) y de control voluntario que está entremezclado con abundantes fibras de tipo muscular liso.

Contiene predominantemente fibras de tipo 1 (lento), aunque también algunas de tipo IIB (muy rápidas), y cuya función en el adulto es contribuir a la termorregulación y a la protección de los testículos como una de las túnicas que forman el escroto. Gracias al reflejo cremastérico, se conocen bien sus propiedades electrofisiológicas. El músculo está densamente innervado y presenta numerosas placas motoras, lo que explica sus abundantes descargas espontáneas. En un estudio realizado en niños y niñas con hernia inguinal, no se observaron dimorfismos sexuales en el músculo cremáster entre ambos sexos, excepto el mayor diámetro de las fibras musculares en el género masculino, que es común a otros grupos musculares. En el desarrollo embrionario, el cremáster se genera a partir del gubernáculo, independientemente del músculo interno oblicuo del abdomen, siendo clave en el descenso testicular. Algunos autores proponen la transdiferenciación del músculo estriado cremastérico a partir de fibras de músculo liso, lo que puede ser común a otros músculos del tracto genitourinario como el rabdoesfínter.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Caracterización del músculo cremáster masculino. **A.** Localización anatómica del músculo cremáster. Se encuadra la zona de toma de biopsias. **B.** Sección histológica con tinción de hematoxilina-eosina donde se observan los paquetes de fibras musculares estriadas y lisas (b', detalle a mayor aumento). **C-D.** Por inmunofluorescencia, se observa que las fibras estriadas miosina positivas (MyHC+, verde) están rodeadas por membrana basal (Laminin+, rojo). Los núcleos se muestran en azul. **E-H**. Análisis de la composición de miosina en las fibras de tipo I (lentas, verde) y II (rápidas, verde). La laminina se muestra en rojo y los núcleos en azul. **I-J**. Cuantificación del número de fibras regenerativas mediante mionúcleos centrales. **K-L.** Cuantificación del número de fibras regenerativas mediante la detección de la expresión de MyHC3 embrionaria (verde). **M-N**. Cuantificación del número de células satélite in situ (Pax7+; verde).

Figura 2. Células precursoras multipotentes presentes en dermoesferas de ratón. **A.** Aspecto del cultivo en suspensión en esferas derivadas de la dermis del ratón. **B-E**. Tras su disgregación y adhesión al sustrato, se observa que las esferas contienen células precursoras vasculares de aspecto fusiforme (B), células adiposas (C), células precursoras neurales, con largas prolongaciones (D) y células precursoras miogénicas, que en algunos casos comienzan a formar sincitios multinucleados (E).

Figura 3. Detección de células precursoras miogénicas del músculo cremáster en mioesferas. **A.** Esquema temporal del cultivo celular en condiciones no adherentes. **B-C.** Imagen de contraste de fases de un cultivo celular a partir de biopsia de cremáster a día 0 y día 7. La flecha en el panel B señala restos no disociados de músculo. **D-F**. Análisis de la expresión de marcadores miogénicos por inmunofluorescencia. Se detectó tinción (en verde) para los marcadores Pax7 (D), MyoD1(E) y MyHC (F). Los núcleos se muestran en azul.

Figura 4. Detección de células precursoras neurogénicas y vasculogénicas del músculo cremáster en mioesferas. **A-E**. Análisis de la expresión de marcadores de precursores neurogénicos y vasculogénicos por inmunofluorescencia. Se detectó tinción en verde para el marcador CD56 (A), en rojo para p75NTR (B) y en azul (C) para los núcleos (DAPI). El panel D muestra los paneles A-B superpuestos, y E la superposición de A-B-C. Los siguientes símbolos muestran las células neurogénicas (p75NTR+CD56+, asterisco), las células vasculogénicas (p75NTR+CD56-, flecha) y las células p75NTR-CD56+ (cabeza de flecha).

Figura 5. Diferenciación in vitro de las células precursoras del cremáster en condiciones miogénicas. A. Diagrama temporal de formación de miotubos a partir de esferas disgregadas. **B.** Imagen en contraste de fases del cultivo de esferas disgregadas a día 0 en medio de diferenciación. **C.** Imagen en contraste de fase de los miotubos multinucleados formados tras 7 días en cultivo. **D-G.** Caracterización de los miotubos mediante inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-MyHC (verde) y Pax7 (verde). Los núcleos se muestran en azul. **H.** Análisis de la expresión de genes determinantes para la miogénesis (*Pax7*, *Myf5*, *MyoD1*, *Myogenin*, *MyHC3* y *MyHC2*) mediante retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Se muestran los resultados obtenidos de manera relativa al gen control *Tbp*.

Figura 6. Capacidad regenerativa in vivo de las células precursoras del cremáster. **A.** Esquema experimental. **B.** Inmunofluorescencia anti-hLaminA/C (específica de músculo humano, verde). Los núcleos se muestran en azul. **C.** Inmunofluorescencia anti-hLaminA/C (verde) y anti-hDystrophin (también específica de músculo humano, rojo). **E-F.** Cuantificación del número de células hLaminA/C+ (verdes) que co-expresa el marcador de las células satélite Pax7 (rojo). Los núcleos se muestran en azul.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención proponen que el empleo de células precursoras multipotentes (miogénicas, vasculares y neurales) aisladas a partir del músculo cremáster presenta ventajas para la terapia celular en pacientes de incontinencia urinaria o anal con daño esfinteriano o en el tratamiento de grupos musculares de pequeño tamaño tales como la distrofia muscular oculofaríngea o la distrofia facioescapulohumeral, en tratamiento único o combinado con otros principios activos, o asociados a un dispositivo médico.

Hasta el momento no se ha empleado el músculo cremáster como fuente de células precursoras. La principal función del cremáster es la bajada del testículo hasta el anillo inguinal mediante su contracción, por lo que el obtener una biopsia no supondría a los pacientes adultos un importante daño funcional en dicha zona y podría emplearse como fuente de células multipotentes para el estudio y tratamiento de pacientes con desórdenes traumáticos o degenerativos que afecten a grupos musculares.

Por lo tanto, los autores de la presente invención muestran que el músculo cremáster representa una fuente valiosa para aislar células precursoras multipotentes con capacidad de sustituir estructuralmente y bioquímicamente:

i) la pared muscular del esfínter urinario, anal, u otros órganos o tejidos que incluyan fibras o haces de músculo estriado,

ii) sustitución de células miogénicas del esfínter urinario u anal dañadas o afuncionales o del músculo estriado dañado en esta u otras patologías musculares,

iii) la recuperación del músculo estriado, del esfínter urinario, o de otros órganos, como por ejemplo el esfínter anal, o puede tener aplicación además en diversas disfunciones del músculo esquelético y cardiaco, como las miopatías congénitas, las distrofias musculares y otras enfermedades degenerativas neuromusculares, la disfunción cardiaca, la pérdida de masa muscular volumétrica, la caquexia o la sarcopenia,

iv) sustitución de células miogénicas utilizadas como parte constituyente de órganos generados por técnicas de ingeniería tisular como la uretra, tráquea y otros tejidos y órganos,

v) sustitución de células vasculogénicas que promuevan la revascularización del tejido dañado,

vi) sustitución de células neurogénicas que promuevan la reinnervación del tejido dañado;

Además, desarrollan una metodología para lograr la colonización y diferenciación miogénica completa en formulaciones basadas en diferentes biomateriales tales como agarosa, alginatos, andamios basados en matriz extracelular, colágeno, Cultrex, ferrogeles, fibrina, fibrina/agarosa, fibrinógeno, fibronectina, gelatina, ácido hialurónico (HA), hidrogeles, laminina, Matrigel, plasma, plasma rico en factores de crecimiento, policaprolactona (PCL), ácido poliglicólico (PGA), polietilénglicol (PEG), PEG-fibrinógeno, poliglicerol sebacato (PGS), ácido poliláctico-glicólico (PLGA), ácido poliláctico (PLLA), quitosano (CHT), polímeros acrílicos como PEA, PHEA, PMA y otros, láminas de seda, matriz extracelular de órganos descelularizados como el músculo y otros tejidos y órganos como la submucosa, utilizando células precursoras aisladas a partir del músculo cremáster. Esta lista se proporciona sólo a modo de ilustración, y no se pretende que sea limitante.

Los autores de la presente invención son los primeros que han desarrollado un método para obtener células precursoras multipotentes aisladas del músculo cremáster.

CÉLULAS Y POBLACIONES CELULARES DE LA INVENCIÓN

Por tanto, un primer **aspecto** de la invención se refiere a una composición que comprende una población celular de células precursoras multipotentes derivadas o provenientes del músculo cremáster humano, de ahora en adelante composición de células precursoras multipotentes de la invención, donde dicha población, a su vez, representa una población heterogénea de células que incluye diversos tipos de células precursoras, tal y como se ilustra en la figura 2, como células precursoras miogénicas, células precursoras vasculogénicas, y células precursoras neurogénicas. Se hace notar que la población celular referida, de ahora en adelante población celular de células precursoras multipotentes, debe comprender al menos una célula precursora multipotente derivada o proveniente del músculo cremáster humano. En una realización preferida dicha población celular comprende al menos un 20%, preferiblemente un 30%, más preferiblemente un 40%, y aún más preferiblemente un 50%, 60%, 80%, 90%, 95%, o un 99% de celulas precursoras multipotentes derivadas o provenientes del músculo cremáster humano.

Para conseguir dichas células del primer aspecto de la invención, se parte de biopsias

de músculo cremáster, se trocea dicha biopsia de tejido en fragmentos pequeños y, una vez disgregado el tejido, se obtienen las células precursoras multipotentes del músculo cremáster, y a continuación se cultivan (ver ejemplos de la invención).

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende mioesferas obtenidas de cultivos de una población celular de células aisladas del músculo cremáster del primer aspecto de la invención. Para ello y tal y como se ilustra en los ejemplos de la invención, se re-suspende la composición obtenida del primer aspecto de la invención en medio de cultivo para condiciones no adherentes, llamado medio de proliferación (medio Neurobasal™ A suplementado con 2% de suplemento B27 50X, 1% de L-glutamina 200 mM y 1% de solución de penicilina/estreptomicina 100X) y se siembran en placas no tratadas para obtener un cultivo de mioesferas. El precipitado celular resultante del aislamiento celular se resuspende en 1 mL de medio para cultivo en suspensión y se realiza un recuento y control de la viabilidad celular antes de traspasarlo a un pocillo de las placas no tratadas de 6 pocillos, donde se añade más medio para cultivo en suspensión hasta 5 mL. Si el recuento de células viables resulta ser menor que 500.000 células/mL, estas se traspasan a un pocillo de menor tamaño, de placas no tratadas de 12 pocillos, y se ajustan los volúmenes de medio y de factores en proporción a lo establecido. Estas placas evitan la adhesión de las células y favorecen la formación de esferas celulares. En este punto se añaden directamente al pocillo en las concentraciones indicadas los factores de crecimiento (Suplemento de crecimiento bajo en suero (LSGS; concentración final del 2% (1X), Factor de crecimiento fibroblástico básico recombinante de rata (rrFGF2; 80 ng/mL), Factor de crecimiento epidérmico recombinante de rata (rrEGF; 40 ng/mL). Los primeros 3 días se cambia el medio por completo mediante centrifugación (5 minutos a 1500 rpm) para eliminar restos celulares y seleccionar las células viables, y se añaden los factores de crecimiento de nuevo cada vez. Después, estos lavados se hacen cada 2 días y el cultivo se mantiene hasta los 7 o 9 días, cuando la formación de esferas celulares ya es muy notoria. A partir del día 1 tras la siembra, se apreciarán esferas celulares. Un análisis de la expresión de marcadores miogénicos por inmunofluorescencia de las células que conforman dichas esferas, debe detectar los marcadores Pax7 y MyoD1, así como células MyHC+ (Figura 3). Esto es importante, dado que, las células precursoras miogénicas presentes en las esferas celulares se caracterizan porque son positivas para marcadores de célula satélite (Pax7) pero a su vez comienzan a expresar marcadores tempranos de diferenciación (MyoD1; (21, 35)). La expresión de isoformas de miosina (marcadas por MyHC) en células precursoras en estado mononucleado es también indicativa del estado precursor miogénico de las

mismas. Por lo tanto, en una realización preferida del primer o segundo aspecto de la invención, la composición que comprende células precursoras multipotentes aisladas del músculo cremáster humano del primer aspecto de la invención o la composición que comprende esferas obtenidas de cultivos de células aisladas del músculo cremáster del primer aspecto de la invención, se caracteriza porque dicha población celular es positiva para Pax7, MyoD1 y MyHC.

Aún más preferiblemente, en las esferas obtenidas de cultivos de células aisladas del músculo cremáster del primer aspecto de la invención se observan los marcadores p75NTR y CD56 (Figura 4).

Es importante señalar que en esta memoria se entiende por "célula precursora miogénica", a un conjunto probablemente heterogéneo de células que, en condiciones de cultivo específicas, alcanzan distintos estadios de diferenciación temprana siendo capaces de proliferar y mantener las capacidades de diferenciación a célula muscular. Estas células tendrían mejores capacidades de supervivencia, migración y toma en trasplantes a músculos dañados, en comparación con células más diferenciadas como los mioblastos. Es decir, la composición que comprende células precursoras multipotentes aisladas del músculo cremáster humano del primer aspecto de la invención así como la composición que comprende esferas obtenidas de cultivos de células aisladas del músculo cremáster del primer aspecto de la invención, se caracteriza por comprender dicho conjunto heterogéneo de células que, en condiciones de cultivo específicas, alcanzan distintos estadios de diferenciación temprana siendo capaces de proliferar y mantener las capacidades de diferenciación a célula muscular, denominado "célula precursora miogénica". Por tanto, la composición del primer aspecto de la invención así como la composición del segundo aspecto de la invención son especialmente útiles para llevar a cabo trasplantes en músculos dañados.

