

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 152**

51 Int. Cl.:

C12N 5/077 (2010.01)

C12N 5/074 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2020 PCT/EP2020/057940**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2020 WO20193460**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2020 E 20711954 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2024 EP 3942020**

54 Título: **Procedimiento de obtención de células musculares lisas inducidas**

30 Prioridad:

22.03.2019 EP 19164574

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

14.11.2024

73 Titular/es:

INNOVACELL GMBH (100.0%)

Mitterweg 24

6020 Innsbruck, AT

72 Inventor/es:

THURNER, MARCO y

MARKSTEINER, RAINER

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 987 152 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de células musculares lisas inducidas

5 La presente invención se refiere a procedimientos para obtener células musculares lisas inducidas (iSMC), iSMC, iSMC para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o trastorno o para su uso en ingeniería tisular, y el uso de células derivadas de músculo esquelético para obtener iSMC.

10 La degeneración de los músculos lisos, por ejemplo, en los esfínteres, puede causar enfermedades debilitantes tal como la incontinencia fecal. Las células derivadas del músculo esquelético (SMDC) se han utilizado eficazmente en las clínicas para la regeneración de los esfínteres del músculo esquelético, tal como el esfínter anal externo o el esfínter urinario. Sin embargo, se sabe poco sobre la diferenciación del músculo liso *in vitro* y el potencial regenerativo del músculo liso *in vivo* de las células musculares lisas derivadas de SMDC.

15 Los esfínteres son músculos circulares que controlan el movimiento de sólidos y/o líquidos y pueden estar formados por músculo esquelético, tal como el esfínter anal externo, o por músculo liso, tal como el esfínter anal interno y pilórico (Al-Ali et al., 2009; Ramkumar & Schulze, 2005). El mal funcionamiento de los músculos del esfínter del ano y del píloro se asocia con la incontinencia fecal y la gastroparesia, respectivamente (Abrahamsson, 2007; Rao, 2004). La degeneración del músculo liso del esfínter anal interno es una causa conocida de incontinencia fecal pasiva (Vaizey et al., 1997), el principal tipo de incontinencia fecal, que afecta al 78% de todos los pacientes con incontinencia fecal (Mimura et al., 2004). Aunque no pone en peligro la vida, la incontinencia fecal afecta gravemente a la calidad de vida de los pacientes (Meyer y Richter, 2015) y tiene una tasa de prevalencia de hasta el 12% en hombres y mujeres (Goode et al., 2005; Quander et al., 2005). Los tratamientos conservadores, tal como la aplicación de agentes voluminizadores, tienen un éxito limitado en pacientes con una elevada gravedad de incontinencia, y los abordajes quirúrgicos presentan altas tasas de morbilidad y complicaciones (J. Y. Wang & Abbas, 2013).

25 La funcionalidad del tejido muscular liso depende de la existencia de células musculares lisas altamente diferenciadas que expresan proteínas contráctiles tal como la actina alfa del músculo liso (aSMA), la desmina y la smoothelina (SMTN) (Capetanaki et al., 1997; van Eys et al., 2007; J. Wang et al., 2006), así como canales de calcio y potasio funcionales activados por voltaje, lo que permite la inducción de la contracción celular regulada (Sanders, 2008). El aislamiento y uso de células similares para el tratamiento de las deficiencias del músculo liso podría ser una opción terapéutica prometedora. Sin embargo, actualmente no existe en el mercado ninguna terapia con células musculares lisas. El aislamiento de células musculares lisas capaces de regenerar el tejido muscular liso deficiente es un primer requisito previo para abordar el uso clínico de estas células. Un procedimiento de vanguardia para derivar células musculares lisas es el uso de tejido muscular liso como fuente. Estas células musculares lisas primarias se utilizaron eficazmente para la regeneración del músculo liso en un modelo animal de incontinencia fecal pasiva (Bohl et al., 2017); sin embargo, las células musculares lisas primarias son difícilmente accesibles en humanos vivos para el tratamiento autólogo, son heterogéneas por naturaleza y pueden tener una capacidad proliferativa limitada (Sandison & McCarron, 2015), por lo que califican menos como candidato terapéutico celular para la regeneración del músculo liso en humanos. Así, se abordó el uso de células madre/progenitoras altamente proliferativas listas para diferenciarse a células musculares lisas.

40 Se ha demostrado que las células madre/progenitoras tal como las células estromales mesenquimales multipotentes (MSC) y las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) han demostrado albergar potencial de transdiferenciación hacia el linaje del músculo liso (Bajpai et al., 2012; Park et al., 2013), así como potencial regenerativo del músculo liso *in vivo* (Li et al., 2016), 2016). Las iPSC son especialmente prometedoras por su potencial de diferenciación del músculo liso y su funcionalidad *in vitro* (Bajpai et al., 2012), y las células progenitoras del músculo liso derivadas de iPSC han demostrado su potencial regenerativo del esfínter uretral *in vivo* (Li et al., 2016); sin embargo, la preocupación por la seguridad, tal como la inestabilidad genética y la formación de teratomas, limita su utilidad (Jung et al., 2012). Los productos celulares derivados de MSC adultas no causaron grandes problemas de salud en la mayoría de los ensayos clínicos (Y. Wang et al., 2012). Sin embargo, su eficacia clínica en la regeneración del músculo liso sigue siendo difícil de alcanzar.

50 Se descubrió que el tejido muscular esquelético es una fuente de células madre y progenitoras, tales como las MSC y los progenitores miogénicos derivados de células satélite, que se espera que sean altamente regenerativos (Yin et al., 2013). Se ha demostrado que las células derivadas del músculo esquelético (SMDC) enriquecidas para células CD56 positivas mejoran la debilidad del esfínter anal externo asociada a la incontinencia fecal en las clínicas (A. Frudinger et al., 2010, 2015; Andrea Frudinger et al., 2018). Además, se descubrió que las células derivadas del músculo esquelético se injertaban en el músculo detrusor de la vejiga mejorando la función vesical (Huard et al., 2002). Sin embargo, existe un conocimiento limitado sobre la diferenciación de SMDC a células musculares lisas y el aislamiento de las mismas o su capacidad regenerativa *in vivo* (Lu et al., 2011) y ningún estudio ha evaluado el potencial terapéutico de las células musculares lisas derivadas de SMDC (células musculares lisas inducidas) para la regeneración del músculo liso del esfínter.

Los enfoques terapéuticos celulares para la regeneración del tejido muscular liso son muy deseables y se basan en el uso de células competentes para la regeneración del músculo liso. En vista de estos inconvenientes de los procedimientos de la técnica anterior, se necesitan nuevos procedimientos para la obtención de células derivadas de músculo esquelético (SMDC).

5 Frudinger et al. (2018) enseña el aislamiento de células derivadas del músculo esquelético CD56+ denominadas SMDC, como se muestra en la Figura 6 de Frudinger et al. (2018) (Andrea Frudinger et al., 2018). Dichas células se caracterizan, entre otras cosas, por una expresión negativa de α SMA, CD49a y CD146, como se muestra en la Figura 15 de la presente divulgación. Además, como se indica en Frudinger et al. (2018) los SMDC se caracterizan por una expresión positiva de Pax-7 (Andrea Frudinger et al., 2018). Los SMDC descritos
10 en Frudinger et al. (2018) son esquelético-miogénicas, es decir, son capaces de fusionarse a miotubos multinucleados.

El documento EP 2 206 774 A1 se refiere a poblaciones celulares con capacidades de diferenciación que pueden obtenerse por aislamiento a partir de un tejido muscular, más particularmente a partir de un tejido muscular esquelético y/o cardíaco, preferiblemente a partir de tejido endomisio y/o cardíaco (Marolleau et al.,
15 2010). La población celular del documento EP 2 206 774 A1 comprende células ALDH-positivas y, en particular, tienen capacidades de diferenciación miogénica y/o adipogénica y/u osteogénica. En particular, el documento EP 2 206 774 A1 divulga células ALDH+/CD34-, células ALDH+/CD34+ y células SMALD/34+ que son todas CD146- como se muestra en las Tablas 1 y 3 y en la Figura 8 del documento EP 2 206 774 A1. Además, el documento EP 2 206 774 A1 divulga células SMALD/34-. Dichas células son CD146+ y competentes para la
20 fusión, como se muestra en la Figura 3 del documento EP 2 206 774 A1.

Lecourt S et al. (2010) investigan que el músculo esquelético humano es una fuente esencial de diversos progenitores celulares con perspectivas terapéuticas potenciales. Por un lado, se describen células CD56+ que son CD49a- y CD49e+. Por otro lado, células CD56- que son CD146- y SMA- (Lecourt et al., 2010).

Thurner et al. (2018) divulga el desarrollo de un ensayo de potencia *in vitro* para células derivadas de músculo esquelético humano. En particular, se describe el aislamiento de células derivadas del músculo esquelético (SMDC) CD56+ y CD56-. Como se muestra en la Figura 15 de la presente divulgación, tanto las SMDC CD56+ como las SMDC CD56- descritas en Thurner et al. (2018) son α SMA-, CD146- y CD49a-. Además, como se muestra en la Figura 2a de Thurner et al. (2018), las células CD56+ tienen una actividad AChE de > 1000 mUrel/g.
25

30 En la presente invención subyace el problema técnico de proporcionar un procedimiento para obtener iSMC que sean seguras y eficaces para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto. Otro problema técnico subyacente a la presente invención es el suministro de células que sean seguras y eficaces para su uso en la regeneración del tejido muscular liso.

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

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

40 La Figura 1 ilustra la caracterización de las MPC y las MSC derivadas del músculo esquelético en función de su potencial de diferenciación. Potencial de diferenciación de MPC y MSC, evaluado tras diferenciación *in vitro* a linajes adipogénicos, condrogénicos, osteogénicos y miogénicos esqueléticos mediante cultivo en medios de diferenciación respectivos y detectado mediante tinción con oil red o (adipocitos), alcian blue (condrocitos), alizarin red s (osteocitos) y anti-desmina/Hoechst (núcleos y miocitos), respectivamente. Se muestran imágenes representativas (barra de escala = 100 μ m) de al menos tres preparaciones individuales
45 (A). Cuantificación del potencial de diferenciación adipogénica-, condrogénica-, osteogénica- y miogénica-esquelética de las MSC y las MPC mediante el cálculo de la intensidad media de tinción por campo de tinción con oil red o, alcian blue o alizarin red s o mediante el cálculo del índice de fusión de al menos tres muestras individuales, respectivamente (B). Los datos se presentan como media \pm SD de MPC y MSC de al menos tres biopsias musculares individuales. La comparación estadística se realizó mediante pruebas t no apareadas
50 ($p < 0,05$ se consideró significativa).