Por otro lado, en la presente invención se entiende por "marcador" a una proteína que distingue una célula (o grupo de células) de otra célula (o grupo de células). Por ejemplo, una proteína que se expresa en la superficie de células miogénicas pero no en otras células de una población celular actúa como proteína marcadora para las células precursoras miogénicas. "Positivo" significa que la célula expresa naturalmente el marcador. Para considerar que el marcador es expresado, debe estar presente a un "nivel detectable". En esta memoria, por "nivel detectable" se entiende que el marcador puede detectarse por una de las metodologías estándar, tales como PCR, blotting, inmunofluorescencia o FACS. Se considera que un gen es expresado

por una célula de la invención si puede ser razonablemente detectada tras 20 ciclos, preferiblemente 25 ciclos, y más preferiblemente 30 ciclos de PCR, que corresponde a un nivel de expresión en la célula de al menos 100 copias por célula. Se considera que un marcador no es expresado por una célula de la invención, si la expresión no puede ser detectada a un nivel de alrededor de 10 – 20 copias por célula. Entre estos niveles de positivo/negativo, la célula puede ser débilmente positiva para un determinado marcador.

Por otro lado, la población celular de la invención es positiva para un determinado marcador si, al menos, el 20% de las células de la población muestra una expresión detectable del marcador, preferiblemente del 70%, 80%, 90%,95%, y mucho más preferiblemente, del 98%. A veces, el 99% o el 100% de las células de la invención muestran una expresión detectable del marcador. Como en el caso de las células, la expresión puede ser detectada, por ejemplo pero sin limitarse, mediante técnicas de PCR, usando FACS (fluorescence activated cell sorting), o mediante inmunohistoquímica empleando anticuerpos específicos.

El término “expresión natural”, o “expresa naturalmente” significa que las células no han sido manipuladas por tecnología recombinante, de ninguna forma, esto es, por ejemplo, que las células no han sido inducidas artificialmente a expresar estos marcadores o a modular la expresión de estos marcadores mediante la introducción en las células de material exógeno, como la introducción de promotores heterólogos, u otras secuencias unidas operativamente a cualquiera de los genes endógenos, o mediante la introducción de genes exógenos.

En una realización más preferida de este aspecto de la invención, la población de células precursoras miogénicas presentes en la composición del primer o segundo aspecto de la invención deriva de las células satélite del cremáster y mantiene las capacidades de célula madre gracias a su autorrenovación en el cultivo de mioesferas descrito en el segundo aspecto de la invención, equivalente a lo que se conoce como “célula satélite reserva” en los cultivos tradicionales de mioblastos.

En esta memoria se entiende por célula “satélite del cremáster” a la célula madre procedente del músculo cremáster, que posee la capacidad de regenerar músculo a lo largo de la vida del individuo y diferenciarse en células precursoras miogénicas.

Por otro lado, en la presente invención, se llevó a cabo la obtención de células miogénicas a partir de la formación de mioesferas presentes en el cultivo de proliferación del segundo aspecto de la invención. Para ello, se cambiaron las

condiciones de cultivo para obtener una diferenciación miogénica (Figura 5). Las mioesferas se disgregaron con Tripsina-EDTA 0,25% durante 5 minutos a 37ºC para después sembrar las células precursoras sobre una matriz extracelular (ECM) natural que favorece la adhesión y la diferenciación celular (66, 88), compuesta de extracto de membrana basal Cultrex® (2,77 mg/mL en concentración final), Netrina-4 (0,83 µg/mL), Netrina-G1a (0,83 µg/mL) y ácido hialurónico de bajo peso molecular (2,5 mg/mL) en PBS (pH 7,4). La solución de matriz extracelular se preparó teniendo en cuenta la concentración del extracto de membrana basal Cultrex® (Cultrex), dependiente del lote del producto. En base a este dato del volumen final se ajustaron los volúmenes del resto de los compuestos. En todos los casos se preparó una solución de matriz extracelular a una dilución 1:3, preparando primero una mezcla para disolver los reactivos (equivalente al 1 de la dilución 1:3) y después añadiendo el volumen necesario de PBS (pH 7,4) como diluyente a la mezcla para obtener la solución final (equivalente al 2 resultante del cálculo de la dilución 1:3). En función del experimento a realizar se preparó una matriz extracelular con todos los reactivos mencionados o una matriz extracelular sin la presencia de Netrina-4 y Netrina-G1a, ajustando en este último caso el volumen de PBS (pH 7,4) que se utilizaría primero para disolver y mezclar los compuestos. Dado que los compuestos utilizados son termosensibles, con el fin de mantener su integridad y evitar una polimerización prematura, todos los reactivos se descongelaron gradualmente y se mantuvieron en hielo durante todo el proceso junto a la solución de matriz extracelular en preparación. De modo que tras reconstituir y descongelar todos los compuestos se preparó la solución de mezcla en un Falcon® de 50 mL que se mantuvo en hielo, y seguidamente se añadió el PBS (pH 7,4) como diluyente. Esta solución final fue agitada suavemente con cuidado de no formar burbujas para obtener una mezcla homogénea. A continuación, la matriz extracelular recién preparada se depositó en forma de gota (300 µl/pocillo) en placas estériles de 4 o 24 pocillos en los que previamente se habían colocado cubreobjetos autoclavados y se esparció inclinando la placa para formar una película uniforme. Una vez depositada la matriz, las placas se mantuvieron durante 24 horas a 37ºC. Transcurrido este tiempo se retiró el exceso de líquido acumulado en los pocillos y se dejaron secar en la campana de flujo laminar durante 15 minutos para así obtener el sustrato deseado. Partiendo de las miosferas, una vez eliminado el medio utilizado para el cultivo en suspensión mediante una centrifugación de 5 minutos a 1500 rpm, las esferas agregadas en pellet fueron resuspendidas en 1 mL de solución de Tripsina-EDTA 0,25% y disgregadas manteniéndolas unos 5-7 minutos a 37ºC para obtener una suspensión de células únicas con el objetivo de poder contarlas, depositarlas separadamente y conseguir una diferenciación más homogénea. La

acción enzimática se detuvo diluyendo la solución con PBS (pH 7,2) y eliminándolo tras una centrifugación de 5 minutos a 1500 rpm para luego resuspender el pellet de células en 1 mL de medio para cultivo en adhesión y contar el número de células viables. Con esto se distribuyó la misma cantidad de células en cada pocillo, por lo general en placas de cultivo de 4 pocillos, poniendo 79.000 células por cm2 (150.000 células por pocillo); donde previamente se había depositado el sustrato que facilita la adhesión y promueve la diferenciación celular (ECM) y se había añadido medio para este cultivo hasta 500 µl. Estas células se mantuvieron así en la incubadora a 37ºC y con 5% de CO2, dejándolas reposar los primeros 2 días para después ir renovando la mitad del medio con medio fresco cada 2 días. Durante este cultivo de diferenciación se retiraron los factores de crecimiento y al medio de proliferación se le añadió un 10% de suero fetal bovino. En estas condiciones, al cabo de 7 días de cultivo, se obtuvo una diferenciación miogénica con generación de miotubos multinucleados.

Por lo tanto, un tercer aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende una población celular de células miogénicas derivadas de la formación de las mioesferas presentes en el cultivo de proliferación del segundo aspecto de la invención o de una composición celular que comprende una población celular de células precursoras multipotentes derivadas o provenientes del músculo cremáster humano. Tal y como se muestra en los ejemplos de la presente invención, dicha composición celular de células miogénicas se caracteriza porque comprende una población celular positiva para los genes miogénicos Pax7, Myf5, MyoD1, Myogenin, MyHC3 y MyHC2, en mayor cantidad comparada con un control negativo (tales como biopsias tomadas de la misma región pero no musculares). Se hace notar que la población celular referida, de ahora en adelante población celular de células miogénicas, debe comprender al menos una celula miogénica derivada o proveniente del músculo cremáster humano. En una realización preferida la población celular comprende al menos un 20%, preferiblemente un 40%, y aún más preferiblemente un 50%, 60%, 80%, 90%, 95%, o un 99% de células miogénicas derivadas o provenientes del músculo cremáster humano.

Por otro lado, también se pueden obtener células precursoras vasculogénicas o neurogénicas a partir de la formación de las mioesferas presentes en el cultivo de proliferación del segundo aspecto de la invención o a partir de una composición celular que comprende células precursoras multipotentes derivadas o provenientes del músculo cremáster humano.

En este sentido, y con dicho propósito se hace notar que un cuarto aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende una población celular de células precursoras vasculogénicas derivadas de la formación de las mioesferas presentes en el cultivo de proliferación del segundo aspecto de la invención o de una composición celular que comprende una población celular de células precursoras multipotentes derivadas o provenientes del músculo cremáster humano. Dicha composición celular se caracteriza porque comprende una población celular positiva para: p75NTR, SOX2, PAX3, DLK1, RGS5, AOC3, ITGA7, ECRG4 y negativa para el marcador CD56 (Figura 4). Se hace notar que la población celular referida, de ahora en adelante población celular de células precursoras vasculogénicas, debe comprender al menos una célula precursora vasculogénica derivada o proveniente del músculo cremáster humano. En una realización preferida la población celular comprende al menos un 20%, preferiblemente un 40%, y aún más preferiblemente un 50%, 60%, 80%, 90%, 95%, o un 99% de células precursoras vasculogénicas derivadas o provenientes del músculo cremáster humano.

Adicionalmente, un quinto aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende una población celular de células precursoras neurogénicas derivadas de la formación de las mioesferas presentes en el cultivo de proliferación del segundo aspecto de la invención o de una composición celular que comprende una población celular de células precursoras multipotentes derivadas o provenientes del músculo cremáster humano. Dicha composición celular se caracteriza porque comprende una población celular positiva para: p75NTR, SOX2, PAX3, CD56, SOX10, ERBB3, L1CAM, CDH2, CDH19, PMP22, PLP1, DHH y negativa para el marcador SOX9 (Figura 4). Se hace notar que la población celular referida, de ahora en adelante población celular de células precursoras neurogénicas, debe comprender al menos una célula precursora neurogénica derivada o proveniente del músculo cremáster humano. En una realización preferida la población celular comprende al menos un 20%, preferiblemente un 40%, y aún más preferiblemente un 50%, 60%, 80%, 90%, 95%, o un 99% de células precursoras neurogénicas derivadas o provenientes del músculo cremáster humano.

Si se desea, las células presentes en cualquiera de las composiciones de la invención pueden ser modificadas genéticamente por cualquier método convencional incluyendo, a modo ilustrativo, no limitativo, procesos de transgénesis, deleciones o inserciones en su genoma que modifiquen la expresión de genes que sean importantes para sus propiedades básicas (proliferación, migración, diferenciación, etc.), o mediante la inserción de secuencias de nucleótidos que codifiquen proteínas de interés como, por

ejemplo, proteínas con propiedades terapéuticas. Por tanto, en otra realización preferida, las células presentes en cualquiera de las composiciones de la invención han sido modificadas genéticamente.

Por otro lado, si se desea, las células presentes en cualquiera de las composiciones de la invención pueden expandirse clonalmente usando un procedimiento adecuado para clonar poblaciones celulares. Por ejemplo, una población proliferada de células puede recogerse físicamente y sembrarse en una placa separada (o los pocillos de una placa "multi-pocillo"). Otra opción es que las células pueden subclonarse en una placa "multi-pocillo" en una relación estadística para facilitar la operación de colocar una única célula en cada pocillo (por ejemplo, desde aproximadamente 0,1 a cerca de una célula/pocillo o incluso de unas 0,25 a 0,5 células/pocillo, como por ejemplo 0,5 células/pocillo). Por supuesto, las células pueden clonarse a baja densidad (por ejemplo, en una placa de Petri u otro sustrato adecuado) y aislarlas de otras células usando dispositivos tales como anillos de clonación. La producción de una población clonal puede expandirse en cualquier medio de cultivo adecuado. En cualquier caso, las células aisladas pueden cultivarse hasta un punto adecuado cuando su fenotipo de desarrollo pueda evaluarse.

En una realización más preferida de este aspecto, la población celular de cualquiera de los aspectos de la invención es una población aislada.

El término "aislada" indica que la célula o la población celular de la invención a la que se refiere, no se encuentran en su ambiente natural. Esto es, la célula o la población celular ha sido separada de su tejido circundante. Particularmente significa que dicha célula o la población celular está sustancialmente exenta (libre) de otras células normalmente presentes en el tejido, o en derivado del mismo, de un sujeto del que se haya extraído el músculo para el aislamiento de dicha célula o la población celular. En general, una célula está esencialmente libre de otras células presentes en el entorno de la misma cuando se separa de, al menos, el 60%, preferentemente de al menos el 80%, preferentemente de, al menos, el 90%, más preferentemente de, al menos, el 95%, aún más preferentemente de, al menos, el 96%, 97%, 98% o incluso 99%, de otras células presentes normalmente en dicho entorno.

También se refiere a las células o poblaciones celulares que han sido aisladas del organismo en el que se originan. El término también incluye células que han sido aisladas de un organismo y reintroducidas en el mismo organismo, o en otro.

MÉTODO DE OBTENCIÓN DE CÉLULAS PRECURSORAS MULTIPOTENTES DE LA INVENCIÓN

En un sexto aspecto de la invención, la composición del segundo aspecto de la invención se obtiene por un método, de ahora en adelante método de obtención de células precursoras multipotentes de la invención, que comprende

a) disgregar tejido biopsiado del músculo cremáster,

b) separar las células intactas (viables) de los restos celulares

c) cultivar las células del paso (b) en suspensión hasta la formación de esferas (5-8 días).

La disgregación del paso (a) puede llevarse a cabo por distintos métodos, entre ellos métodos mecánicos, métodos enzimáticos, o una combinación de ambos. Entre las enzimas empleadas se encuentran: acutasa, colagenasa (de diversos tipos, como A, I, II, IV, ó XI; o mezclas de las mismas), dispasa, DNasa I, elastasa, hialuronidasa, liberasa, papaína, pronasa, tripsina-EDTA, TrypLE, y muy habitualmente combinaciones de las anteriores. Esta lista se proporciona sólo a modo de ilustración, y no se pretende que sea limitante. Preferiblemente se emplea colagenasa tipo I o mezclas comerciales de distintas colagenasas como la liberasa.

La separación del paso (b) se puede llevar a cabo por distintos métodos, entre ellos, pero sin limitarse a: filtración, decantación, centrifugación, métodos de separación magnéticos o basados en FACS, etcétera.

El paso (c) se realiza en un medio de proliferación que no contiene suero y en condiciones de no adherencia al sustrato. Este medio al menos contiene: un medio de cultivo “base” como por ejemplo Neurobasal y factores de crecimiento de células precursoras que pueden incluir LSGS, FGF-2 y EGF, entre otros. Los días de cultivo entre pase y pase varían entre 4 y 8 días, dependiendo de diversos factores, y preferiblemente al menos 7 días para obtener esferas de tamaño adecuado para su manipulación posterior.

El medio de cultivo “base” puede ser, preferiblemente pero sin limitarnos, un medio diseñado para el mantenimiento y la maduración a largo plazo de poblaciones de células neuronales prenatales y embrionarias puras, como el medio Neurobasal. Más preferiblemente el medio basal está suplementado con B27, y aún más preferiblemente con L-glutamina y una solución antibiótica.

Entre el paso (b) y (c) puede haber, preferiblemente, un paso de centrifugación para obtener un precipitado celular.

Las esferas de la composición del segundo aspecto de la invención se pueden seleccionar y disgregar para inyectarlas directamente, por ejemplo para el tratamiento de la incontinencia urinaria, se pueden utilizar directamente en terapia en forma de miosferas (sin disgregación celular) o se pueden diferenciar a mioblastos o células musculares estriadas para utilizar los constructos musculares como agentes terapéuticos o por su utilidad en el cribado de moléculas, biológicos u otros agentes terapéuticos cuya diana sea el músculo esquelético. En estos últimos casos sería preferible emplear las células con medios de soporte, como una matriz.

En otra realización preferida de este aspecto, y con el objeto de proporcionar la composición del tercer aspecto de la invención, el método de obtención de células precursoras multipotentes de la invención además comprende:

d) diferenciar las células precursoras multipotentes de las esferas del paso c)

Las células precursoras se pueden diferenciar en base a diversos protocolos existentes en la literatura, o bien de manera idéntica a como se diferencian los cultivos de mioblastos.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la diferenciación del paso d) es a mioblastos.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la diferenciación del paso d) es a miotubos.

Es preferible emplear células precursoras multipotentes del cremáster que células satélite, ya que las células satélite son difíciles de cultivar y el número de células obtenido es pequeño, y además esos cultivos no presentan capacidad vasculogénica ni neurogénica. Las células precursoras miogénicas del cremáster tienen a su vez capacidad de proliferar y dar lugar a mioblastos, o de mantenerse como células precursoras en cultivo gracias a su capacidad de autorrenovación.

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DE LA INVENCIÓN

Un séptimo aspecto de la invención se refiere a una composición tal y como se ha definido ésta en cualquiera de los aspectos o realizaciones reseñados con

anterioridad, donde dicha composición .es una composición farmacéutica (de aquí en adelante “la composición farmacéutica de la presente invención”). Preferiblemente, la composición farmacéutica de la presente invención está referida a las composiciones de cualquiera de los aspectos primero, segundo o tercero de la invención.

Más preferiblemente la composición farmacéutica de la presente invención comprende una combinación de cualquiera de las composiciones de la invención. Aún más preferiblemente la composición farmacéutica comprende una combinación de la composición del tercer, cuarto y quinto aspecto de la invención.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica de la presente invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden utilizar en un método de tratamiento de manera aislada o junto con otros compuestos farmacéuticos. Por tanto, en otra realización más preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica de la presente invención además comprende otro principio activo.

En este documento el término "componente activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "componente activo" o "componente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporciona una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, la curación, la mitigación, el tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecte a la estructura o función del cuerpo humano u otros animales. Ejemplos de componentes activos de origen biológico incluyen a factores de crecimiento, hormonas y citoquinas. En el estado del arte se conocen una variedad de agentes terapéuticos y podrían ser identificados por sus efectos. Determinados agentes terapéuticos son capaces de regular la proliferación y la diferenciación celular. Como ejemplo se incluyen nucleótidos, fármacos quimioterapéuticos, hormonas, proteínas no específicas (que no son anticuerpos), oligonucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos anti sentido que se unen a una secuencia de ácido nucleído diana (por ejemplo, secuencia de ARN), péptidos y peptidomiméticos. También podrían actuar como componente activo otras células.

En otra realización preferida de este aspecto, la composición farmacéutica de la presente invención comprende, adicionalmente, uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

El término "excipiente farmacéuticamente aceptable" tal como se utiliza aquí se refiere al hecho de que debe ser aprobado por una agencia reguladora de un gobierno federal o un gobierno nacional o uno de los enumerados en la Farmacopea de Estados Unidos o de la Farmacopea Europea, o alguna otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales y en los seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, excipiente, vehículo o adyuvante con el que las células madre, células progenitoras o células diferenciadas de la invención, las células de la invención, así como las células de la población de células de la invención, deben ser administradas; obviamente, dicho vehículo debe ser compatible con las células. Ejemplos ilustrativos, dicho vehículo incluyen cualquier vehículo fisiológicamente compatible, por ejemplo, soluciones isotónicas (por ejemplo, solución salina estéril (0,9% NaCl), solución tampón fosfato salino (PBS), solución de Ringer-lactato, etc), complementados opcionalmente con suero, preferentemente con suero autólogo; medios de cultivo (por ejemplo, DMEM, RPMI, McCoy, etc), o, preferentemente, un medio sólido, semisólido, gelatinoso o viscoso apoyo, tales como el colágeno, colágeno-glicosamino-glicano, fibrina, cloruro de polivinilo, ácidos poli-aminoácidos, tales como polilisina, o poliornitina, hidrogeles, agarosa, sulfato de dextrano de silicona. Por otra parte, si se desea, el medio de soporte puede en realizaciones especiales, contener, factores de crecimiento u otros agentes. Si el soporte es sólido, semisólido, o gelatinoso, las células pueden introducirse en la fase líquida de un vehículo que se trata posteriormente de manera que se convierte en una fase más sólida. En alguna realización de la invención en el que el vehículo tiene una estructura sólida, dicho vehículo se puede configurar de acuerdo con la forma de la lesión, como por ejemplo en forma de anillo para el tratamiento de la incontinencia urinaria debido a daño en el músculo estriado del esfínter urinario externo.

La composición farmacéutica de la invención puede, si se desea, contener también, cuando sea necesario, aditivos para aumentar y/o controlar el efecto terapéutico deseado de las células, por ejemplo agentes de tamponamiento, agentes de superficie activos, conservantes, etc. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede comprender un medio de cultivo celular que mantenga la viabilidad de las células. El medio estará generalmente libre de suero con el fin de evitar provocar una respuesta inmune en el receptor. El transportista será generalmente tampón y/o libre de pirógenos. Además, para la estabilización de la suspensión celular, es posible añadir agentes quelantes de metales. La estabilidad de las células en el medio líquido de la composición farmacéutica de la invención puede ser mejorada mediante la adición de sustancias adicionales, tales como, por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, etc.

Dichas sustancias farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizadas en la composición farmacéutica de la invención son generalmente conocidas por un experto en la técnica y normalmente se utilizan en la producción de composiciones celulares. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "*Remington's Pharmaceutical Sciences*" por E.W. Martin. Se puede encontrar información adicional sobre dichos vehículos en cualquier manual de la tecnología farmacéutica (es decir, de farmacia galénica).

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar en una forma farmacéutica de administración adecuada. Por lo tanto, la composición farmacéutica de la invención se formulará de acuerdo con la forma de administración elegida. La formulación se adaptará a la forma de administración. En una realización especial, la composición farmacéutica se prepara en una forma de dosificación líquida, sólida o semisólida, por ejemplo, en forma de suspensión, con el fin de ser administrada mediante la implantación, inyección o infusión al sujeto que necesita tratamiento. Como ejemplo, de manera ilustrativa y no limitativa, se presenta una posible formulación de la composición farmacéutica de la invención en una suspensión estéril con un excipiente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una solución isotónica, por ejemplo, solución tampón fosfato salino (PBS), o cualquier otro vehículo adecuado, farmacéuticamente aceptable, para la administración a un sujeto por vía parenteral, aunque otras vías de administración también pueden ser utilizadas.

La administración de la composición farmacéutica de la invención al sujeto que lo necesite se llevará a cabo utilizando medios convencionales. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención puede ser administrada al sujeto por vía parenteral mediante dispositivos adecuados, tales como jeringas, catéteres, trocares, cánulas, etc. En todos los casos, la composición farmacéutica de la invención se puede administrar usando equipos, aparatos y los dispositivos adecuados para la administración de composiciones celulares y conocidas por una persona experta en la técnica. En otra realización, la administración directa de la composición farmacéutica de la invención para el sitio que se pretende beneficiar podría ser ventajosa. En este método, la administración directa de la composición farmacéutica de la invención para el órgano o tejido deseado se puede lograr mediante la administración directa (por ejemplo, por inyección, etc) en la superficie externa del órgano o tejido afectado por la inserción de un dispositivo adecuado, por ejemplo, una cánula adecuada, por infusión (incluyendo mecanismos de flujo inverso) o por otros medios descritos en esta patente o conocidos en el estado del arte.

La composición farmacéutica de la invención puede almacenarse hasta el momento de su aplicación por los métodos convencionales conocidos por el experto en la materia. Para el almacenamiento a corto plazo (menos de 6 horas), la composición farmacéutica de la invención puede ser almacenada a temperatura ambiente o inferior, en un recipiente sellado, suplementado o no con una solución de nutrientes. Para almacenamiento a medio plazo (menos de 48 horas) se lleva a cabo preferiblemente entre 2-8ºC, y en la composición farmacéutica de la invención se incluye, además, una solución isosmótica tamponada en un recipiente que esté hecho o recubierto con un material que evite la adhesión celular. El almacenamiento a más largo plazo se lleva a cabo preferiblemente por criopreservación y almacenado en condiciones que promuevan la conservación de la función celular.

En una realización concreta, la composición farmacéutica de la invención se puede utilizar en terapia combinada. Estos medicamentos adicionales podrían formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, ser suministrado en forma de una composición separada para su administración simultánea o sucesiva (secuencial en el tiempo) a la administración de la composición farmacéutica de la invención.

DISPOSITIVO MÉDICO Y TEJIDOS QUE COMPRENDEN CÉLULAS PRECURSORAS MULTIPOTENTES

En una realización adicional, las composiciones de la invención (cualquiera de las composiciones descritas en los aspectos primero a quinto de la presente invención) pueden ser implantadas o inyectadas en el paciente junto con un componente material de apoyo. Esto podría asegurar que las células permanezcan en el lugar adecuado dentro del paciente. En otra realización preferida, el material de soporte es de origen natural o sintético. En una realización más preferida, el material de soporte de origen natural se selecciona de la lista que consiste en: seda, membranas serosas mesentéricos bovinas descelularizadas, pericardio bovino descelularizado y combinaciones de los mismos. En una realización aún más preferida, el material de soporte es hilo con una estructura de monofilamento o multifilamento, y en una realización particular, el material de soporte es una lámina de nanofibras de seda.

Otros ejemplos de material de soporte incluyen como base el colágeno, fibrina, laminina, fibronectina y un material artificial, o combinaciones de los mismos. Esta lista se proporciona sólo a modo de ilustración, y no se pretende que sea limitante. Para el experto en la técnica sería evidente utilizar cualquier combinación de uno o más componentes para formar la matriz.

En una realización adicional, las células de las composiciones de la invención pueden estar contenidas dentro de una microesfera. Dentro de esta realización, las células pueden encapsularse dentro del centro de la microesfera. También dentro de esta realización, las células pueden estar incrustadas en el material de la matriz de la microesfera. El material de la matriz puede incluir cualquier polímero biodegradable adecuado, incluyendo pero no limitado a, alginatos, polietilenglicol (PLGA), fibrina y sericina y poliuretanos, o cualquiera de sus combinaciones. Esta lista se proporciona sólo a modo de ejemplo, y no se pretende que sea limitante.

En una realización adicional, las células de las composiciones de la invención pueden adherirse a un dispositivo médico, de ahora en adelante dispositivo médico de la invención, destinado a la implantación. Ejemplos de dispositivos médicos incluyen los *stents*, alfileres, puntos de sutura, fracturas, marcapasos, prótesis articulares, piel artificial, y varillas. Esta lista se proporciona sólo a modo de ilustración, y no se pretende que sea limitante. Para el experto en la técnica sería evidente adherir las células al dispositivo médico por distintos métodos. Por ejemplo, las células pueden adherirse al dispositivo médico utilizando fibrina, uno o más miembros de la familia de las integrinas, uno o más miembros de la familia de las cadherinas, uno o más miembros de la familia de las selectinas, una o más moléculas de adhesión celular (CAMs), uno o más miembros de la familia de las inmunoglobulinas y uno o más adherentes artificiales. Esta lista se proporciona sólo a modo de ilustración, y no se pretende que sea limitante. Para el experto en la técnica sería evidente utilizar cualquier combinación de uno o más componentes adherentes.