55 La Figura 2 ilustra la caracterización de las MPC y MSC derivadas del músculo esquelético y de las iSMC derivadas del mismo mediante la expresión de sus marcadores de superficie celular. Expresión superficial de marcadores de linaje mesenquimal (CD105, 90, 73), miogénico (CD56), hematopoyético (CD34) y de músculo liso (CD146 y CD49a) en MPC y MSC derivadas de músculo esquelético, así como en iSMC derivadas de las mismas, procedentes de al menos tres biopsias individuales de músculo esquelético humano evaluadas mediante citometría de flujo. Como control, se demuestra la expresión de los marcadores del linaje del músculo liso CD146 y CD49a en poblaciones de células musculares lisas derivadas de la vejiga humana (hBd-SMC). Los datos se presentan como media \pm SEM.

La Figura 3 ilustra la expresión de marcadores intracelulares en SMDC (MPC y MSC) y iSMC. La detección de marcadores miogénicos generales (Desmina) y miogénicos del músculo liso (aSMA, Smoothelina) en MPC y MSC así como en iSMC derivadas de las mismas se realizó mediante inmunocitoquímica y se muestran imágenes representativas (barra de escala = 100 μ m) (A). El porcentaje de células positivas para aSMA, Smoothelina o Desmina en las MPC, las MSC y las iSMC derivadas de las mismas, evaluado mediante la cuantificación de las células que expresan los marcadores correspondientes en imágenes inmunocitoquímicas de cultivos procedentes de al menos tres biopsias musculares humanas individuales (B). Los datos se presentan como media \pm SEM.

La Figura 4 ilustra los cambios en la expresión génica durante la transdiferenciación de SMDC (MPC y MSC) a iSMC. Los cambios en la expresión génica se evaluaron mediante análisis de microarrays de MSC y MPC a MSC-iSMC y MPC-iSMC, cultivadas en medio de crecimiento (MSC y MPC) o de diferenciación de músculo liso (MSC-iSMC y MPC-iSMC) durante 6 días, respectivamente, derivadas de dos biopsias individuales de músculo humano. En los mapas de calor se muestran grupos de genes regulados al alza (A) o a la baja (B) de forma similar tanto en las MSC como en las MPC tras la diferenciación de las iSMC obtenida mediante agrupación de k-means. Los asteriscos (*) marcan los genes que fueron regulados al alza (\log_2 FC \geq 1) o a la baja (\log_2 FC \leq -1) en ambos tipos celulares. La comparación estadística se realizó mediante la prueba de chi-cuadrado, considerando significativo un valor p menor que 0.05. Los resultados del cambio en la expresión génica se muestran en (C).

La Figura 5 ilustra la competencia de fusión de las MPC y las iSMC. La formación de miotubos (competencia de fusión) se observó mediante microscopía de fluorescencia tras la tinción con Hoechst33342 para la visualización de los núcleos. A partir de las imágenes, se determinó el índice de fusión (FI) (A) y el número de núcleos por tubo (B). Las células con al menos 3 núcleos se contaron como tubos. Las mediciones se compararon entre las MPC y las iSMC derivadas de las mismas.

La Figura 6 ilustra la formación de canales iónicos funcionales durante la transdiferenciación de MPC a iSMC. Análisis de las corrientes entrantes de calcio (A) y salientes de potasio (B) dependientes del voltaje en las MPC y las iSMC derivadas de las mismas, así como en células musculares lisas derivadas de la vejiga (hBd-SMC). Las curvas de impedancia-voltaje (I-V) de al menos tres células de MPC, iSMC (derivadas de MPC) y hBd-SMC demuestran la presencia de canales Ca_v (A) y K_v (B) funcionales en iSMC (derivadas de MPC) y hBd-SMC, pero no en MPC.

La Figura 7 ilustra la contractilidad de las SMDC y las iSMC en matrices de gel de colágeno. Contractilidad de las SMDC (MSC y MPC), iSMC derivadas de las mismas y células musculares lisas derivadas de la vejiga (hBd-SMC) cuantificada mediante contracción en matriz de gel de colágeno. Porcentaje de contracción del gel a partir del tamaño original en 48 horas de células obtenidas por el paso (a) de la presente invención (MPC o MSC) y células obtenidas por transdiferenciación a iSMC por el paso (b) de la presente invención, así como células musculares lisas de control de vejiga humana (hBd-SMC) mostradas como gráfico de barras (A). Los datos se presentan como Media \pm SEM de preparaciones celulares de al menos tres biopsias musculares humanas individuales o análisis de hBd-SMC. Imágenes estereomicroscópicas representativas de los gels de colágeno con MSC embebidas y MSC e iSMC derivadas cada una de las mismas, así como hBd-SMC en pocillos de una placa de 24 pocillos (B).

La Figura 8 ilustra el fenotipo de células musculares lisas de las iSMC derivadas de mMPC y su injerto en tejido muscular liso *in vivo*. Porcentaje de células positivas para Desmina y aSMA en las iSMC derivadas de MPC murinas representadas como gráfico de barras (A). Detección de la señal de fluorescencia de las perlas fluorescentes y del transgén TdTomato que expresa la localización en el músculo intacto del esfínter pilórico mediante imágenes *in vivo* (B). La expresión de la proteína actina alfa del músculo liso (aSMA), la expresión de TdTomato, de las iSMC injertadas, y la superposición (MERGE) de la proteína TdTomato y aSMA se detectó mediante inmunohistoquímica en secciones histológicas del esfínter pilórico 12 semanas después de la implantación. La contratinción de los núcleos en cada imagen se realizó mediante DAPI. Se muestran imágenes representativas de n=8 ratones inyectados (C).

La Figura 9 ilustra imágenes de microscopía óptica y electrónica de barrido de anillos de tejido. Imágenes de microscopía óptica de un anillo tisular obtenido por cultivo en 3D de iSMC derivadas de MPC situadas alrededor del poste central de un molde de agarosa a diferentes aumentos (A y B). Imágenes de microscopía electrónica de barrido de un anillo tisular obtenido mediante el cultivo en 3D de iSMC derivadas de MPC a diferentes aumentos (C y D).

La Figura 10 ilustra la expresión de proteínas contráctiles en anillos tisulares derivados de SMDC e iSMC mediante inmunofluorescencia. Tinción de inmunofluorescencia de marcadores miogénicos generales (Desmina) y miogénicos de músculo liso (aSMA) junto con contratinción de núcleos (Hoechst) realizada en criosecciones de anillos de tejido obtenidos del cultivo en 3D de MPC así como de iSMC derivadas de las mismas.

La Figura 11 ilustra imágenes de microscopía electrónica de transmisión de anillos de tejido. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de anillos de tejido seccionados ultrafinos obtenidos por

cultivo 3D de iSMC que muestran calvéolas (puntas de flecha) en la membrana celular de dos células adyacentes (A y B), abundantes estructuras filamentosas dentro del citoplasma (C) y a cuerpos densos que acumularon filamentos (flechas) (D).

5 En la Figura 12 se enumera la cuantificación de los cambios en la expresión génica durante la transdiferenciación de SMDC (MPC y MSC) a iSMC. Los cambios en la expresión génica se evaluaron mediante análisis de microarrays de MSC y MPC a MSC-iSMC y MPC-iSMC, cultivadas en medio de crecimiento (MSC y MPC) o de diferenciación de músculo liso (MSC-iSMC y MPC-iSMC) durante 6 días, respectivamente, derivadas de dos biopsias individuales de músculo humano. Se muestran los cambios de pliegues Log2 de los genes asociados al músculo liso en muestras de MSC frente a MSC-iSMC (MSC) y de MPC frente a MPC-iSMC (MPC) para comparar la diferenciación del músculo liso entre MSC y MPC. Los asteriscos (*) marcan genes regulados al alza ($\text{Log}_2 \geq 1$) o a la baja ($\text{Log}_2 \leq -1$).

10 La Figura 13 ilustra el análisis de citometría de flujo de MPC-iSMC murinas teñidas con anticuerpo anti-CD49e y teñidas con control del isotipo según el ejemplo 15. Diagramas de puntos de control de isotipo IgG1 (A) y MPC-iSMC positivas anti-CD49e (B) que muestran un 0.14% de células de control y un 9.5% de células CD49e positivas, respectivamente.

15 La Figura 14 ilustra el análisis de la actividad ACHE y CK de las MPC y MPC-iSMC, en el que se midieron las actividades enzimáticas antes y después del cultivo de las células en medio de diferenciación de músculo esquelético (SKDiff)
 20 Se midió y comparó la actividad AChE (A) y la actividad CK (B) en MPC y MPC-iSMC antes y después del cultivo en medio de diferenciación de músculo esquelético (SKDiff) durante 6 días. Datos presentados como $\text{media} \pm \text{SEM}$ de células derivadas de al menos tres biopsias individuales de músculo humano. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de muestras apareadas considerando $p < 0.05$ como significativo.

25 La Figura 15 ofrece una visión general de las propiedades y la expresión de marcadores de los distintos tipos celulares descritos en el presente documento. El SMDC CD56+ y el SMDC CD56- (Thurner et al 2018) y el SMDC (Frudinger et al. 2018) se obtuvieron como se describe en el Ejemplo 18. Las MPC y MSC se obtuvieron como se describe en el Ejemplo 1. Las MPC-iSMC y las MSC-iSMC se obtuvieron como se describe en el Ejemplo 2. La expresión de un determinado marcador se indica como "+", si al menos el 50 % de las células de la población celular analizada expresan el marcador celular respectivo. La expresión de un determinado marcador se indica como "-", si menos del 50 % de las células de la población celular analizada expresan el marcador celular respectivo. La actividad enzimática AChE de una determinada población celular se indica como "+" si la población celular tiene una actividad AChE de al menos 1000 mUrel/mg de proteína, medida según el Ejemplo 17. La actividad enzimática AChE de una determinada población celular se indica como "-", si la población celular tiene una actividad AChE menor que 1000 mUrel/mg de proteína medida según el Ejemplo 17. La actividad enzimática CK de una determinada población celular se indica como "+" si la población celular tiene una actividad CK de al menos 100 mUrel/mg de proteína, medida según el Ejemplo 17. La actividad enzimática CK de una determinada población celular se indica como "-", si la población celular tiene una actividad CK menor que 100 mUrel/mg de proteína medida según el Ejemplo 17.