Por tanto, un octavo aspecto de la invención se refiere a un dispositivo médico, de ahora en adelanta dispositivo médico de la invención, que comprende las células de las composiciones de la invención.

Un noveno aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para la preparación de un tejido artificial, de ahora en adelante tejido artificial de la invención, que comprende:

a) sembrar en un material de soporte las células de cualquiera de las composiciones de la invención , y

b) cultivar dichas células en el material de soporte de (a) en un medio de cultivo apropiado.

Otro aspecto de la invención se refiere al tejido artificial de la invención obtenido por el método in vitro anteriormente descrito.

Que el medio de cultivo sea adecuado para la obtención del tejido artificial es conocido en el estado de la técnica. Por ejemplo, en el caso de las células derivadas del músculo cremáster que constituyen una población total de células debería contener por ejemplo medio Neurobasal A, suplementos (B27 y L-Glutamina) y factores de crecimiento como FGF, EGF, LSGS.

"Soporte" tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier dispositivo o material que puede servir como una base o matriz para el crecimiento de las células derivadas del músculo cremáster que constituyen una población total de células precursoras multipotentes de la invención, y más preferiblemente para el crecimiento y diferenciación de las células precursoras multipotentes de la invención.

En otra realización preferida, el material de soporte es de origen natural o sintético. En una realización más preferida, el material de soporte de origen natural se selecciona de la lista que consiste en: seda, membranas serosas bovinas descelularizadas aisladas del mesenterio, pericardio bovino descelularizado y combinaciones de los mismos. En una realización aún más preferida, el material de soporte es hilo con una estructura de monofilamento o multifilamento, y en una realización particular, el material de soporte es una lámina de nanofibras de seda.

Otros ejemplos de material de soporte incluyen como base el colágeno, fibrina, laminina, fibronectina, uno o varios polisacáridos, y un material artificial, o cualquiera de sus combinaciones. Esta lista se proporciona sólo a modo de ilustración, y no se pretende que sea limitante. Para el experto en la técnica sería evidente utilizar cualquier biomaterial, biomaterial ortopédico convencional o avanzada o una combinación de biomateriales.

En una realización más preferida, el material de soporte es hilo con estructura de monofilamento o multifilamento.

Uno de los mayores inconvenientes de la sutura de tejidos, es el hecho de que el diámetro de la aguja es mayor que el hilo, de modo que el punto de la aguja de inserción no será totalmente ocupado por este último, la generación de las zonas a través del cuales puede ocurrir la pérdida de fluidos. Este cierre deficiente de las heridas está con frecuencia asociado a complicaciones postoperatorias, tales como las anastomosis intestinales realizadas en pacientes con carcinoma o diverticulosis, que se realizan debido a una resección por una enfermedad intestinal, uniéndose posteriormente los dos extremos sanos. En estos pacientes, debido a un cierre incompleto, se podrían perder las heces e invadir los tejidos circundantes, lo que

provocaría peritonitis, con el consiguiente riesgo para la vida del paciente. Este riesgo se incrementa en pacientes con un grosor reducido de la pared intestinal, como en el caso de una enfermedad inflamatoria del intestino. Las células precursoras multipotentes se pueden aplicar en la sutura de manera que la abertura se sella generada por el paso del hilo a través de la costura. Por lo tanto, en otra realización preferida, el material de soporte es un hilo de sutura unido a una aguja.

El término "sutura" se refiere a un hilo o fibra u otro material de cierre que se puede utilizar para coser una herida.

El uso de grapas es una alternativa al método clásico de sutura. Permite el cierre primario de tejido en menos tiempo, reducir la pérdida de sangre, reducir la contaminación y preservar el flujo sanguíneo. Un factor limitante en el uso de grapas como un método de curación de atención primaria es la posibilidad de tener acceso a la parte superior e inferior del tejido a unir. También, debido a la fuerza ejercida la inserción de las grapas puede causar desgarro del tejido. Luego, en otra realización preferida, las grapas son el material de soporte.

USOS MÉDICOS DE LA INVENCIÓN

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de

a) cualquiera de las composiciones de la invención, preferiblemente la composición del primer, segundo o tercer aspecto de la invención,

b) el dispositivo médico de la invención, o

c) el tejido artificial de la invención,

en la elaboración de un medicamento, o alternativamente, se refiere a

a) cualquiera de las composiciones de la invención, preferiblemente la composición del primer, segundo o tercer aspecto de la invención,

b) el dispositivo médico de la invención,

c) el tejido artificial de la invención,

para su uso en medicina o terapia.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de

a) cualquiera de las composiciones de la invención, preferiblemente la composición del primer, segundo o tercer aspecto de la invención,

b) el dispositivo médico de la invención,

c) el tejido artificial de la invención,

en la elaboración de un medicamento para aumentar parcial o completamente, restaurar o reemplazar la actividad funcional de un tejido u órgano enfermo o dañado, o alternativamente, se refiere a

a) cualquiera de las composiciones de la invención, preferiblemente la composición del primer, segundo o tercer aspecto de la invención,

b) el dispositivo médico de la invención,

c) el tejido artificial de la invención,

para aumentar parcial o completamente, restaurar o reemplazar la actividad funcional de un tejido u órgano enfermo o dañado.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el tejido u órgano enfermo o dañado es el esfínter uretral, el esfínter anal, o una combinación de ambos.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de

a) cualquiera de las composiciones de la invención, preferiblemente la composición del primer, segundo o tercer aspecto de la invención,

b) el dispositivo médico de la invención,

c) el tejido artificial de la invención,

en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la incontinencia urinaria, la incontinencia fecal, o ambas, o alternativamente, se refiere a

a) cualquiera de las composiciones de la invención, preferiblemente la composición del primer, segundo o tercer aspecto de la invención,

b) el dispositivo médico de la invención,

c) el tejido artificial de la invención,

para el tratamiento de la incontinencia urinaria, la incontinencia fecal, o ambas.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de

a) cualquiera de las composiciones de la invención, preferiblemente la composición del primer, segundo o tercer aspecto de la invención,

b) el dispositivo médico de la invención,

c) el tejido artificial de la invención,

en la elaboración de un medicamento para la regeneración del músculo estriado, o alternativamente, se refiere a

a) cualquiera de las composiciones de la invención, preferiblemente la composición del primer, segundo o tercer aspecto de la invención,

b) el dispositivo médico de la invención,

c) el tejido artificial de la invención,

para la regeneración del músculo estriado.

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, suplementos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden limitar la presente invención.

EJEMPLOS DE LA INVENCIÓN

1.- Caracterización histológica del músculo cremáster masculino

Se obtuvieron biopsias del músculo cremáster tras aprobación ética y consentimiento informado de pacientes de varicocele o quistes de cordón espermático. Para los análisis histológicos (Figura 1), las biopsias se seccionaron en cortes seriados de 7-10 micras de grosor. La expresión de distintas proteínas marcadoras del músculo esquelético se detectó a través de inmunofluorescencia.

Como primer análisis, se realizó una tinción de hematoxilina-eosina donde claramente se observaron los paquetes de fibras musculares y se cuantificó el número de fibras que presentaban núcleos centrales, siendo este del 0.8%. El cremáster está mayoritariamente compuesto por fibras de tipo I (lentas), aunque contiene en torno a un 10% de fibras rápidas. La detección del marcador específico de células satélite Pax7 demostró la existencia de un 2% de células Pax7+ in situ.

2.- Obtención y cultivo de células precursoras multipotentes a partir de biopsias del músculo cremáster

a) Distintos tipos de células precursoras presentes en el cultivo de esferas.

A modo de ejemplo, la Figura 2 muestra las esferas obtenidas de cultivos de células obtenidas de dermis de ratón, y cómo esas dermoesferas contienen células precursoras multipotentes de diversos tipos, incluyendo células precursoras miogénicas, células precursoras vasculogénicas y células precursoras neurogénicas.

b) Procesado del músculo cremáster para el cultivo celular

La biopsia de músculo cremáster (2 cm^2) se transportó en frío en 50 ml de medio HBSS con un 1 % de Fungizona y un 1 % de Penicilina. La biopsia se agitó para la oxigenación del músculo. En cabina de cultivos, se lavó la biopsia en HBSS frío y traspasó con las pinzas a la placa p100 donde se troceó en fragmentos pequeños con unas pinzas esterilizadas y un bisturí quirúrgico. Los fragmentos resultantes se traspasaron a un tubo estéril con unos 15 ml de Colagenasa tipo I filtrada y se incubaron a 37ºC y en agitación a 180 rpm durante 1-2h aproximadamente.

El tejido disgregado en colagenasa se pasó a un tubo estéril de 50 ml al que se añadieron 20 ml de medio de proliferación para inactivar la colagenasa. Posteriormente se filtró la solución celular con un *Cell Strainer* de 40 µm. Para retirar la colagenasa se centrifugó la solución a 1500 rpm 5 min a 23ºC. El pellet resultante que contenía las células precursoras multipotentes del músculo cremáster se cultivó y se analizó mediante diferentes técnicas.

c) Cultivo celular para la formación de esferas

Para el cultivo celular se resuspendió el pellet en medio de cultivo para condiciones no adherentes, llamado medio de proliferación (medio Neurobasal™ A suplementado con 2% de suplemento B27 50X, 1% de L-glutamina 200 mM y 1% de solución de

penicilina/estreptomicina 100X) y se sembraron en placas no tratadas. Tras añadir las células al pocillo se añadieron los factores de crecimiento (LSGS, FGF2, EGF). El medio de cultivo se cambió durante todos los días durante los primeros 3 días, para después hacerlo en días alternos hasta los 7 días. A partir del día 1 tras la siembra se pudieron apreciar esferas celulares. Los lavados se hicieron recogiendo las células de cada pocillo en un tubo estéril de 50 ml y centrifugando a 1500 rpm durante 5 min a RT. El pellet se resuspendió de nuevo en 1 ml de medio de proliferación y se sembraron las células en un nuevo pocillo con medio y factores de crecimiento. En los casos en los que hubo bastante densidad celular, se expandieron las células en dos pocillos.

A día 0 y 7 de cultivo, se realizó un análisis de la expresión de marcadores miogénicos por inmunofluorescencia. Se detectó tinción para los marcadores de células satélite Pax7 y MyoD1 a día 7, así como células MyHC+ (Figura 3). Así mismo, se detectó tinción para los marcadores de células precursoras neurogénicas y vasculogénicas p75NTR y CD56 (Figura 4).

d) Cultivo celular para la diferenciación miogénica

Tras la formación de las mioesferas en cultivo de proliferación, se cambiaron las condiciones de cultivo para obtener una diferenciación miogénica (Figura 5). Las mioesferas se disgregaron con Tripsina-EDTA 0,25% durante 5 minutos a 37ºC para después sembrar las células precursoras sobre una matriz extracelular (ECM) natural que favorece la adhesión y la diferenciación celular (66, 88), compuesta de extracto de membrana basal Cultrex® (2,77 mg/mL en concentración final), Netrina-4 (0,83 µg/mL), Netrina-G1a (0,83 µg/mL) y ácido hialurónico de bajo peso molecular (2,5 mg/mL) en PBS (pH 7,4). Durante este cultivo de diferenciación se retiraron los factores de crecimiento y al medio de proliferación se le añadió un 10% de suero fetal bovino. En estas condiciones, al cabo de 7 días de cultivo, se obtuvo una diferenciación miogénica con generación de miotubos multinucleados.

Se observó que los miotubos expresaban proteínas específicas de músculo estriado como la MyHC y presentaban las estriaciones características de este tipo muscular. Además, también se observaron células precursoras PAX7 positivas, posiblemente células satélite reserva.

Para realizar el análisis de la expresión de genes determinantes para la miogénesis mediante retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR), el ARNm de las muestras se extrajo con la ayuda del kit miRNeasy Mini Kit en el equipo

QIAcube (Qiagen). Para la preparación de las muestras antes de la extracción de ARNm, estas se pasaron a tubos Eppendorf® Safe-Lock Biopur® RNase free y se añadió Qiazol® en un volumen final de 700 µL para guardarlas a -80ºC durante un mínimo de 2 horas. A la hora de hacer la extracción de ARNm, se descongelaron, se añadió 140 µL de cloroformo a cada muestra, se agitaron, se realizó un vortex de 15 segundos y se dejaron reposar 2 o 3 minutos a temperatura ambiente. Después, se centrifugaron a 12000 g durante 15 minutos a 4ºC. Se recogió la fase acuosa de las tres fases que se diferencian tras la centrifugación para pasarla a tubos estériles que se colocaron en la maquina QIAcube junto al resto de materiales y reactivos necesarios. Se procedió a la extracción automatizada de ARNm para finalmente obtener 30 µL de las muestras definitivas. Se midió la cantidad y pureza del ARNm obtenido en el NanoDrop™ ND-1000 Spectrophotometer (ThermoFisher). Seguidamente, el ARNm extraído se convirtió en ADN complementario (ADNc) mediante una PCR de transcripción reversa (RT-PCR). Para ello se utilizó el kit de transcripción reversa de ADN complementario de alta capacidad. Se retrotranscribieron 1,25 µg de ARNm de cada muestra, mezclándolo con los diferentes componentes del kit en un volumen final de 50 µL y se realizó la PCR. La RT-qPCR del ADNc de las muestras se realizó en la máquina 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) y se utilizaron sondas TaqMan® de expresión génica (0,5 µL por pocillo) en solución TaqMan® Gene Expression Master Mix (5 µL por pocillo). Se añadieron 20,2 ng de ADNc en agua RNase-Free en un volumen final de 4,5 µL por pocillo. De esta manera, el volumen final de reacción fue de 10 µL por pocillo, cada muestra se amplificó por triplicado en la placa de ensayo).