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

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

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

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

50 El término "célula derivada de músculo esquelético" o "SMDC" se refiere a células obtenidas de tejido muscular esquelético que comprenden células competentes para la fusión como, por ejemplo, mioblastos o células no competentes para la fusión, como por ejemplo, células madre mesenquimatosas multipotentes, que pueden ser células primarias y/o células cultivadas in vitro, así como otras células con potencial miogénico o de múltiples diferenciaciones (por ejemplo, de tejido aspirado por liposucción u otros tejidos que contienen células madre, tal como la médula ósea)." El término también comprende las células derivadas del tejido adiposo que pueden aislarse y utilizarse para la diferenciación de células musculares lisas. El término "célula derivada del músculo esquelético" o "SMDC" también se refiere a una población celular aislada del tejido muscular.

El término "células musculares lisas derivadas de la vejiga humana (hBd-SMC)" se refiere a poblaciones de células que comprenden células musculares lisas de la vejiga humana. Las hBd-SMC están disponibles comercialmente en PromoCell® (Número de catálogo: C-12571) y representan las características fenotípicas y funcionales de las células musculares lisas que en la presente invención se prevé obtener mediante iSMC derivadas de células derivadas de músculo esquelético.

El término "inyección", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la expulsión de una solución de inyección que comprende las células mencionadas anteriormente fuera de un dispositivo de inyección en un sitio específico dentro del cuerpo humano, en particular en o adyacente al tejido muscular que proporciona la continencia anal. El procedimiento de inyección puede ser, pero no se limita a, estático, es decir, el dispositivo de inyección permanece en la posición alcanzada. Alternativamente, el procedimiento de inyección es dinámico. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente invención, la inyección se produce simultáneamente con la retracción del dispositivo de inyección del lugar de la inyección.

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

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

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

El término "incontinencia pasiva", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la falta de reconocimiento sensorial de la pérdida de heces. Esto incluye valores bajos de presión anal, debido a un defecto en el músculo liso del esfínter anal interno y/o una capacidad sensorial deficiente de la mucosa anal y rectal.

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

El término "CD56-" o "CD56 negativo", utilizado en el presente documento, se refiere a una célula que no expresa el marcador celular CD56. Los términos "CD56-" o "CD56 negativo" también pueden utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferiblemente menos del 50% o como máximo el 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 por ciento de la población celular expresa el marcador celular CD56.

El término "multipotente", como se utiliza en el presente documento, se refiere al potencial de diferenciación de las células mesenquimales caracterizado por un potencial de diferenciación *in vitro* al menos hacia linajes adipogénicos, condrogénicos y osteogénicos.

El término "oligopotente", como se utiliza en el presente documento, se refiere al potencial de diferenciación de las células mesenquimales caracterizado por un potencial de diferenciación *in vitro* limitado a los linajes miogénicos tal como el músculo liso, estriado y cardíaco.

El término "células mesenquimales", como se utiliza en el presente documento, se refiere a células positivas para CD105, CD90 y CD73 y negativas para CD14, CD19, CD34, CD45 y HLA-DR (MHCII).

El término "CD34+" o "CD34 positivo", utilizado en el presente documento, se refiere a una célula que expresa el marcador celular CD34. Los términos "CD56+" o "CD56 positivo" también pueden utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferiblemente al menos el 80, 90, 95, 98 o 99 por ciento de la población celular expresa el marcador celular CD56.

El término "CD34-" o "CD34 negativo", utilizado en el presente documento, se refiere a una célula que no expresa el marcador celular CD34. Los términos "CD34-" o "CD34 negativo" también pueden utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferiblemente menos del 50% o como máximo el 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 por ciento de la población celular expresa el marcador celular CD34. En una realización particularmente preferente, el término "CD34-" o "CD34 negativo" puede utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferiblemente como máximo el 19, 10, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 por ciento de la población celular expresa el marcador celular CD34.

El término "CD146+" o "CD146 positivo", utilizado en el presente documento, se refiere a una célula que expresa el marcador celular CD146. Los términos "CD146+" o "CD146 positivo" también pueden utilizarse para

una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferentemente al menos el 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 o 99 por ciento de la población celular expresa el marcador celular CD146.

5 El término "CD146-" o "CD146 negativo", utilizado en el presente documento, se refiere a una célula que no expresa el marcador celular CD146. Los términos "CD146-" o "CD146 negativo" también pueden utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferiblemente menos del 50% o como máximo el 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 por ciento de la población celular expresa el marcador celular CD146.

10 El término "CD49a+" o "CD49a positivo", utilizado en el presente documento, se refiere a una célula que expresa el marcador celular CD49a. Los términos "CD49a+" o "CD49a positivo" también pueden utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferiblemente al menos el 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 o 99 por ciento de la población celular expresa el marcador celular CD56.

15 El término "CD49a-" o "CD49a negativo", utilizado en el presente documento, se refiere a una célula que no expresa el marcador celular CD49a. Los términos "CD49a-" o "CD49a negativo" también pueden utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferiblemente menos del 50% o como máximo el 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 por ciento de la población celular expresa el marcador celular CD49a.

20 El término "CD73+" o "CD73 positivo", utilizado en el presente documento, se refiere a una célula que expresa el marcador celular CD73. Los términos "CD73+" o "CD73 positivo" también pueden utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferentemente al menos el 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 o 99 por ciento de la población celular expresa el marcador celular CD73.

25 El término "CD73-" o "CD73 negativo", utilizado en el presente documento, se refiere a una célula que no expresa el marcador celular CD73. Los términos "CD73-" o "CD73 negativo" también pueden utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferiblemente menos del 50% o como máximo el 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 por ciento de la población celular expresa el marcador celular CD73.

El término "CD90+" o "CD90 positivo", utilizado en el presente documento, se refiere a una célula que expresa el marcador celular CD90. Los términos "CD90+" o "CD90 positivo" también pueden utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferentemente al menos el 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 o 99 por ciento de la población celular expresa el marcador celular CD90.

30 El término "CD90-" o "CD90 negativo", utilizado en el presente documento, se refiere a una célula que no expresa el marcador celular CD90. Los términos "CD90-" o "CD90 negativo" también pueden utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferiblemente menos del 50% o como máximo el 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 por ciento de la población celular expresa el marcador celular CD90.

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

40 El término "CD105-" o "CD105 negativo", utilizado en el presente documento, se refiere a una célula que no expresa el marcador celular CD105. Los términos "CD105-" o "CD105 negativo" también pueden utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferiblemente menos del 50% o como máximo el 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 por ciento de la población celular expresa el marcador celular CD105.

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

50 El término "aSMA-" o "aSMA negativo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una célula que no expresa el marcador celular aSMA. Los términos "aSMA-" o "aSMA negativo" también pueden utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferiblemente menos del 50% o como máximo el 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 por ciento de la población celular expresa el marcador celular aSMA.

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

El término "desmina negativa" o "desmina-", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una célula que no expresa el marcador celular desmina. El término "desmina negativa" también puede utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferiblemente menos del 50% o como máximo el 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 por ciento de la población celular expresa el marcador celular desmina.

5 El término "smoothelina positiva" o "smoothelina+", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una célula que expresa el marcador celular smoothelina. El término "smoothelina positiva" también puede utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferiblemente al menos el 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 o 99 por ciento de la población celular expresa el marcador celular smoothelina.

10 El término "smoothelina negativa" o "smoothelina-", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una célula que no expresa el marcador celular smoothelina. El término "smoothelina negativa" también puede utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferiblemente menos del 50% o como máximo el 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 por ciento de la población celular expresa el marcador celular smoothelina.

15 El término "competente en fusión" o "esquelético-miogénico", como se utiliza en el presente documento, se refiere a células capaces de fusionarse en miotubos multinucleados con al menos 50, 60, 70, 80, 90 o 100 por ciento de núcleos dentro de miotubos multinucleados tras el cultivo en medios de diferenciación de músculo esquelético durante 5-7 días.

20 El término "no competente en fusión" o "no esquelético-miogénico", como se utiliza en el presente documento, se refiere a células no capaces de fusionarse en miotubos multinucleados con menos del 50% o como máximo el 49, 30, 20, 10 o 0 por ciento de núcleos dentro de miotubos multinucleados tras el cultivo en medios de diferenciación de músculo esquelético durante 5 - 7 días.

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

30 El término "medio de diferenciación de músculo liso", como se utiliza en el presente documento, se refiere a los medios de cultivo celular que inducen la transdiferenciación de las células a un fenotipo de músculo liso. Sin embargo, dicho término se refiere también al medio de cultivo celular que no comprende ninguna sustancia necesaria para la inducción de la transdiferenciación, en caso de que las células sean capaces de transdiferenciarse sin una inducción respectiva.

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

El término "contráctil", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la contracción de la matriz de gel de colágeno de al menos un 40 % del tamaño inicial del gel en 48 horas.

El término "no contráctil", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la contracción de la matriz de gel de colágeno de menos del 40 % del tamaño inicial del gel en 48 horas.

40 El término "TGF-beta" se utiliza para el factor de crecimiento transformante beta que es una citoquina multifuncional perteneciente a la superfamilia del factor de crecimiento transformante que incluye tres isoformas diferentes (TGF- β 1, 2 y 3) y muchas otras proteínas de señalización producidas por todos los linajes de glóbulos blancos. El término "TGF-beta" se utiliza como sinónimo de los términos "TGF- β ", "TGF-b", "TGFb" y "TGFB".

45 El término "AChE positiva" o "AChE+", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una actividad enzimática de acetilcolinesterasa de al menos $1 \cdot 10^3$ mUrel por mg de proteína celular medida en células que han sido cultivadas en un medio de diferenciación de músculo liso como, por ejemplo, se describe en los ejemplos del presente documento. Alternativamente, la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa puede comprobarse mediante cualquier prueba conocida en la técnica como, por ejemplo, la descrita en Thurner et al., 2018.

50 El término "AChE negativa" o "AChE-", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una actividad enzimática de acetilcolinesterasa menor que $1 \cdot 10^3$ mUrel por mg de proteína celular medida en células que se han cultivado en un medio de diferenciación de músculo liso como, por ejemplo, se describe en los ejemplos del presente documento. Alternativamente, la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa puede comprobarse mediante cualquier prueba conocida en la técnica como, por ejemplo, la descrita en Thurner et al., 2018.

55

El término "CK positiva" o "CK+", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una actividad de creatina cinasa de al menos $1 \cdot 10^2$ mU_{rel} por mg de proteína celular medida en células que han sido cultivadas en un medio de diferenciación de músculo liso como, por ejemplo, se describe en los ejemplos del presente documento. Alternativamente, la actividad de la creatina cinasa puede analizarse mediante cualquier prueba conocida en la técnica como, por ejemplo, la descrita en Thurner et al., 2018.

El término "CK negativa" o "CK-", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una actividad enzimática de la creatina cinasa menor que $1 \cdot 10^2$ mU_{rel} por mg de proteína celular medida en células que han sido cultivadas en un medio de diferenciación de músculo liso como, por ejemplo, se describe en los ejemplos del presente documento. Alternativamente, la actividad de la creatina cinasa puede analizarse mediante cualquier prueba conocida en la técnica como, por ejemplo, la descrita en o como un experto en la técnica llevaría a cabo el análisis (Thurner et al. 2018).

El término "CD49e+" o "CD49e positivo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una célula que expresa el marcador celular CD49e. Los términos "CD49e+" o "CD49e positivo" también pueden utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferentemente al menos el 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 o 99 por ciento de la población celular expresa el marcador celular CD49e.

El término "CD49e-" o "CD49e negativo", utilizado en el presente documento, se refiere a una célula que no expresa el marcador celular CD49e. Los términos "CD49e-" o "CD49e negativo" también pueden utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferiblemente menos del 50% o como máximo el 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 por ciento de la población celular expresa el marcador celular CD49e.

El término "Pax-7+" o "Pax-7 positivo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una célula que expresa el marcador celular Pax-7. Los términos "Pax-7+" o "Pax-7 positivo" también pueden utilizarse para una población celular que comprenda diferentes tipos celulares, si preferiblemente al menos el 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 o 99 por ciento de la población celular expresa el marcador celular Pax-7.

El término "Pax-7-" o "Pax-7 negativo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una célula que no expresa el marcador celular Pax-7. Los términos "Pax-7-" o "Pax-7 negativo" también pueden utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferiblemente menos del 50% o como máximo el 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 por ciento de la población celular expresa el marcador celular Pax-7.

El término "SSEA4+" o "SSEA4 positivo", como se utiliza en el presente documento se refiere a una célula que expresa el marcador celular SSEA4. Los términos "SSEA4+" o "SSEA4 positivo" también pueden utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferentemente al menos el 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 o 99 por ciento de la población celular expresa el marcador celular SSEA4.

El término "SSEA4-" o "SSEA4 negativo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una célula que no expresa el marcador celular SSEA4. Los términos "SSEA4-" o "SSEA4 negativo" también pueden utilizarse para una población celular que comprende diferentes tipos de células, si preferiblemente menos del 50% o como máximo el 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 por ciento de la población celular expresa el marcador celular SSEA4.

El término "MPC" o "MPC", como se utiliza en el presente documento, se refiere a células progenitoras miogénicas. En particular, el término "MPC" se refiere a las células progenitoras miogénicas que se caracterizan por una expresión negativa de aSMA, CD49a y CD146. Las MPC son esquelético-miogénicas y no multipotentes. Las MPC pueden caracterizarse además por una expresión positiva de CD105, CD90, CD73, CD56, desmina, ACHE y/o CK y/o una expresión negativa de CD34. En la Figura 15 se muestra un ejemplo de las propiedades de las MPC.

El término "MSC" o "MSC", como se utiliza en el presente documento, se refiere a células estromales mesenquimales. En particular, el término "MSC" o "MSC" se refiere a células estromales mesenquimales que se caracterizan por una expresión negativa de aSMA, CD49a y CD146. Las MSC no son competentes para la fusión y no son esquelético-miogénicas, pero sí multipotentes. Las MSC pueden caracterizarse además por una expresión positiva de CD105, CD90, CD73 y/o desmina y/o una expresión negativa de CD56, CD34, desmina, ACHE y/o CK. En la Figura 15 se muestra un ejemplo de las propiedades de las MSC.

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan procedimientos para obtener células musculares lisas inducidas (iSMC) a partir de células derivadas de músculo esquelético (SMDC).

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

Células musculares lisas inducidas derivadas de células musculares esqueléticas

Un primer objeto de la presente invención se dirige a un procedimiento para obtener células musculares lisas inducidas (iSMC), comprendiendo el procedimiento los pasos de: (a) aislar células derivadas de músculo

esquelético a partir de tejido muscular esquelético obtenido de un sujeto; b) transdiferenciar células derivadas de músculo esquelético cultivando las células en un medio que contenga TGF-beta, en particular TGFb1, TGFb2 y/o TGFb3, y heparina para obtener iSMC. En una realización particularmente preferente, las células derivadas del músculo esquelético se transdiferencian en el paso (b) cultivando las células en un medio que contiene TGFb1 y/o TGFb3, más preferiblemente TGFb1, y heparina para obtener iSMC. El paso (b) de la presente invención se realiza *in vitro* o *ex vivo*. En consecuencia, el procedimiento según la presente invención es un procedimiento *in vitro* o *ex vivo*.

En una realización preferente de la presente invención, el paso (b) se lleva a cabo en un medio de cultivo celular que contiene 1-10 µg/ml de TGFb1 y 10-30 µg/ml de Heparina o 1-6 U/ml de Heparina.

En una realización preferente las iSMC obtenidas según un procedimiento de la presente invención, preferiblemente en el paso (b) del procedimiento según la presente invención, se caracterizan por la expresión positiva de aSMA, CD49a, y CD146.

Las células derivadas del músculo esquelético son células progenitoras miogénicas (MPC) caracterizadas por la expresión positiva de CD56 y desmina, y la expresión negativa de CD34; alternativamente, las células derivadas del músculo esquelético son células estromales mesenquimales (MSC) caracterizadas por la expresión positiva de CD105, CD73, y la expresión negativa de CD34, y CD56.

En una realización preferente de la invención, las células derivadas del músculo esquelético son MPC oligopotentes.

En otra realización preferente de la presente invención, las células derivadas del músculo esquelético son MSC caracterizadas por la expresión negativa de desmina y/o la expresión positiva de CD90.

En otra realización preferente de la presente invención, las células derivadas del músculo esquelético son MSC multipotentes.

Preferiblemente, en el procedimiento según la presente invención se prevé que las iSMC obtenidas a partir de MPC en el paso (b) se caractericen por la expresión positiva de aSMA, CD49a, desmina, CD56 y CD146, y la expresión negativa de CD34; y se prevé que las iSMC obtenidas a partir de MSC en el paso (b) se caractericen por la expresión positiva de aSMA, CD49a y CD 146, y la expresión negativa de CD56.

En otra realización preferente de la invención, las iSMC obtenidas a partir de MPC en el paso (b) se caracterizan además por una expresión positiva de smoothelina.

En otra realización preferente de la presente invención, las iSMC obtenidas a partir de MSC en el paso (b) se caracterizan además por una expresión negativa de desmina y/o CD34.

CD73 o 5'-nucleotidasa (5'-NT), también conocida como ecto-5'-nucleotidasa, es una enzima que en humanos está codificada por el gen NT5E. CD73 sirve comúnmente para convertir AMP en adenosina. CD73 se expresa en linfocitos, fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliales y mioblastos. CD73 es un marcador de células estromales mesenquimales multipotentes (MSC) según los criterios mínimos para MSC sugeridos por la sociedad internacional de terapia celular (ISCT) (Dominici et al., 2006).

CD105 también se conoce como Endogлина. Es una proteína homodímera de membrana integral de tipo I con subunidades de 90 kD que se encuentra en las células endoteliales vasculares y en los sincitiotrofoblastos de la placenta. CD105 se expresa débilmente en los fibroblastos estromales. También se expresa en monocitos activados y macrófagos tisulares. La expresión de CD105 aumenta en el endotelio activado en los tejidos que sufren angiogénesis, tales como en los tumores, o en casos de cicatrización de heridas o inflamación dérmica. El CD105 es un componente del sistema receptor de TGF-β en las células endoteliales de la vena umbilical humana y se une a TGF-β1 y β3 con gran afinidad. CD105 es un marcador de células estromales mesenquimales multipotentes (MSC) según los criterios mínimos para MSC sugeridos por la sociedad internacional de terapia celular (ISCT) (Dominici et al., 2006). Como la presente invención prevé el aislamiento de iSMC a partir de MPC y/o MSC mediante la incubación de estas últimas con TGFb, la expresión de CD105 debido a su papel como co-receptor de TGFb puede ser útil para el éxito del procedimiento descrito en el presente documento. La presente invención, por lo tanto, divulga el aislamiento de MSC o MPC (Ejemplo 1) que son CD105 positivos (Figura 2) y por lo tanto útiles para el aislamiento de iSMC (Ejemplo 2).

La expresión de CD34 se describió en células madre derivadas de músculo y células satélite quiescentes (Qu-Petersen et al., 2002). Además, las células derivadas del músculo esquelético CD34 positivas mostraron una regeneración mejorada de la distrofina en el músculo esquelético distrófico (Jankowski et al., 2002). La vanguardia es el uso de células derivadas de músculo esquelético CD34+ para la generación de células de músculo liso *in vitro* y el uso de células derivadas de músculo esquelético CD34+ para el aumento de músculo liso (Capelli et al., 2002). Sin embargo, los músculos lisos endógenos normales son generalmente CD34 negativos (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000174059-CD34/tissue/primary+data>) pero los músculos lisos en estado tumorigénico se convierten frecuentemente en CD34+ (van de Rijn et al., 1994). Así, las células obtenidas por los procedimientos de la presente invención que carecen de CD34, podrían ser ventajosas para

la regeneración del músculo liso y menos propensas a la transformación maligna. Siguiendo los procedimientos de la presente invención, se obtienen células derivadas de músculo esquelético CD34 negativas en un primer paso y se diferencian a iSMC CD34 negativas en un segundo paso (Ejemplos 1 y 2).

5 CD146 es una proteína de superficie y receptor de laminina alfa 4, que está presente en la matriz extracelular del tejido muscular liso en desarrollo (Iivanainen et al., 1995). Además, se demostró que CD146 se expresa en células madre derivadas de médula ósea comprometidas con el linaje del músculo liso (Espagnollet et al., 2014). Como se muestra en la Figura 2, las células musculares lisas derivadas de la vejiga son positivas para CD146. Resumiendo, las células CD146+ marcan una población de células comprometidas con el músculo liso como preferentes para el uso de regeneración de músculo liso y/o ingeniería de tejidos. Los presentes procedimientos 10 permiten aislar iSMC CD146+ a partir de células derivadas del músculo esquelético.