Se analizaron los resultados relativos a la expresión del gen endógeno Tbp, donde se observó cierta variabilidad en la expresión entre las muestras, pero todas ellas expresaban los genes miogénicos Pax7, Myf5, MyoD1, Myogenin, MyHC3 y MyHC2, y en mayor cantidad comparada con el control negativo.

e) Regeneración muscular in vivo

Se llevó a cabo un ensayo *in vivo* para evaluar la capacidad regenerativa de estas células frente a un daño agudo en el músculo tibial anterior (TA) del ratón (Figura 6). Se siguió un diseño experimental en el que se producía el daño muscular por inyección de cardiotoxina (CTX) en las dos extremidades posteriores de 6 ratones inmunodeficientes NSG (NOD scid gamma). Al día siguiente, se inyectaron las células precursoras miogénicas de cremáster sólo en una de las extremidades dañadas, y se analizaron los resultados a las 4 semanas de la inyección celular. Al término del

experimento se extrajeron los músculos TA de las dos extremidades, se congelaron en isopentano enfriado en nitrógeno líquido para posteriormente realizar cortes seriados del músculo completo. Estos cortes seriados fueron analizados mediante inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos anti-Pax7, y anti-hLaminA/C y hDystrophin (específicos de músculo humano, que no reaccionan con el músculo del ratón) para detectar las células humanas y su posible contribución a las fibras regeneradas. Se detectaron células humanas por la expresión de la proteína Lamin A/C y hDystrophin en todas las muestras analizadas, donde se observó una correlación entre el número de estas células y el número de estas fibras generadas en cada muestra. A su vez se realizó una cuantificación del número de células humanas Lamin A/C positivas que co-expresaban el marcador de las células satélite Pax7, obteniéndose aproximadamente un 2%.

REFERENCIAS

1. Barker N, Bartfeld S, Clevers H. Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. Cell Stem Cell. 2010;7(6):656-70.

2. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. The Journal of biophysical and biochemical cytology. 1961;9:493-5.

3. Chal J, Pourquie O. Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. Development. 2017;144(12):2104-22.

4. Boldrin L, Muntoni F, Morgan JE. Are human and mouse satellite cells really the same? J Histochem Cytochem. 2010;58(11):941-55.

5. Negroni E, Gidaro T, Bigot A, Butler-Browne GS, Mouly V, Trollet C. Invited review: Stem cells and muscle diseases: advances in cell therapy strategies. Neuropathol Appl Neurobiol. 2015;41(3):270-87.

6. Tucciarone L, Etxaniz U, Sandoná M, Consalvi S, Puri PL, Saccone V. Advanced Methods to Study the Cross Talk Between Fibro-Adipogenic Progenitors and Muscle Stem Cells. In: Bernardini C, editor. Duchenne Muscular Dystrophy: Methods and Protocols. New York, NY: Springer New York; 2018. p. 231-56.

7. Taniuchi M, Clark HB, Johnson EM. Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1986;83(11):4094-8.

8. Tedesco FS, Moyle LA, Perdiguero E. Muscle Interstitial Cells: A Brief Field Guide to Non-satellite Cell Populations in Skeletal Muscle. In: Perdiguero E, Cornelison DDW, editors. Muscle Stem Cells: Methods and Protocols. New York, NY: Springer New York; 2017. p. 129-47.

9. Zheng B, Cao B, Crisan M, Sun B, Li G, Logar A, et al. Prospective identification of myogenic endothelial cells in human skeletal muscle. Nat Biotechnol. 2007;25(9):1025-34.

10. Benchaouir R, Meregalli M, Farini A, D'Antona G, Belicchi M, Goyenvalle A, et al. Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. Cell Stem Cell. 2007;1(6):646-57.

11. Meng J, Chun S, Asfahani R, Lochmuller H, Muntoni F, Morgan J. Human skeletal muscle-derived CD133(+) cells form functional satellite cells after intramuscular transplantation in immunodeficient host mice. Mol Ther. 2014;22(5):1008-17.

12. Negroni E, Riederer I, Chaouch S, Belicchi M, Razini P, Di Santo J, et al. In vivo myogenic potential of human CD133+ muscle-derived stem cells: a quantitative study. Mol Ther. 2009;17(10):1771-8.

13. Torrente Y, Belicchi M, Marchesi C, D'Antona G, Cogiamanian F, Pisati F, et al. Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. Cell Transplant. 2007;16(6):563-77.

14. Vauchez K, Marolleau JP, Schmid M, Khattar P, Chapel A, Catelain C, et al. Aldehyde dehydrogenase activity identifies a population of human skeletal muscle cells with high myogenic capacities. Mol Ther. 2009;17(11):1948-58.

15. Jean E, Laoudj-Chenivesse D, Notarnicola C, Rouger K, Serratrice N, Bonnieu A, et al. Aldehyde dehydrogenase activity promotes survival of human muscle precursor cells. J Cell Mol Med. 2011;15(1):119-33.

16. Vella JB, Thompson SD, Bucsek MJ, Song M, Huard J. Murine and human myogenic cells identified by elevated aldehyde dehydrogenase activity: implications for muscle regeneration and repair. PLoS One. 2011;6(12):e29226.

17. Pisani DF, Clement N, Loubat A, Plaisant M, Sacconi S, Kurzenne JY, et al. Hierarchization of myogenic and adipogenic progenitors within human skeletal muscle. Stem Cells. 2010;28(12):2182-94.

18. Pisani DF, Dechesne CA, Sacconi S, Delplace S, Belmonte N, Cochet O, et al. Isolation of a highly myogenic CD34-negative subset of human skeletal muscle cells free of adipogenic potential. Stem Cells. 2010;28(4):753-64.

19. Lecourt S, Marolleau JP, Fromigue O, Vauchez K, Andriamanalijaona R, Ternaux B, et al. Characterization of distinct mesenchymal-like cell populations from human skeletal muscle in situ and in vitro. Exp Cell Res. 2010;316(15):2513-26.

20. Castiglioni A, Hettmer S, Lynes MD, Rao TN, Tchessalova D, Sinha I, et al. Isolation of Progenitors that Exhibit Myogenic/Osteogenic Bipotency In Vitro by Fluorescence-Activated Cell Sorting from Human Fetal Muscle. Stem Cell Reports. 2014;2(1):92-106.

21. Bareja A, Holt JA, Luo G, Chang C, Lin J, Hinken AC, et al. Human and mouse skeletal muscle stem cells: convergent and divergent mechanisms of myogenesis. PLoS One. 2014;9(2):e90398.

22. Tamaki T, Uchiyama Y, Hirata M, Hashimoto H, Nakajima N, Saito K, et al. Therapeutic isolation and expansion of human skeletal muscle-derived stem cells for the use of muscle-nerve-blood vessel reconstitution. Front Physiol. 2015;6:165.

23. Xu X, Wilschut KJ, Kouklis G, Tian H, Hesse R, Garland C, et al. Human Satellite Cell Transplantation and Regeneration from Diverse Skeletal Muscles. Stem Cell Reports. 2015;5(3):419-34.

24. Charville GW, Cheung TH, Yoo B, Santos PJ, Lee GK, Shrager JB, et al. Ex Vivo Expansion and In Vivo Self-Renewal of Human Muscle Stem Cells. Stem Cell Reports. 2015;5(4):621-32.

25. Alexander MS, Rozkalne A, Colletta A, Spinazzola JM, Johnson S, Rahimov F, et al. CD82 Is a Marker for Prospective Isolation of Human Muscle Satellite Cells and Is Linked to Muscular Dystrophies. Cell Stem Cell. 2016;19(6):800-7.

26. Uezumi A, Nakatani M, Ikemoto-Uezumi M, Yamamoto N, Morita M, Yamaguchi A, et al. Cell-Surface Protein Profiling Identifies Distinctive Markers of Progenitor Cells in Human Skeletal Muscle. Stem Cell Reports. 2016;7(2):263-78.

27. Gilbert PM, Havenstrite KL, Magnusson KE, Sacco A, Leonardi NA, Kraft P, et al. Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. Science. 2010;329(5995):1078-81.

28. Montarras D, Morgan J, Collins C, Relaix F, Zaffran S, Cumano A, et al. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. Science. 2005;309(5743):2064-7.

29. Brimah K, Ehrhardt J, Mouly V, Butler-Browne GS, Partridge TA, Morgan JE. Human muscle precursor cell regeneration in the mouse host is enhanced by growth factors. Hum Gene Ther. 2004;15(11):1109-24.

30. Cooper RN, Irintchev A, Di Santo JP, Zweyer M, Morgan JE, Partridge TA, et al. A new immunodeficient mouse model for human myoblast transplantation. Hum Gene Ther. 2001;12(7):823-31.

31. Bareja A, Billin AN. Satellite cell therapy - from mice to men. Skeletal muscle. 2013;3(1):2.

32. Partridge TA, Grounds M, Sloper JC. Evidence of fusion between host and donor myoblasts in skeletal muscle grafts. Nature. 1978;273(5660):306-8.

33. Stadler G, Chen JC, Wagner K, Robin JD, Shay JW, Emerson Jr. CP, et al. Establishment of clonal myogenic cell lines from severely affected dystrophic muscles - CDK4 maintains the myogenic population. Skeletal muscle. 2011;1(1):12.

34. Konigsberg IR. The differentiation of cross-striated myofibrils in short term cell culture. Exp Cell Res. 1960;21:414-20.

35. Scott IC, Tomlinson W, Walding A, Isherwood B, Dougall IG. Large-scale isolation of human skeletal muscle satellite cells from post-mortem tissue and development of quantitative assays to evaluate modulators of myogenesis. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2013;4(2):157-69.

36. Briggs D, Morgan JE. Recent progress in satellite cell/myoblast engraftment -- relevance for therapy. FEBS J. 2013;280(17):4281-93.

37. Cossu G, Sampaolesi M. New therapies for Duchenne muscular dystrophy: challenges, prospects and clinical trials. Trends Mol Med. 2007;13(12):520-6.

38. Mouly V, Aamiri A, Perie S, Mamchaoui K, Barani A, Bigot A, et al. Myoblast transfer therapy: is there any light at the end of the tunnel? Acta Myol. 2005;24(2):128-33.

39. Negroni E, Butler-Browne GS, Mouly V. Myogenic stem cells: regeneration and cell therapy in human skeletal muscle. Pathol Biol (Paris). 2006;54(2):100-8.

40. Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. The Journal of clinical investigation. 2010;120(1):11-9.

41. Cooper RN, Thiesson D, Furling D, Di Santo JP, Butler-Browne GS, Mouly V. Extended amplification in vitro and replicative senescence: key factors implicated in the success of human myoblast transplantation. Hum Gene Ther. 2003;14(12):1169-79.

42. Motohashi N, Asakura A. Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal. Front Cell Dev Biol. 2014;2:1.

43. Shadrin IY, Khodabukus A, Bursac N. Striated muscle function, regeneration, and repair. Cell Mol Life Sci. 2016;73(22):4175-202.

44. Urbani L, Piccoli M, Franzin C, Pozzobon M, De Coppi P. Hypoxia increases mouse satellite cell clone proliferation maintaining both in vitro and in vivo heterogeneity and myogenic potential. PLoS One. 2012;7(11):e49860.

45. Miersch C, Stange K, Hering S, Kolisek M, Viergutz T, Rontgen M. Molecular and functional heterogeneity of early postnatal porcine satellite cell populations is associated with bioenergetic profile. Sci Rep. 2017;7:45052.

46. Shan T, Xu Z, Liu J, Wu W, Wang Y. Lkb1 regulation of skeletal muscle development, metabolism and muscle progenitor cell homeostasis. J Cell Physiol. 2017;232(10):2653-6.

47. Theret M, Gsaier L, Schaffer B, Juban G, Ben Larbi S, Weiss-Gayet M, et al. AMPKalpha1-LDH pathway regulates muscle stem cell self-renewal by controlling metabolic homeostasis. EMBO J. 2017;36(13):1946-62.

48. Alonso-Martin S, Rochat A, Mademtzoglou D, Morais J, de Reynies A, Aurade F, et al. Gene Expression Profiling of Muscle Stem Cells Identifies Novel Regulators of Postnatal Myogenesis. Front Cell Dev Biol. 2016;4:58.

49. Pawlikowski B, Vogler TO, Gadek K, Olwin BB. Regulation of skeletal muscle stem cells by fibroblast growth factors. Dev Dyn. 2017;246(5):359-67.

50. Shan T, Xu Z, Wu W, Liu J, Wang Y. Roles of Notch1 Signaling in Regulating Satellite Cell Fates Choices and Postnatal Skeletal Myogenesis. J Cell Physiol. 2017;232(11):2964-7.

51. Rajgara RF, Lala-Tabbert N, Marchildon F, Lamarche E, MacDonald JK, Scott DA, et al. SOX7 Is Required for Muscle Satellite Cell Development and Maintenance. Stem Cell Reports. 2017.

52. Sun C, De Mello V, Mohamed A, Ortuste Quiroga HP, Garcia-Munoz A, Al Bloshi A, et al. Common and Distinctive Functions of the Hippo Effectors Taz and Yap in Skeletal Muscle Stem Cell Function. Stem Cells. 2017;35(8):1958-72.

53. Paris ND, Soroka A, Klose A, Liu W, Chakkalakal JV. Smad4 restricts differentiation to promote expansion of satellite cell derived progenitors during skeletal muscle regeneration. Elife. 2016;5.

54. Borisov AB. Regeneration of skeletal and cardiac muscle in mammals: do nonprimate models resemble human pathology? Wound Repair Regen. 1999;7(1):26-35.