La CD56, también conocida como molécula de adhesión celular neural (NCAM) es un marcador de compromiso miogénico expresado en mioblastos de músculo esquelético *in vitro* (Belles-Isles et al., 1993) y tejido muscular liso *in vivo* (Romanska et al., 1996). La CD56 está presente en los SMDC desmina+ competentes para la fusión (denominados en el presente documento MPC), así como en los iSMC originados a partir de estos últimos. La 15 CD56 es el principal marcador de discriminación entre las MPC y las MCS derivadas del músculo esquelético descritas en el presente documento, ya que tanto las MSC como las iSMC originadas a partir de estas últimas son CD56 negativas. Las iSMC CD56+ obtenidas mediante la presente invención podrían ser las más adecuadas para la regeneración del músculo liso.

La actina alfa del músculo liso (aSMA) es uno de los primeros marcadores del compromiso del músculo liso durante el desarrollo (McHugh, 1995). Su presencia es esencial para la función y la contractilidad debidas a la mecanotransducción en las células musculares lisas (J. Wang et al., 2006). Por lo tanto, el uso de aSMA como 20 marcador de iSMC, destinado a la regeneración de la función del músculo liso, es esencial. Los presentes procedimientos (Ejemplo 2) permiten la generación de células aSMA+ a partir de células derivadas de músculo esquelético (Figura 3).

La desmina es uno de los primeros marcadores miogénicos conocidos presente en todos los tipos de músculo. La falta de desmina puede provocar la degeneración y el mal funcionamiento del músculo (Capetanaki et al., 1997). Así pues, es preferente utilizar células desmina+ para la regeneración muscular. Como se muestra en 25 la figura 3, las iSMC derivadas de MPC son desmina positivas.

La CD49a o proteína integrina alfa (también VLA-1), resultante de la expresión y traducción del gen *ITGA1* está presente durante el desarrollo del músculo liso especialmente encontrado en tejido muscular liso tal como la aorta (Belkin et al., 1990). Los presentes procedimientos permiten aislar iSMC CD49a positivas a partir de MPC o MSC CD49a negativas. Como se muestra en la Figura 2, las células musculares lisas derivadas de la vejiga humana (hBd-SMC) también son positivas para CD49a. 30

La funcionalidad del tejido muscular liso depende de la existencia de células musculares lisas altamente diferenciadas que expresan proteínas contráctiles tal como la smoothelina (Niessen et al., 2005). Además, la smoothelina es un marcador bien conocido de las células musculares lisas completamente diferenciadas y es el primer marcador que desaparece cuando el músculo liso se ve comprometido (van Eys et al., 2007). Así pues, el uso de células smoothelinas+ en la regeneración del tejido muscular liso podría ser favorable. Los procedimientos actuales (Ejemplos 2 y 5) permiten aislar las iSMC smoothelina+ de las MPC smoothelina- 35 (Figura 3).

Como se ha descrito anteriormente, los marcadores mencionados CD146, CD56, aSMA, CD34, desmina, CD49a, smoothelina son importantes para la identificación y/o función de las células musculares lisas, la combinación de los marcadores podría ser favorable para identificar iSMC adecuadas para la regeneración del músculo liso. Los procedimientos demostrados en el presente documento permiten aislar iSMC con 40 combinaciones de los marcadores abordados (Ejemplo 2).

En detalle, la presente invención proporciona un procedimiento para obtener iSMC a partir de MPC derivadas de músculo esquelético. Las iSMC obtenidas a partir de MPC son CD56+, aSMA+, CD49a+, desmina+, CD146+ y CD34-. Estos últimos marcadores descritos anteriormente son ventajosos para identificar las células musculares lisas, ya que, por ejemplo, las hBd-SMC son positivas para CD146 y CD49a (Figura 2) y, por lo tanto, son preferibles para las células utilizadas como células regeneradoras del músculo liso. La combinación 50 de la expresión de los marcadores CD56+, aSMA+, CD49a+, desmina+, CD146+ y CD34- es ventajosa y novedosa para las iSMC generadas *in vitro* a partir de MPC derivadas de músculo esquelético humano.

Además, la presente invención proporciona un procedimiento para obtener iSMC a partir de MSC derivadas de músculo esquelético. Las iSMC derivadas de MSC de músculo esquelético son aSMA+, CD146+ CD49a+, 55 CD56-, y preferiblemente también desmina- y/o CD34-. La expresión positiva de aSMA, CD49a y CD146 y la expresión negativa de CD56 y preferiblemente también de CD34 es adecuada para identificar estas células como células musculares lisas derivadas de MSC y es relevante para la función de las iSMC como células regeneradoras del músculo liso. La combinación de la expresión de los marcadores aSMA+, CD146+, CD49a+

y CD56 en iSMC procedentes de MSC derivadas de músculo esquelético es ventajosa y novedosa respecto a procedimientos anteriores en la técnica.

5 En otra realización preferente de la presente invención, el procedimiento comprende que después del paso (a) se realiza un paso (a1) que comprende la proliferación de las células derivadas de músculo esquelético, preferiblemente para recibir $20-40 \times 10^6$ células.

En una realización preferente particular de la presente invención, las células derivadas de músculo esquelético se proliferan para recibir 50×10^6 células.

En otra realización preferente de la presente invención, el paso (b) se lleva a cabo durante uno a seis días. En una realización preferente particular de la presente invención, el paso (b) se lleva a cabo de tres a seis días.

10 Otro objeto de la presente invención se dirige a una población de células musculares lisas inducidas (iSMC) obtenidas por un procedimiento según la presente invención, en el que las iSMC obtenidas en el paso (b) no son competentes para la fusión y se caracterizan por la expresión positiva de aSMA, CD49a y CD146.

15 En otra realización preferente de la presente invención, la población de células musculares lisas inducidas (iSMC) obtenidas a partir de MPC se caracterizan por la expresión positiva de aSMA, CD49a, desmina, CD56, y CD146, y la expresión negativa de CD34.

Como ya se ha indicado anteriormente, la combinación de marcadores presentes, aSMA, CD49a, desmina, CD56 y CD146, o ausentes, CD34, en las iSMC de las MPC es ventajosa para fenocopiar el perfil de expresión natural de las células musculares lisas mediante los procedimientos descritos en el presente documento.

Las células musculares lisas inducidas (iSMC) obtenidas a partir de MPC no son competentes para la fusión.

20 La fusión de células progenitoras miogénicas (MPC) de un solo núcleo u otras células derivadas del músculo competentes para la fusión (por ejemplo, mioblastos) en miotubos multinucleados es un requisito previo para la formación y regeneración del músculo esquelético (Rochlin et al., 2010). Sin embargo, como el tejido muscular liso *in vivo* no está formado por miotubos multinucleados, sino por células musculares lisas diferenciadas de un solo núcleo, para la regeneración del músculo liso resulta ventajoso disponer de células
25 no competentes en fusión. Así, la presente invención prevé que las iSMC procedentes de MPC, así como las iSMC procedentes de MSC, sean competentes sin fusión. Mientras que las MPC obtenidas como se muestra en el Ejemplo 1 de la presente invención son competentes para la fusión, las iSMC, obtenidas como se muestra en el ejemplo 2 de la presente invención y destinadas en última instancia a su aplicación en tejido muscular liso, no son competentes para la fusión. Esto se aplica tanto a las MPC-iSMC como a las MSC-iSMC según la
30 presente invención, como se muestra, por ejemplo, en la Figura 15.

Las células musculares lisas inducidas (iSMC) obtenidas a partir de MSC se definen en las reivindicaciones. Se caracterizan por la expresión positiva de aSMA, CD49a y CD146, y la expresión negativa de CD56.

Preferiblemente, las iSMC obtenidas a partir de MSC se caracterizan además por la expresión negativa de desmina y/o CD34.

35 Como las MSC derivadas de músculo esquelético son diferentes de las MPC en términos de CD56 también las iSMC derivadas de MSC son CD56 negativas. Sin embargo, las iSMC derivadas de MSC son aSMA+, CD146+ y CD34-, lo que, en línea con las iSMC derivadas de MPC, es representativo del compromiso con el músculo liso de las iSMC derivadas de MSC y, por tanto, ventajoso. Además, la expresión de los marcadores mesenquimales CD90, CD105, CD73 positivos en iSMC derivadas de MSC por la presente invención es
40 preferente debido a la naturaleza mesenquimal del tejido muscular liso necesitado.

La expresión de los diversos marcadores descritos anteriormente se comprueba preferiblemente *in vitro*. Además, la expresión de los distintos marcadores definidos anteriormente se refiere a su expresión en las células respectivas *in vitro*. En una realización preferente, la expresión *in vitro* de aSMA y desmina en las células respectivas definidas anteriormente corresponde a su expresión *in vivo* respectiva

45 Preferiblemente, las células musculares lisas inducidas (iSMC) expresan canales funcionales de calcio y/o potasio.

La funcionalidad del tejido muscular liso depende de la existencia de canales funcionales de calcio y potasio activados por voltaje, que permiten la inducción de la contracción celular regulada y la regulación del potencial de membrana, respectivamente (Sanders, 2008). Tras la estimulación neurológica, las membranas de las
50 células musculares lisas se despolarizan, lo que desencadena la apertura de los canales de calcio sensibles al voltaje y permite que los iones de calcio entren en la célula desde el espacio intercelular (Sanders, 2008). Este acontecimiento desencadena a continuación cascadas de señalización que conducen en última instancia a la contracción inducida por actina/miosina de la célula muscular lisa necesaria en detalle para la función de, por ejemplo, el esfínter anal interno para contraerse y retener líquidos, gases y sólidos de la liberación involuntaria del recto (Webb, 2003). Además, los canales de potasio activados por voltaje se abren después de la
55

despolarización inducida por las neuronas de la membrana del músculo liso con el fin de repolarizar la membrana para permitir nuevas despolarizaciones en caso de seguir las señales neuronales. Así pues, la presencia de canales de Calcio y Potasio en las iSMC es adecuada para identificar iSMC funcionales *in vitro*. De hecho, las iSMC funcionales son necesarias para regenerar el mal funcionamiento de, por ejemplo, el esfínter anal interno, que no es suficientemente funcional en pacientes con incontinencia fecal. La presente invención permite la generación de iSMC a partir de células derivadas de músculo esquelético con canales funcionales de potasio y calcio activados por voltaje, lo que podría ser ventajoso para su uso en la regeneración del músculo liso.

Preferiblemente, las células musculares lisas inducidas (iSMC) son contráctiles *in vitro*. Una de las funciones típicas del tejido muscular liso es la contracción (Webb, 2003). Para probar la contractilidad *in vitro*, las células se siembran en gel de colágeno y se cuantifica la reducción de tamaño de gel de colágeno a lo largo del tiempo como medida de la contractilidad. Los inventores descubrieron que las iSMC procedentes de MPC y las iSMC procedentes de MSC son contráctiles, en comparación con las MPC y las MSC originarias de las mismas.

Preferiblemente, las células musculares lisas inducidas (iSMC), en particular las MPC-iSMC, obtenidas según un procedimiento de la presente invención, preferiblemente en el paso (b), son CD49e-. La expresión de CD49e se comprueba preferiblemente *in vitro*. CD49e, también conocida como integrina alfa 5, es una molécula de adhesión celular que forma un receptor heterodímero con la integrina beta 1 para la unión de fibronectina, fibrinógeno y fibrilina-1. Dado que los inhibidores de la fibronectina fueron suficientes para aumentar la expresión génica del músculo liso, la señalización de la fibronectina apoyada a través de CD49e podría obstaculizar la expresión del músculo liso. Los inventores descubrieron que las iSMC de las MPC murinas son deficientes en CD49e. La deficiencia en CD49e podría ser útil para reducir la señalización de fibronectina y, por tanto, las iSMC CD49e- obtenidas según la presente invención podrían ser ventajosas sobre las células conocidas en la técnica en su uso para la regeneración del músculo liso.

En una realización preferente alternativa, las células musculares lisas inducidas (iSMC), en particular las MPC-iSMC, obtenidas según un procedimiento de la presente invención, preferiblemente en el paso (b), son CD49e+. La expresión de CD49e se comprueba preferiblemente *in vitro*.

Preferiblemente, las células musculares lisas inducidas (iSMC), en particular las MPC-iSMC, obtenidas según un procedimiento de la presente invención, preferiblemente en el paso (b), son AChE-. La expresión de AChE se comprueba preferiblemente *in vitro*. Una de las funciones típicas de las células miogénicas esqueléticas es la expresión de la enzima AChE activa durante la fusión *in vitro* (Turner et al., 2018), ya que es necesaria para la terminación de las señales nerviosas en las placas terminales motoras. Sin embargo, el músculo liso no está inervado por neuronas motoras y, por tanto, su contracción no está regulada mayoritariamente por la Acetilcolina, requiriendo AChE para su terminación. Los inventores han analizado las iSMC aisladas según el Ejemplo 3 para determinar la actividad AChE según el Ejemplo 17 y han descubierto que las iSMC son AChE- (Figura 14).

Preferiblemente, las células musculares lisas inducidas (iSMC), en particular las MPC-iSMC, obtenidas según un procedimiento de la presente invención, preferiblemente en el paso (b), son CK-. La expresión de CK se comprueba preferiblemente *in vitro*. Una de las funciones típicas de las células miogénicas esqueléticas es la expresión de la enzima CK activa durante la fusión *in vitro* (Turner et al., 2018), ya que es necesaria para la contracción del músculo esquelético. Sin embargo, la contracción del músculo liso no está regulada por la creatina cinasa (CK) y, por tanto, no es necesaria para las células musculares lisas. Los inventores descubrieron que las iSMC (Ejemplo 3), que fueron analizadas para la actividad CK (Ejemplo 17), son CK- (Figura 14).

En una realización preferente, las células musculares lisas inducidas (iSMC), en particular las MPC-iSMC, obtenidas según un procedimiento de la presente invención, preferiblemente en el paso (b), son Pax-7 negativas, en particular si la expresión de Pax-7 se prueba *in vitro*. En una realización preferente adicional, las células musculares lisas inducidas (iSMC), en particular las MPC-iSMC, obtenidas según un procedimiento de la presente invención, preferiblemente en el paso (b), son Pax-7 positivas, en particular si la expresión de Pax-7 se prueba *in vitro*. Pax-7 es un factor de transcripción que se encuentra en células comprometidas con el linaje del músculo esquelético (Krauss et al., 2016). La supresión de Pax-7 en la *túnica muscular* de ratones provoca una reducción del músculo esquelético y un aumento de la masa muscular lisa (Wörl et al., 2009).

En una realización preferente, las células musculares lisas inducidas (iSMC), en particular las MPC-iSMC, obtenidas según un procedimiento de la presente invención, preferiblemente en el paso (b), son SSEA4 negativas. En otra realización preferente, las células musculares lisas inducidas (iSMC), en particular las MPC-iSMC, obtenidas según un procedimiento de la presente invención, preferiblemente en el paso (b), son SSEA4 positivas. La expresión de SSEA4 se comprueba preferiblemente *in vitro*. SSEA4 es un marcador de superficie celular que se encuentra en las células madre pluripotentes, conocidas por su amplio potencial proliferativo y, por tanto, por el riesgo de tumorigénesis.

Tratamientos basados en células musculares lisas inducidas

Otro objeto de la presente invención se dirige a células musculares lisas inducidas (iSMC) como se define en las reivindicaciones para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano o un animal. En particular, la presente invención proporciona células musculares lisas inducidas (iSMC) para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia. Más particularmente, la presente invención proporciona células musculares lisas inducidas (iSMC) para su uso en terapia celular, en particular en terapia celular de músculo liso.

En otra realización preferente de la presente invención, la enfermedad o el trastorno son deficiencias del músculo liso. Preferiblemente, las deficiencias del músculo liso se seleccionan del grupo formado por incontinencia anal, incontinencia urinaria, enfermedad por reflujo, gastroparesia, vejiga hiperactiva e hipoactiva.

En una realización específicamente preferente de la presente invención, la enfermedad o trastorno es la incontinencia fecal, en particular la incontinencia fecal pasiva. En consecuencia, la presente invención también se refiere a las iSMC para su uso en un procedimiento de tratamiento de la incontinencia anal, la incontinencia urinaria, la enfermedad de reflujo, la gastroparesia, la vejiga hiperactiva e hipoactiva, y en particular de la incontinencia fecal, más concretamente de la incontinencia fecal pasiva.

Preferiblemente, las iSMC se inyectan en el tejido muscular liso de un sujeto que necesita iSMC. Preferiblemente, las iSMC se inyectan en una cantidad eficaz para tratar la deficiencia de músculo liso. La cantidad eficaz del compuesto a administrar puede determinarse fácilmente por los expertos en la técnica durante los ensayos preclínicos y clínicos mediante procedimientos familiares para médicos y clínicos.

La regeneración del tejido muscular liso necesitado, tal como el músculo liso debilitado, atrófico o dañado, por ejemplo, esfínteres tales como los esfínteres anales interno, uretral interno, esofágico inferior o superior, mediante la administración celular, requiere que las células se administren localmente en el tejido necesitado. La administración local de las iSMC podría regenerar el músculo liso mediante el injerto de las iSMC inyectadas en el lugar de administración. La técnica anterior (Chancellor et al., 2001) divulga células derivadas de músculo esquelético caracterizadas como desmina+, CD34+ y Blc-2+ y su uso en el aumento de tejido blando (por ejemplo, músculo liso) tales como el de la vejiga o el esfínter anal. Por el contrario, la presente invención divulga el aislamiento de CD34-, CD56+, desmina+ MPC o células multipotentes, CD34-, CD56-, CD73+ y CD105+ MSC derivadas de músculo esquelético en un primer paso. A partir de dichas células del músculo esquelético, las iSMC pueden aislarse en un segundo paso, previo tratamiento con TGFb1 y heparina. Estas iSMC adquieren así un fenotipo de músculo liso mediante la expresión de marcadores de músculo liso tales como, por ejemplo, aSMA y CD 146, por lo que pueden resultar ventajosas para la regeneración del músculo liso. Preferiblemente, estas iSMC se utilizan en un procedimiento para tratar a un sujeto necesitado mediante inyección en dicho sujeto. Los inventores descubrieron que, administradas las iSMC obtenidas por los procedimientos de la presente invención en el tejido muscular liso del esfínter pilórico, se injertaban en el lugar de la inyección y se integraban en el tejido muscular liso.

Preferiblemente, las iSMC se administran en un tejido blando necesitado mediante múltiples inyecciones.

Las múltiples inyecciones de SMDC en el músculo esquelético han demostrado mejorar el injerto de células en el músculo (Skuk et al., 2014). La presente invención prevé la inyección de iSMC en tejido blando tal como, por ejemplo, músculo liso en múltiples sitios del mismo continuo de tejido. En particular, las células podrían administrarse utilizando múltiples agujas, cada una de las cuales inyectaría un número definido de células.

Las iSMC según la presente invención pueden administrarse en forma de una composición farmacéutica que comprenda las iSMC y un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. En consecuencia, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende iSMC según la presente invención y un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

En otra realización de la presente invención, las iSMC se utilizan en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la incontinencia anal, la incontinencia urinaria, la enfermedad de reflujo, la gastroparesia, la vejiga hiperactiva e hipoactiva y, en particular, la incontinencia fecal, más concretamente la incontinencia fecal pasiva.

Ingeniería de tejidos

En otro objeto de la presente invención, las células derivadas de músculo liso inducidas definidas en las reivindicaciones se utilizan en ingeniería de tejidos.

El tejido muscular liso a menudo forma estructuras en forma de anillo/tubo dentro del cuerpo humano, tales como los vasos sanguíneos y el esfínter anal interno. El uso de iSMC como las obtenidas en el presente documento para producir estructuras en forma de anillo/tubo puede utilizarse para la ingeniería *in vitro* de vasos sanguíneos o músculos del esfínter. Las estructuras musculares lisas creadas *in vitro* pueden ser útiles para sustituir estructuras musculares lisas defectuosas, tal como los esfínteres musculares lisos de, por ejemplo, pacientes con incontinencia fecal. Los inventores descubrieron que las iSMC obtenidas mediante la presente

invención pueden reconstruir estructuras tridimensionales en forma de anillo similares a la de, por ejemplo, el esfínter anal interno. Se observó que las células de estos anillos tisulares expresaban proteínas marcadoras del músculo liso, tal como la α SMA y la desmina. La expresión de las proteínas contráctiles α SMA y desmina dentro de los anillos tisulares obtenidos por las células de la presente invención es necesaria para la funcionalidad de los anillos tisulares y, por lo tanto, es ventajosa para el uso de dichos anillos tisulares en la sustitución de tejidos.