55. Beauchamp JR, Morgan JE, Pagel CN, Partridge TA. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. J Cell Biol. 1999;144(6):1113-22.

56. Ono Y, Masuda S, Nam HS, Benezra R, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Slow-dividing satellite cells retain long-term self-renewal ability in adult muscle. J Cell Sci. 2012;125(Pt 5):1309-17.

57. Huard J, Verreault S, Roy R, Tremblay M, Tremblay JP. High efficiency of muscle regeneration after human myoblast clone transplantation in SCID mice. The Journal of clinical investigation. 1994;93(2):586-99.

58. Skuk D, Paradis M, Goulet M, Chapdelaine P, Rothstein DM, Tremblay JP. Intramuscular transplantation of human postnatal myoblasts generates functional donor-derived satellite cells. Mol Ther. 2010;18(9):1689-97.

59. Laumonier T, Bermont F, Hoffmeyer P, Kindler V, Menetrey J. Human myogenic reserve cells are quiescent stem cells that contribute to muscle regeneration after intramuscular transplantation in immunodeficient mice. Sci Rep. 2017;7(1):3462.

60. Perie S, Trollet C, Mouly V, Vanneaux V, Mamchaoui K, Bouazza B, et al. Autologous myoblast transplantation for oculopharyngeal muscular dystrophy: a phase I/IIa clinical study. Mol Ther. 2014;22(1):219-25.

61. El Haddad M, Notarnicola C, Evano B, El Khatib N, Blaquiere M, Bonnieu A, et al. Retinoic acid maintains human skeletal muscle progenitor cells in an immature state. Cell Mol Life Sci. 2017;74(10):1923-36.

62. Nierobisz LS, Cheatham B, Buehrer BM, Sexton JZ. High-content screening of human primary muscle satellite cells for new therapies for muscular atrophy/dystrophy. Curr Chem Genom Transl Med. 2013;7:21-9.

63. Sarig R, Baruchi Z, Fuchs O, Nudel U, Yaffe D. Regeneration and transdifferentiation potential of muscle-derived stem cells propagated as myospheres. Stem Cells. 2006;24(7):1769-78.

64. Westerman KA. Myospheres are composed of two cell types: one that is myogenic and a second that is mesenchymal. PLoS One. 2015;10(2):e0116956.

65. Westerman KA, Penvose A, Yang Z, Allen PD, Vacanti CA. Adult muscle 'stem' cells can be sustained in culture as free-floating myospheres. Exp Cell Res. 2010;316(12):1966-76.

66. Naldaiz-Gastesi N, Goicoechea M, Alonso-Martin S, Aiastui A, Lopez-Mayorga M, Garcia-Belda P, et al. Identification and Characterization of the Dermal Panniculus Carnosus Muscle Stem Cells. Stem Cell Reports. 2016;7(3):411-24.

67. Nomura T, Ashihara E, Tateishi K, Ueyama T, Takahas-Hi T, Yamagishi M, et al. Therapeutic potential of stem/progenitor cells in human skeletal muscle for cardiovascular regeneration. Curr Stem Cell Res Ther. 2007;2(4):293-300.

68. Wei Y, Li Y, Chen C, Stoelzel K, Kaufmann AM, Albers AE. Human skeletal muscle-derived stem cells retain stem cell properties after expansion in myosphere culture. Exp Cell Res. 2011;317(7):1016-27.

69. Jungbluth H, Ochala J, Treves S, Gautel M. Current and future therapeutic approaches to the congenital myopathies. Semin Cell Dev Biol. 2017;64:191-200.

70. Emery AE. The muscular dystrophies. Lancet. 2002;359(9307):687-95.

71. Telukuntla KS, Suncion VY, Schulman IH, Hare JM. The advancing field of cell-based therapy: insights and lessons from clinical trials. J Am Heart Assoc. 2013;2(5):e000338.

72. Snijders T, Parise G. Role of muscle stem cells in sarcopenia. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2017;20(3):186-90.

73. Williams JK, Dean A, Badlani G, Andersson KE. Regenerative Medicine Therapies for Stress Urinary Incontinence. J Urol. 2016;196(6):1619-26.

74. Gras S, Tolstrup CK, Lose G. Regenerative medicine provides alternative strategies for the treatment of anal incontinence. Int Urogynecol J. 2017;28(3):341-50.

75. Hart ML, Izeta A, Herrera-Imbroda B, Amend B, Brinchmann JE. Cell Therapy for Stress Urinary Incontinence. Tissue Eng Part B Rev. 2015;21(4):365-76.

76. Herrera-Imbroda B, Lara MF, Izeta A, Sievert KD, Hart ML. Stress urinary incontinence animal models as a tool to study cell-based regenerative therapies targeting the urethral sphincter. Adv Drug Deliv Rev. 2015;82-83:106-16.

77. Kivela R, Salmela I, Nguyen YH, Petrova TV, Koistinen HA, Wiener Z, et al. The transcription factor Prox1 is essential for satellite cell differentiation and muscle fibre-type regulation. Nat Commun. 2016;7:13124.

78. Sumino Y, Hirata Y, Hanada M, Akita Y, Sato F, Mimata H. Long-term cryopreservation of pyramidalis muscle specimens as a source of striated muscle stem cells for treatment of post-prostatectomy stress urinary incontinence. Prostate. 2011;71(11):1225-30.

79. Sharifiaghdas F, Taheri M, Moghadasali R. Isolation of human adult stem cells from muscle biopsy for future treatment of urinary incontinence. Urol J. 2011;8(1):54-9.

80. Vinarov A, Atala A, Yoo J, Slusarenco R, Zhumtaev M, Zhito A, et al. Cell therapy for stress urinary incontinence: Present-day frontiers. J Tissue Eng Regen Med. 2017.

81. Kayalioglu G, Altay B, Uyaroglu FG, Bademkiran F, Uludag B, Ertekin C. Morphology and innervation of the human cremaster muscle in relation to its function. Anat Rec (Hoboken). 2008;291(7):790-6.

82. Tanyel FC, Erdem S, Buyukpamukcu N, Tan E. Cremaster muscle is not sexually dimorphic, but that from boys with undescended testis reflects alterations related to autonomic innervation. J Pediatr Surg. 2001;36(6):877-80.

83. Harnaen EJ, Na AF, Shenker NS, Sourial M, Farmer PJ, Southwell BR, et al. The anatomy of the cremaster muscle during inguinoscrotal testicular descent in the rat. J Pediatr Surg. 2007;42(12):1982-7.

84. Lie G, Hutson JM. The role of cremaster muscle in testicular descent in humans and animal models. Pediatr Surg Int. 2011;27(12):1255-65.

85. Sanders N, Buraundi S, Balic A, Southwell BR, Hutson JM. Cremaster muscle myogenesis in the tip of the rat gubernaculum supports active gubernacular elongation during inguinoscrotal testicular descent. J Urol. 2011;186(4 Suppl):1606-13.

86. Tanyel FC, Talim B, Atilla P, Muftuoglu S, Kale G. Myogenesis within the human gubernaculum: histological and immunohistochemical evaluation. Eur J Pediatr Surg. 2005;15(3):175-9.

87. Borirakchanyavat S, Baskin LS, Kogan BA, Cunha GR. Smooth and striated muscle development in the intrinsic urethral sphincter. J Urol. 1997;158(3 Pt 2):1119-22.

88. Garcia-Parra P, Naldaiz-Gastesi N, Maroto M, Padin JF, Goicoechea M, Aiastui A, et al. Murine muscle engineered from dermal precursors: an in vitro model for skeletal muscle generation, degeneration, and fatty infiltration. Tissue engineering. 2014;20(1):28-41.

REIVINDICACIONES

1.Composición que comprende una población celular de células precursoras multipotentes aisladas del músculo cremáster humano, donde dicha población celular comprende al menos un 20% de celulas precursoras multipotentes aisladas del músculo cremáster humano.

2. Composición según la reivindicación 1, donde dicha población celular es positiva para los marcadores: Pax7, MyoD y MyHC.

3. Composición que comprende mioesferas obtenidas u obtenibles de cultivos de células precursoras multipotentes aisladas del músculo cremáster humano, donde dichas miosferas se caracterizan por comprender celulas precursoras miogénicas positivas para los marcadores: Pax7, MyoD y MyHC.

4. Composición que comprende una población celular de células miogénicas obtenidas a partir de la diferenciación de células precursoras multipotentes aisladas del músculo cremáster humano, caracterizada porque dicha población comprende al menos un 20% de células miogénicas caracterizadas porque expresan los genes miogénicos Pax7, Myf5, MyoD1, Myogenin, MyHC3 y MyHC2, en mayor cantidad comparada con un control negativo.

5. Composición que comprende una población celular de células precursoras vasculogénicas obtenidas o aisladas a partir de células precursoras multipotentes aisladas del músculo cremáster humano, caracterizada porque dicha población comprende al menos un 20% de células precursoras vasculogénicas caracterizadas porque son positivas para los marcadores: p75NTR, SOX2, PAX3, DLK1, RGS5, AOC3, ITGA7, ECRG4 y negativas para el marcador CD56.

6. Composición que comprende una población celular de células precursoras neurogénicas obtenidas o aisladas a partir de células precursoras multipotentes aisladas del músculo cremáster humano, caracterizada porque dicha población comprende al menos un 20% de células precursoras neurogénicas caracterizadas porque son positivas para los marcadores: p75NTR, SOX2, PAX3, CD56, SOX10, ERBB3, L1CAM, CDH2, CDH19, PMP22, PLP1, DHH y negativas para el marcador SOX9.

7. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, o cualquiera de sus combinaciones, donde dicha composición es una composición farmacéutica.

8.- La composición farmacéutica según la reivindicación 7, donde dicha composición además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

9. La composición farmacéutica según la reivindicación 7 u 8, donde dicha composición además comprende otro principio activo.

10. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde dicha composición farmacéutica se prepara en una forma de dosificación líquida, sólida o semisólida, preferiblemente en forma de suspensión, para su uso en la administración mediante la implantación, inyección o infusión en un sujeto que necesita tratamiento.

11. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde dicha composición farmacéutica se prepara en una forma de suspensión estéril con un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en la administración a un sujeto por vía parenteral.

12. Dispositivo médico que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

13. La composición según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o el dispositivo médico según la reivindicación 12, para su uso en medicina.

14. La composición según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o el dispositivo médico según la reivindicación 12, para su uso en aumentar parcial o completamente, restaurar o reemplazar la actividad funcional de un tejido u órgano enfermo o dañado.

15. La composición según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o el dispositivo médico según la reivindicación 11, para su uso en el tratamiento de la incontinencia urinaria, la incontinencia fecal, o ambas.

16. La composición según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o el dispositivo médico según la reivindicación 11, para su uso en la regeneración del músculo estriado.

FIGURAS

Fig. 1

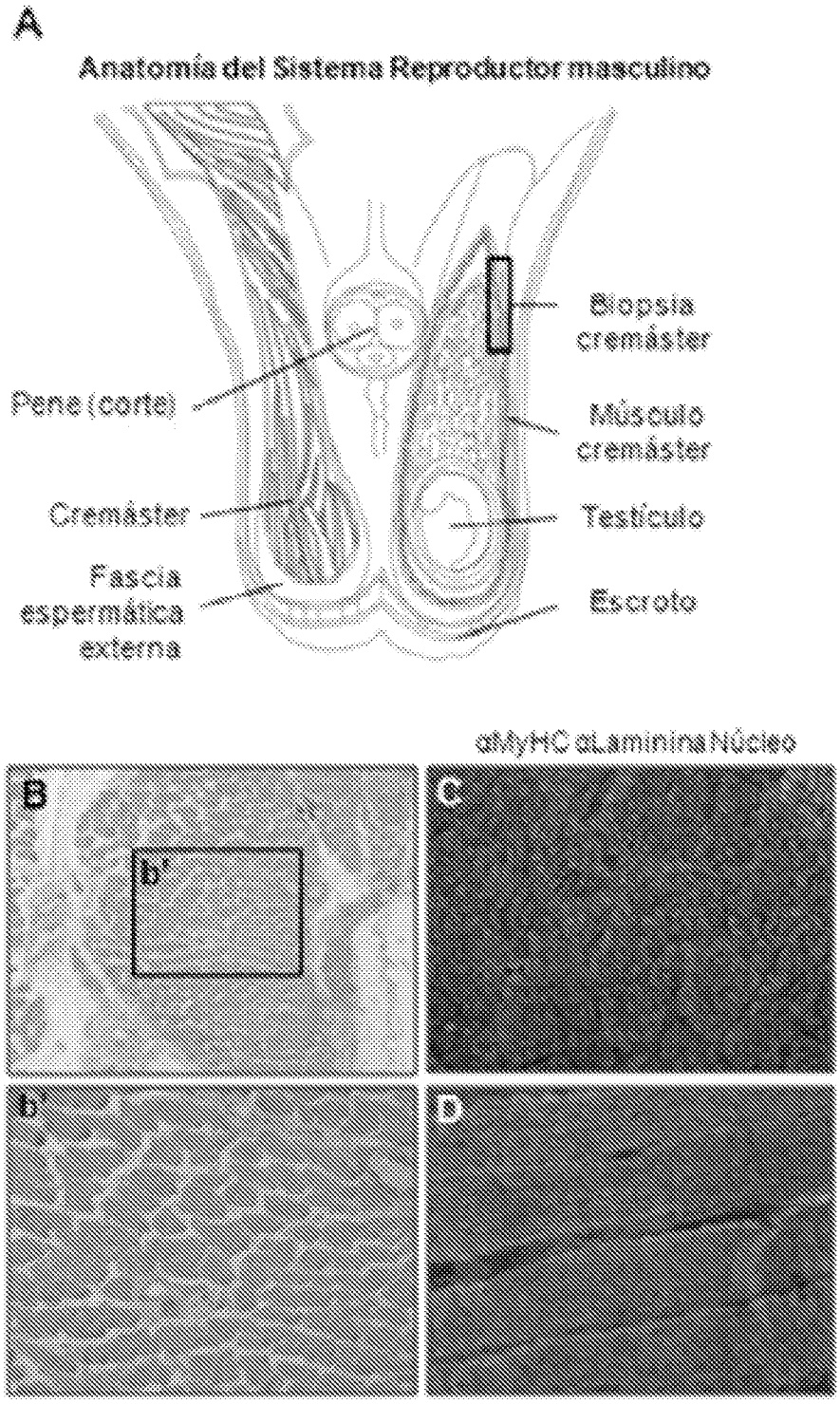


Fig. 1 (Cont.)