Adicionalmente, se descubrió en el presente documento que los esfínteres diseñados y derivados *in vitro* de iSMC albergaban propiedades ultraestructurales de los músculos lisos naturales, tales como estructuras de actina muy abundantes y cuerpos densos necesarios para la mecanotransducción y, por tanto, para la funcionalidad de las construcciones de músculo liso. Además, los esfínteres de ingeniería tisular obtenidos por la presente invención permiten la formación de caveolas dentro de las células. Se sabe que las caveolas son necesarias para el manejo del calcio, por ejemplo, por excitación-contracción, excitación-transcripción y acoplamiento farmacomecánico (Popescu et al., 2006). Por lo tanto, las iSMC obtenidas mediante la presente invención son prometedoras para su uso en ingeniería tisular.

Control de fármacos

En otro objeto de la presente invención, las iSMC, como se definen en las reivindicaciones, se utilizan para el control de fármacos.

El uso de iSMC para producir estructuras musculares lisas *in vitro* podría ser útil para probar nuevos fármacos y sus efectos sobre las células musculares lisas *in vitro* antes de que cualquier candidato a fármaco potencialmente dañino tenga que ser utilizado en estudios con animales o humanos.

Células derivadas del músculo esquelético para la generación de células musculares lisas inducidas

La presente divulgación -pero no como parte de la invención- está dirigida al uso de células derivadas de músculo esquelético para la obtención de células musculares lisas inducidas (iSMC).

Los procedimientos de vanguardia utilizados con frecuencia emplean células madre pluripotentes inducidas (Dash et al., 2016), células estromales mesenquimales multipotentes derivadas de tejido adiposo (G. Wang et al., 2015) o células estromales mesenquimales multipotentes derivadas de médula ósea (Espagnolle et al., 2014) para obtener células musculares lisas *in vitro*, cuyo origen es claramente diferente al de las células derivadas de músculo esquelético utilizadas como fuente para obtener células musculares lisas inducidas en la presente invención. La desventaja de las células actuales de vanguardia, por ejemplo, las iPSC utilizadas para obtener células de músculo liso, es el riesgo de transformación maligna debido a la ingeniería genética necesaria para obtener iPSC. Otro procedimiento de vanguardia describe las células CD34+ derivadas del músculo esquelético como fuente de células musculares lisas. De este modo, dichas células se cultivan en un medio de diferenciación durante 2-4 semanas (Lu et al., 2011). Dentro de la presente invención por primera vez se utilizan células derivadas de músculo esquelético CD34 aisladas según los procedimientos de la presente invención para obtener iSMC. Dichas células derivadas del músculo esquelético son adecuadas para el aislamiento de las iSMC, ya que el procedimiento de la presente invención dura menos de 1 semana.

Las células derivadas del músculo esquelético son células progenitoras miogénicas oligopotentes (MPC) caracterizadas por la expresión positiva de CD56, y desmina, y la expresión negativa de CD34; o en las que las células derivadas del músculo esquelético son células estromales mesenquimales multipotentes (MSC) caracterizadas por la expresión positiva de CD105, CD73, y la expresión negativa de CD34 y CD56.

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

Ejemplos

Ejemplo 1 - Aislamiento de células derivadas del músculo esquelético (SMDC)

En función de los siguientes procedimientos de aislamiento, las SMDC se enriquecieron con células progenitoras miogénicas humanas (MPC), células progenitoras miogénicas murinas (mMPC) o células estromales mesenquimales multipotentes humanas (MSC).

Aislamiento de células progenitoras miogénicas derivadas de músculo esquelético humano (MPC)

En detalle, se tomó una biopsia de músculo esquelético de *M. pectoralis major* o *M. biceps brachii* de un paciente incontinente. Para tomar la biopsia, primero se abrió la piel mediante una incisión de aproximadamente 1 cm de longitud por encima del músculo hasta llegar a la fascia del *M. pectoralis major*. Tras abrir la fascia, se tomó 1 cm³ de tejido muscular (biopsia). La biopsia se transfirió directamente a un medio de transporte de biopsias preenfriado a aproximadamente 4°C y compuesto por medio basal F10 de Ham's suplementado con Gentamicina (1-5 µg/ml de concentración final). La biopsia se almacenó durante aproximadamente 26 horas a 1-11°C dentro del medio de transporte de la biopsia. A continuación, la biopsia se transfirió a una placa de Petri llena de 1x PBS. El tejido muscular se separó del tejido conjuntivo utilizando pinzas estériles y un bisturí. A

continuación, el tejido muscular se transfirió a otra placa de Petri llena de 1x PBS y se diseccionó en trozos de 2-3 mm² utilizando un bisturí. Tras un paso de transferencia adicional como el anterior, las piezas de tejido se cortaron en trozos de 1 mm. Finalmente, las piezas se transfirieron a un tubo de centrifugación lleno de 1x PBS y se centrifugaron durante 10 minutos a 1300 rpm. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el tejido muscular se resuspendió en 1x PBS suplementado con 8 µg/ml de Gentamicina. A continuación, la suspensión de tejido muscular se enfrió a 2-8°C durante 48 horas. Tras el enfriamiento, la suspensión de tejido muscular se centrifugó durante 10 minutos a 1300 rpm, se retiró el sobrenadante y se añadieron 2.5 ml de una solución de digestión que contenía 1-5 mg/ml de colagenasa, 2-4 % v/v de tampón Hepes, 0.1-10 % v/v de suero fetal de ternera y 5-10 µg/ml de Gentamicina en Ham's F10. A continuación, la suspensión de tejido minutos a 1300 muscular se incubó de 6 a 20 horas a 37°C, 5% de CO₂. A continuación, se centrifugó la suspensión a 1300 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en un medio que contenía 10-20% v/v de FCS, 1-3 ng/ml de bFGF y 3-10 µg/ml de Gentamicina en Hams F10 y se sembró en frascos de cultivo celular. Las SMDC adheridas al fondo del matraz de cultivo se mantuvieron cambiando el medio cada 3-4 días y subcultivándolas tras desprenderse una vez alcanzada la confluencia. Se realizaron subcultivos hasta alcanzar de 1×10⁷ a 5×10⁷ de SMDC.

Aislamiento de células progenitoras miogénicas derivadas de músculo esquelético murino (mMPC)

Las MPC murinas se obtuvieron de biopsias de músculo esquelético de ratones Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J, en ratones TdTomato cortos,, (Jackson Laboratory, Maine, USA). Los ratones adultos fueron sacrificados por dislocación cervical seguida de un pellizco en la piel del lomo y desprendimiento de la piel. A continuación, se obtuvo músculo esquelético de los músculos *longissimus dorsi*, *gastrocnemius* y *tibialis anterior* utilizando tijeras y bisturí. Los músculos se transfirieron a una placa de petri estéril y se cubrieron con 1X PBS. A continuación, con unas pinzas y un bisturí, se extrajo el tejido conjuntivo restante del músculo esquelético y se desechó. Después, el tejido muscular se digirió utilizando el kit de disociación de músculo esquelético (MiltenyiBiotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para separar las células progenitoras miogénicas (mMPC) de las SMDC no miogénicas, se utilizó un kit de aislamiento de células satélite (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las mMPC y las SMDC no miogénicas recogidas se centrifugaron como se ha indicado anteriormente y se resuspendieron en medio de crecimiento del ratón, consistente en DMEM/Ham's F12 suplementado con un 20% de FCS y bFGF. Los SMDC murinos se cultivaron en frascos de cultivo recubiertos de colágeno, preparados cubriendo la superficie de los frascos de cultivo con colágeno I de cola de rata diluido 1:10 1X PBS durante 1 hora a 37°C. Se realizaron subcultivos como en el caso de los SMDC humanos. Por último, las células se separaron de las paredes del recipiente de cultivo celular, se resuspendieron en medio y se utilizaron inmediatamente o se crioconservaron en nitrógeno líquido hasta su uso posterior.

Aislamiento de células estromales mesenquimales multipotentes derivadas del músculo esquelético humano (MSC)

Las MSC se aislaron según Thurner et al. 2018. En primer lugar, se aislaron SMDC de biopsias musculares (Musculus pectoralis major o Latissimus dorsi) y se expandieron en un entorno cGMP. Las células se mantuvieron mediante procedimientos estándar de cultivo celular. Brevemente, las células se cultivaron en medio de crecimiento que contenía medio basal F-10 de Ham's suplementado con 10% de FCS (inactivado a 57°C, 40 minutos), bFGF y gentamicina y se incubaron a 37°C, 5% CO₂. El medio de cultivo se cambiaba cada 2 o 3 días. Para el subcultivo y la cosecha, las células se lavaron una vez con 1X PBS y se incubaron con solución de Tripsina 1X durante 5 minutos a 37°C. Las células se enjuagaron con medio de crecimiento y se centrifugaron a 400*g durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en medio de crecimiento. A continuación, las MSC se purificaron mediante clasificación celular activada por magnetismo (MACS). Por lo tanto, se utilizó el kit CD56 MicroBeads humano (MiltenyiBiotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania). En resumen, tras la recolección y el recuento, las células se centrifugaron a 400*g durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 10 ml de tampón MACS. Tras otro paso de centrifugación (400*g durante 10 minutos), el precipitado se resuspendió en 80 µl de tampón MACS. Posteriormente, se añadieron 20 µl de anticuerpo CD56 magnético por cada 1*10⁷ células y se incubaron durante 15 minutos a 4°C. A continuación, se llevó a cabo la clasificación de las células con el Mini MACS Separator y se recogieron las MSC CD56- en el flujo. Por último, las células se resuspendieron en medio y se crioconservaron en nitrógeno líquido hasta su uso posterior o se utilizaron inmediatamente.