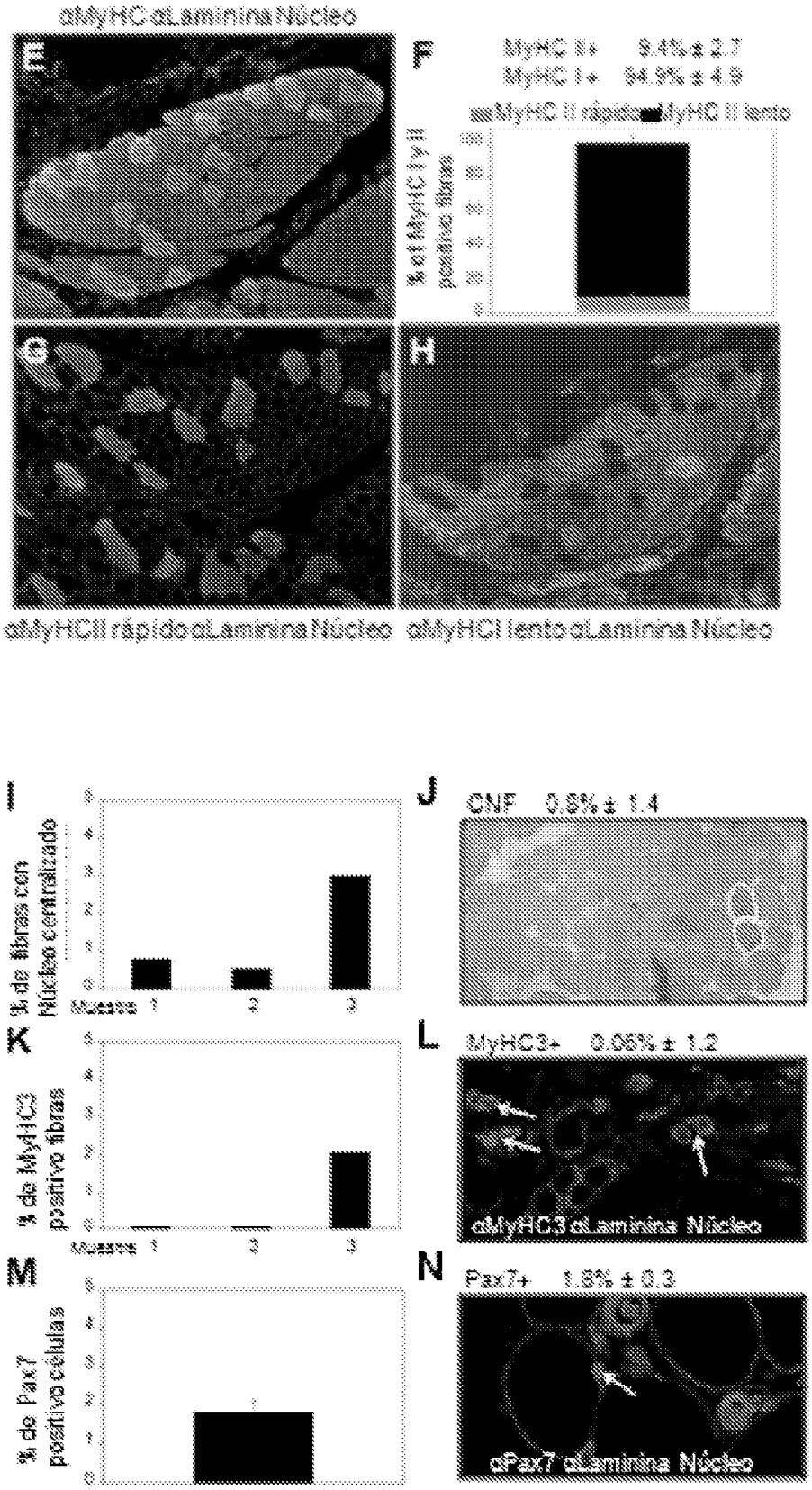

αMyHC αLaminina Núcleo
E
F
MyHC II+ 9.4% ± 2.7
MyHC I+ 84.9% ± 4.9
MyHC II rápido
MyHC II lento
% sel MyHC I y II positivo fibras
G
H
αMyHCII rápido αLaminina Núcleo
αMyHCI lento αLaminina Núcleo
I
% de fibras con Núcleo centralizado
Musculo 1
2
3
J
CNF 0.8% ± 1.4
K
% de MyHC3 positivo fibras
L
MyHC3+ 0.05% ± 1.2
αMyHC3 αLaminina Núcleo
M
% de Pax7 positivo células
N
Pax7+ 1.8% ± 0.3
αPax7 αLaminina Núcleo

Fig. 2

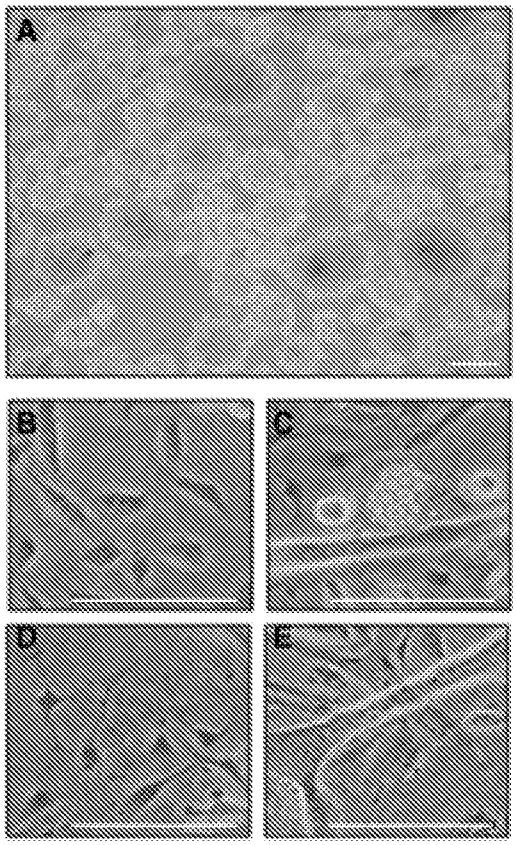


Fig. 3

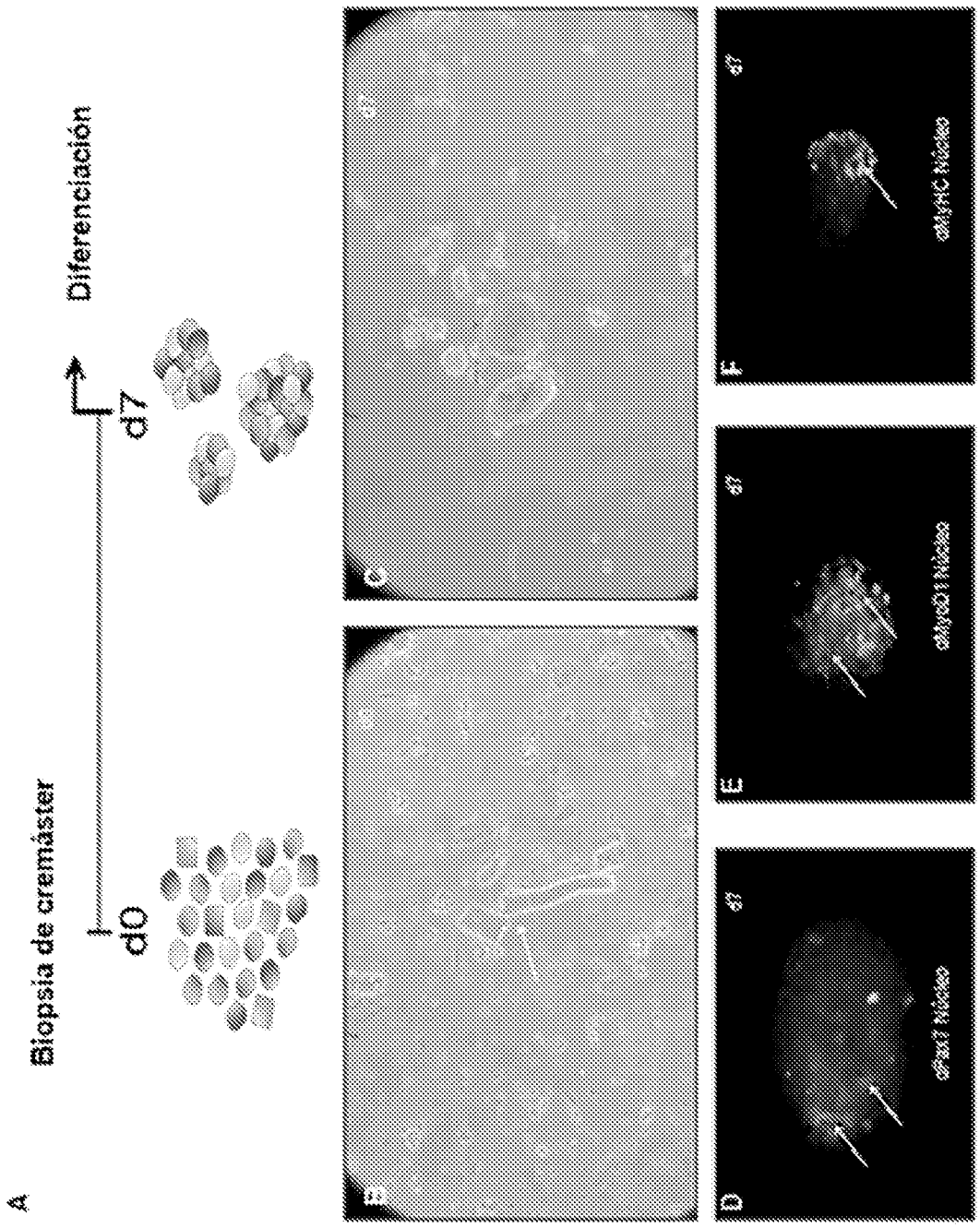

A
Biopsia de cremáster
d0
Diferenciación
d7
B
C
D
d7
αPax7 Núcleo
E
d7
αMyoD Núcleo
F
d7
αMyHC Núcleo

Fig. 4

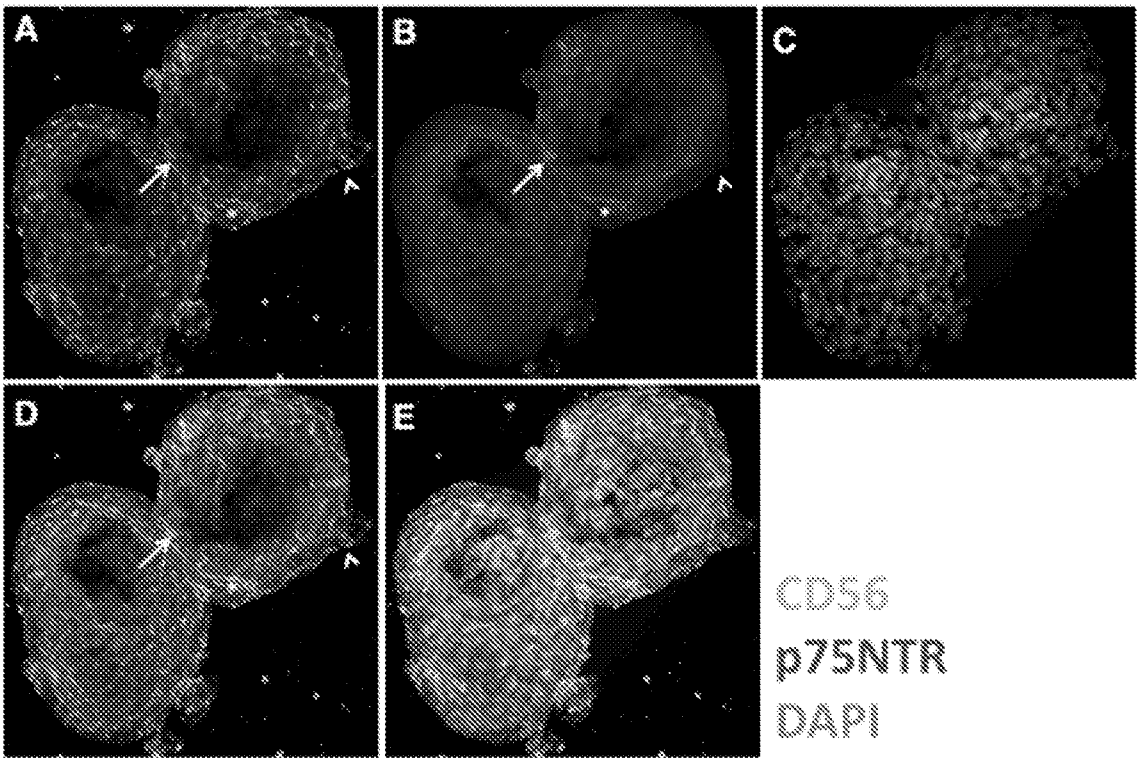


Fig. 5

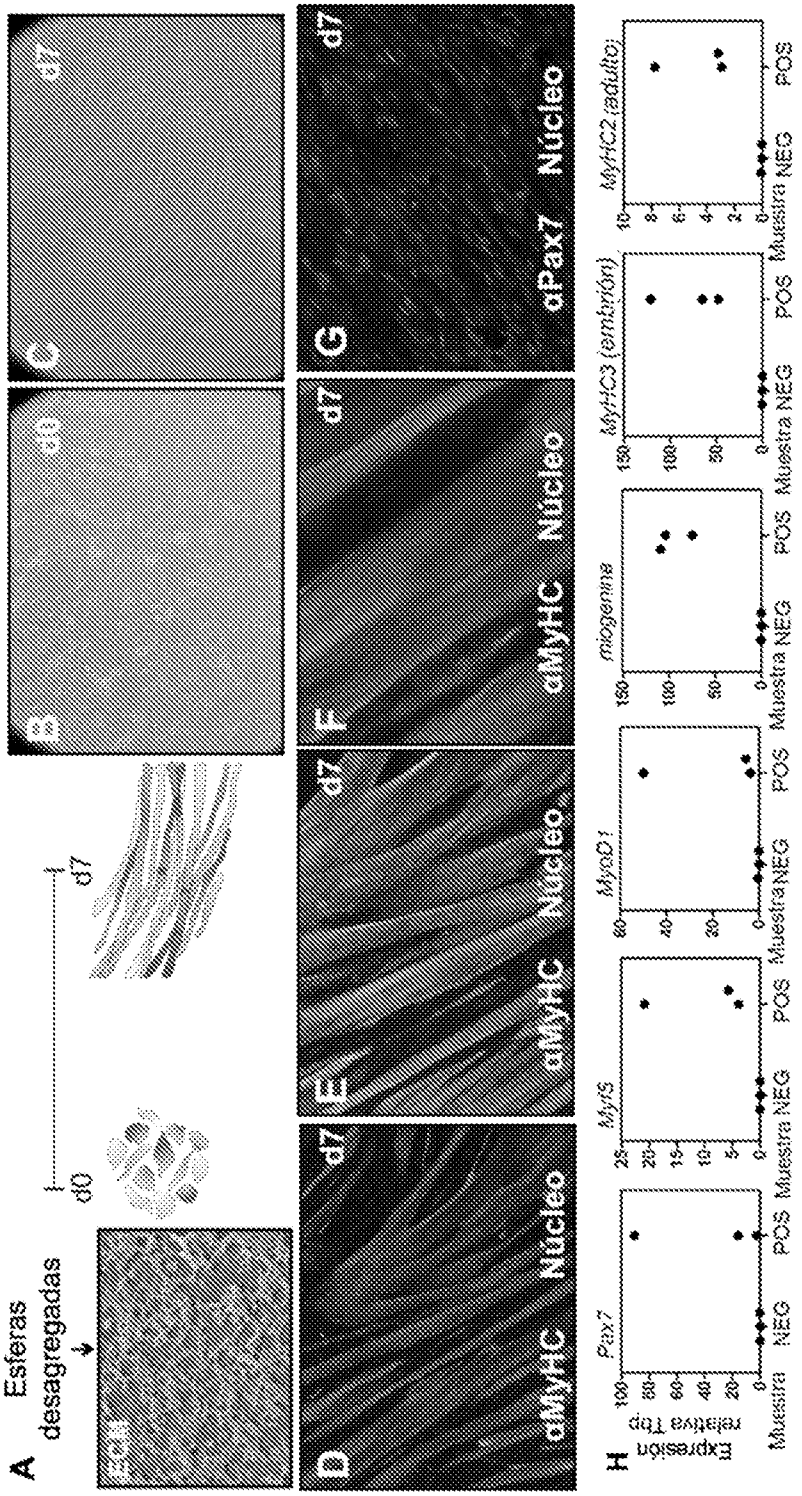
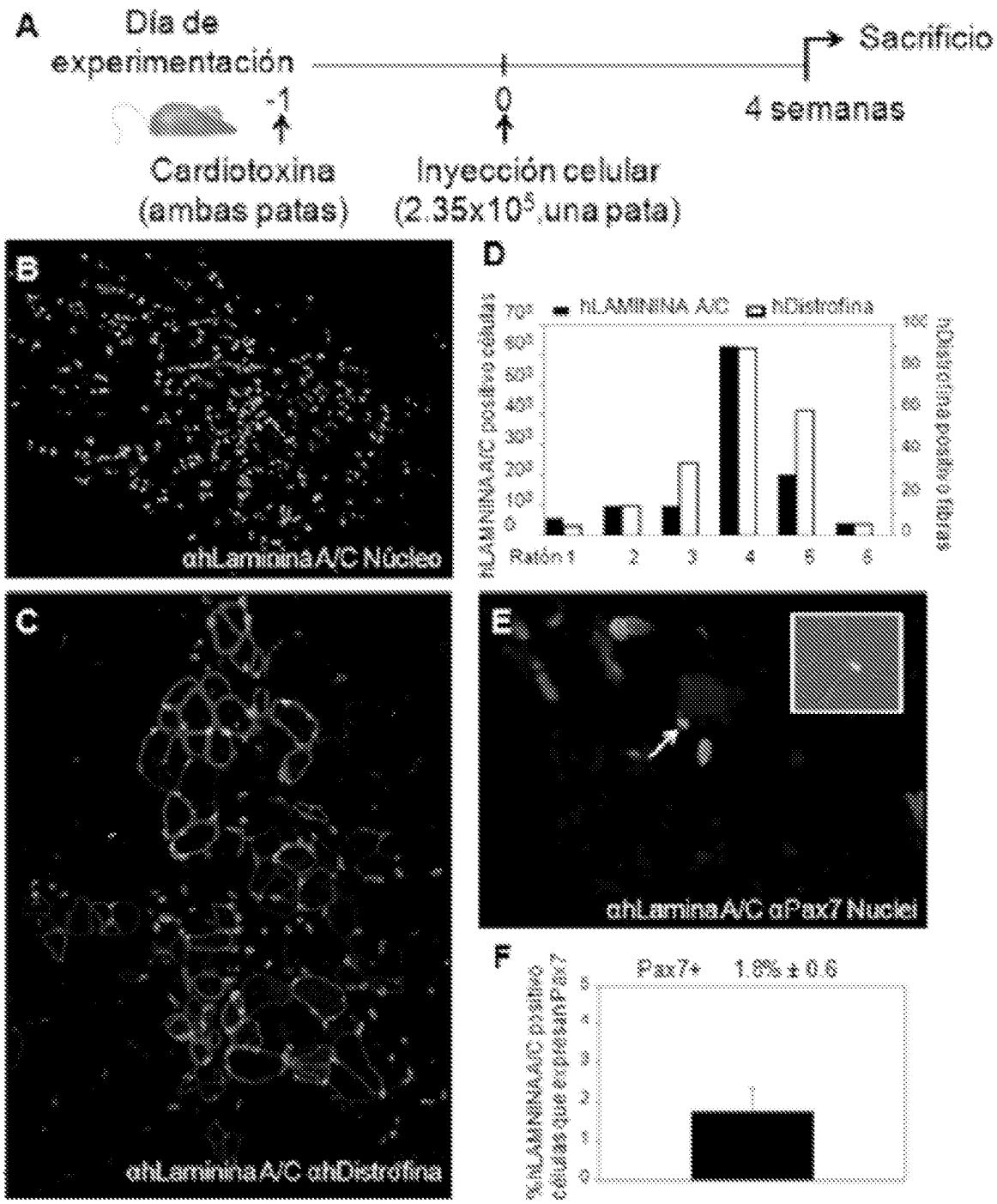

A
Esferas desagregadas
Escala
d0
d7
B
d0
C
d7
D
d7
dMyHC
Núcleo
E
d7
dMyHC
Núcleo
F
d7
dMyHC
Núcleo
G
d7
dPax7
Núcleo
H
Expresión relativa Tbp
Pax7
Myf5
MyoD1
miogenina
MyHC3 (embrión)
MyHC2 (adulto)
Muestra NEG
POS
Muestra NEG
POS
Muestra NEG
POS
Muestra NEG
POS
Muestra NEG
POS

Fig.6


A
Día de experimentación
-1
0
Sacrificio
4 semanas
Cardiotoxina (ambas patas)
Inyección celular (2.35x10^5 una pata)
B
ahLamininaA/C Núcleo
C
ahLaminina A/C ahDistrofina
D
hLAMININA A/C
hDistrofina
Ratón 1
2
3
4
5
6
E
ahLamina A/C aPax7 Nuclei
F
Pax7+ 1.8% ± 0.6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2019/070167

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, EMBASE, NPL, MEDLINE, INTERNET

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
D, A	YAN WEI *et al*. Human skeletal muscle-derived stem cells retain stem cell properties after expansion in myosphere culture. Experimental Cell Research, 20110115 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL. Ruas Jorge; Sven, 15/01/2011, Vol. 317, Nº 7, Pages 1016 - 1027, ISSN 0014-4827, <DOI: doi:10.1016/j.yexcr.2011.01.019> page 1017, left column , fourth paragraph; page 1017, right column, first paragraph; page 1020, left column, third paragraph; page 1020, right column, third paragraph; page 1022, right column, first and second paragraphs; page 1025, right column, second paragraph; abstract.	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"D" document cited by the applicant in the application.
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15/07/2019	**(16/07/2019)**
Name and mailing address of the ISA/ OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Facsimile No.: 91 349 53 04	Authorized officer S. González Peñalba Telephone No. 91 3493025

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2019/070167

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
D, A	TAMAKI TETSURO *et al*. Therapeutic isolation and expansion of human skeletal muscle-derived stem cells for the use of muscle-nerve-blood vessel reconstitution. Frontiers in Physiology JUN 2 2015. 02/06/2015, Vol. 6, Pages 1-16, Article No.165, ISSN 1664-042X(print) ISSN 1664-042X(electronic), <DOI: doi:10.3389/fphys.2015.00165> page 2, left column, first paragraph-right column, first paragraph; page 9.	1-16
D, A	SHARIFIAGHDAS FARZANEH *et al*. Isolation of human adult stem cells from muscle biopsy for future treatment of urinary incontinence. Urology journal Iran Winter 2011, Vol. 8, N° 1, Pages 54 - 59, ISSN 1735-546X (Electronic), <DOI: pubmed:21404204> page 54; page 55, left column, first paragraph.	1-16
A	NITTA M *et al*. Reconstitution of experimental neurogenic bladder dysfunction using skeletal muscle-derived multipotent stem cells. Journal of urology, 20090401 Lippincott Williams & Wilkins, BALTIMORE, MD, US. 01/04/2009, Vol. 181, N° 4, Pages 45 - 46, ISSN 0022-5347, <DOI: doi:10.1016/S0022-5347(09)60141-5> page 45, right column, last paragraph; page 46, left column, first paragraph.	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2019/070167

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/074 (2010.01)
C12N5/077 (2010.01)
A61K35/34 (2015.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2019/070167

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C12N, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, EMBASE, NPL, MEDLINE, INTERNET

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
D, A	YAN WEI *et al.* Human skeletal muscle-derived stem cells retain stem cell properties after expansion in myosphere culture. Experimental Cell Research, 20110115 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL. Ruas Jorge; Sven, 15/01/2011, Vol. 317, Nº 7, Páginas 1016 - 1027, ISSN 0014-4827, <DOI: doi:10.1016/j.yexcr.2011.01.019> página 1017, columna izquierda, cuarto párrafo; página 1017, columna derecha , primer párrafo; página 1020, columna izquierda, párrafo tercero; página 1020, columna derecha, tercer párrafo; página 1022, columna derecha, primer y segundo párrafos; página 1025, columna derecha, segundo párrafo; resumen.	1-16

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"D" documento citado por el solicitante en la solicitud..

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
15/07/2019	**16 de julio de 2019 (16/07/2019)**
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Nº de fax: 91 349 53 04	Funcionario autorizado S. González Peñalba Nº de teléfono 91 3493025

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2019/070167

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
D, A	TAMAKI TETSURO *et al.* Therapeutic isolation and expansion of human skeletal muscle-derived stem cells for the use of muscle-nerve-blood vessel reconstitution. Frontiers in Physiology JUN 2 2015, 02/06/2015 Vol. 6, Páginas 1-16,Article No.165, ISSN 1664-042X(print) ISSN 1664-042X(electronic), <DOI: doi:10.3389/fphys.2015.00165> página 2, columna izquierda, primer párrafo-columna derecha, primer párrafo; página 9.	1-16
D, A	SHARIFIAGHDAS FARZANEH *et al.* Isolation of human adult stem cells from muscle biopsy for future treatment of urinary incontinence. Urology journal Iran Winter 2011, Vol. 8, Nº 1, Páginas 54 - 59, ISSN 1735-546X (Electronic), <DOI: pubmed:21404204> página 54; página 55, columna izquierda, primer párrafo.	1-16
A	NITTA M *et al.* Reconstitution of experimental neurogenic bladder dysfunction using skeletal muscle-derived multipotent stem cells. Journal of urology, 20090401 Lippincott Williams & Wilkins, BALTIMORE, MD, US. 01/04/2009, Vol. 181, Nº 4, Páginas 45 - 46, ISSN 0022-5347, <DOI: doi:10.1016/S0022-5347(09)60141-5> página 45, columna derecha, último párrafo; página 46, columna izquierda, primer párrafo.	1-16

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2019/070167

CLASIFICACIONES DE INVENCIÓN

C12N5/074 (2010.01)
C12N5/077 (2010.01)
A61K35/34 (2015.01)