Ejemplo 2 - Transdiferenciación de SMDC a iSMC y aislamiento de las mismas

Las MPC, MPC murinas o MSC como las obtenidas en el Ejemplo 1, se sembraron en las paredes de un recipiente de cultivo y se cultivaron con medio de crecimiento hasta una confluencia de aproximadamente el 70%. A continuación, las células se lavaron una vez con DMEM/F12 (Thermo Scientific, MA, EE.UU.). A continuación, se cubrieron las células con medio de diferenciación de músculo liso, consistente en DMEM/F12 suplementado con TGFβ1 humano recombinante (Thermo Scientific, MA, EE.UU.), sal sódica de heparina de mucosa intestinal porcina (Sigma-Aldrich Co. LLC, MO, EE.UU.), suero fetal de ternera inactivado por calor (57° C, 40 minutos) (Gibco, Thermo Scientific, MA, EE.UU.) y gentamicina (Sandoz GmbH, Tirol, Austria) a una concentración final de 10 ng/ml, 3.84 µg/ml y 5 % (v/v), respectivamente. Por último, las células se cultivaron

en medio de diferenciación de músculo liso durante 3-6 días a 37°C, 5% CO₂. El medio se cambiaba cada 3 o 4 días. Para el aislamiento, las células se desprendieron de las paredes de los recipientes de cultivo y se recogieron en suspensión.

Ejemplo 3 - Potencial de diferenciación de las SMDC

5 Para la diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica *in vitro*, cada 500 000 células obtenidas mediante el Ejemplo 1 se sembraron en placas de 6 pocillos (NUNC, Thermo Scientific, MA, USA) y se cultivaron en medio de crecimiento durante 24 horas a 37°C, 5% CO₂. A continuación, las células se lavaron una vez con 5 ml de DMEM/Ham's F12 y se cubrieron con 5 ml de cada medio de diferenciación adipogénica, condrogénica u osteogénica. El medio de diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica consistió en StemXVivo™ Osteogenic/Adipogenic Base Medium (R&D Systems Inc., MN, EE.UU.), complementado con StemXVivo Human/Mouse/Rat Adipogenic (R&D Systems Inc., MN, EE.UU.), StemXVivo Human Osteogenic Supplement (R&D Systems Inc., MN, EE.UU.), o STEMPro® Chondrogenesis Supplement (Gibco®, Thermo Scientific, MA, EE.UU.), respectivamente, según las instrucciones del fabricante. Los medios de diferenciación se completaron con gentamicina (Sandoz GmbH, Austria) hasta alcanzar una concentración final de 3.83 µg/ml. 10 Las células se cultivaron durante 14 días en sus respectivos medios de diferenciación, que se cambiaban cada 2-3 días. Tras 14 días de cultivo, se evaluó el éxito de la diferenciación por la presencia de adipocitos, condrocitos y osteocitos visualizados mediante tinción con oil red o (adipocitos), alcian blue (condrocitos) y alizarin red s (osteocitos), respectivamente. La cuantificación de la tinción con oil red o, alcian blue y alizarin red s se realizó en imágenes microscópicas de múltiples experimentos individuales mediante el paquete de software image j. Por lo tanto, se cargaron las imágenes y se dividieron los canales de color. Los canales rojos se utilizaron para las tinciones con oil red o y alizarin red s, mientras que el canal azul se utilizó para las tinciones con alcian blue. Se eliminó el fondo estableciendo un umbral común y se adquirió la intensidad media de píxeles por campo para su cuantificación por imagen j. La comparación estadística se realizó mediante la prueba t no apareada, considerando un p<0,05 como significativo (*). p<0,01, p<0.001 visualizados como * o **, respectivamente. 15 La diferenciación del músculo esquelético se inició en cultivo celular en placas de plástico Nunclon™ Delta Surface de 24 pocillos (Thermo Scientific, MA, Estados Unidos) sustituyendo el medio de crecimiento por medio de Diferenciación de Células Musculares Esqueléticas (500 mL, PromoCell GmbH, Alemania), suplementado con 10 ml de Pack de Suplementos de Medio de Diferenciación de Células Musculares Esqueléticas (PromoCell GmbH, Alemania) y 240 µL de gentamicina (8 mg/ml, Sandoz GmbH, Austria) como se ha descrito anteriormente (Thurner et al., 2018).

Las MPC y MSC obtenidas por el Ejemplo 1 fueron probadas para diferenciación *in vitro* a linaje adipogénico, condrogénico, osteogénico y miogénico esquelético bajo las condiciones de cultivo apropiadas. La tinción para adipocitos, condrocitos, osteocitos y miotubos se realizó como se ha descrito anteriormente. Las células Oil red o y alizarin red s positivas estaban ausentes en los MPC y sólo podían detectarse niveles bajos de células alcian blue. Dentro de las MSC, se encontraron células positivas para oil red o, alcian blue y alizarin red s tras su cultivo en medio de diferenciación adipogénico, condrogénico y osteogénico, respectivamente (Figura 1A, B), lo que confirma su enriquecimiento en células multipotentes y su estatus de células estromales mesenquimales multipotentes según la definición de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (Dominici et al., 2006). Sólo se detectaron miotubos multinucleados positivos para desmina dentro de las MPC (Figura 1A). 20 La cuantificación de las intensidades de tinción con Oil red o, alcian blue y alizarin red s tras la diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica *in vitro*, respectivamente, así como el cálculo del índice de fusión tras la diferenciación miogénica esquelética de las MSC y las MPC, revelaron una intensidad de tinción significativamente superior en oil red o (p=0.0117), alcian blue (p=0.0020) y alizarin red s (p=0.0012) de las MSC en comparación con las MPC, mientras que se observó un índice de fusión significativamente mayor (p=0.0007) en las MPC en comparación con las MSC (Figura 1B). Así pues, las MPC son células oligopotentes mesenquimales, comprometidas con el linaje miogénico. Además, las MAC son multipotentes y capaces de diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica *in vitro*. 25 30 35 40 45

Ejemplo 4 - Expresión de marcadores de superficie

El análisis por citometría de flujo se realizó en un citómetro de flujo Guava easyCyte 6HT 2L (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Brevemente, las células obtenidas mediante el Ejemplo 1 se cosecharon con tripsina a 37°C durante 5 min, se centrifugaron a 400*g y se resuspendieron en 1X PBS suplementado con 1% FCS. Se resuspendieron 40 000 células en 195 µl de PBS 1X y se incubaron después de añadir 5 µl de CD34-PE, CD56-PE, CD146-PE, IgG1-PE, IgG1-FITC, CD90-PE, CD105-PE, (todos ellos de Beckman Coulter, CA, EE.UU.), CD49a-FITC (Miltenyi Biotec, Alemania) o CD73-PE (Becton Dickinson, NJ, EE.UU.) durante 30 minutos en un tubo Eppendorf de 1.5 mL a 4 °C en la oscuridad. Después, las células se lavaron con 1 ml de PBS, se centrifugaron a 400*g por 10 minutos y se resuspendieron en 195 µL de 1X PBS en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. A continuación, cada reacción recibió 5 µl de colorante de viabilidad 7-aminoactinomicina D (Beckman Coulter Inc., Francia) y la placa se incubó durante 10 minutos a RT en la oscuridad. Por último, los eventos celulares se adquirieron con el software Guava InCyte™ v.2.3. Se generaron histogramas y gráficos de puntos con un mínimo de 5000 eventos y un caudal de muestra de 1.8 µl/ml. La tinción positiva se obtuvo por comparación con el control de isotipo establecido como al menos 95% negativo o por comparación con células de control (negativas). 50 55 60

Para caracterizar MPC y MSC, al menos 4 muestras de pacientes individuales obtenidas por procedimientos usados en el Ejemplo 1, así como iSMC derivadas de las mismas por procedimientos usados en el Ejemplo 2, se analizaron para la presencia de marcadores de linaje mesenquimal (CD105, CD90, y CD73), marcador hematopoyético (CD34), marcador miogénico (CD56) y marcador de linaje de músculo liso (CD146). Se consideró positivo un porcentaje medio de células positivas ≥ 50 , mientras que una media < 50 se consideró negativa. Así pues, todos los tipos celulares resultaron positivos para CD105, CD90 y CD73, pero negativos para CD34 (Figura 2). Además, las MPC y las iSMC derivadas de las mismas eran CD56+, mientras que las MSC y las iSMC derivadas de las mismas eran CD56-.

Curiosamente, la expresión del marcador de superficie CD146, asociado con el compromiso del músculo liso vascular de las MSC (Espagnollet et al., 2014), y CD49a, expresado durante el desarrollo del músculo liso (Belkin et al., 1990), fue negativa tanto en las MPC como en las MSC, pero positiva en las iSMC derivadas de las mismas (Figura 2).

Ejemplo 5 - Expresión de marcadores intracelulares

Se realizó tinción de inmunofluorescencia para detectar la expresión de marcadores intracelulares directamente en placas de 24 pocillos recubiertas de gelatina o cubreobjetos de vidrio colocados en placas de 6 pocillos como se ha descrito anteriormente (Thurner et al., 2018). Para la inmunomarcación fluorescente de actina alfa de músculo liso (α SMA), smoothelina o desmina, las células se incubaron con un antiactina alfa de músculo liso de ratón (Sigma-Aldrich Co. LLC, MO, EE. UU.), ratón antismoothelina (Merck Millipore, MA, EE. UU.), anticadena pesada de miosina de músculo liso (Merck Millipore, MA, EE. UU.) o conejo anti-desmina (Thermo Scientific, MA, EE.UU.), respectivamente, cada uno diluido 1:100 en medio de bloqueo. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados antiratón Alexa488 de cabra o anticonejo Alexa547 de burro (Thermo Scientific, MA, EE. UU.), diluidos 1:200 en medio de bloqueo. La contratinción de los núcleos se realizó incubando las células con Hoechst33342 (Sigma-Aldrich Co. LLC, MO, EE. UU.) diluido a una concentración final de 2 μ g/ml en PBST (0.1% Triton X-100). Las células se montaron con Entellan[®] (Merck Millipore, MA, EE. UU.) y se sellaron con cubreobjetos de vidrio. Las tinciones se compararon con (1) procedimientos sin anticuerpos primarios y (2) células negativas para los anticuerpos probados. Para cuantificar el número de células positivas, se superpusieron las tinciones con Hoechst y con anticuerpos y se analizaron múltiples imágenes de al menos tres preparaciones celulares independientes. El número total de células positivas para la tinción de anticuerpos se dividió por el número total de células (núcleos) evaluadas con la tinción de Hoechst. Se calcularon los valores medios y el error estándar para comparar las células obtenidas mediante los Ejemplos 1 y 2.

Se analizó la expresión de proteínas contráctiles intracelulares del músculo liso (α SMA, Smoothelina) así como el marcador miogénico general desmina mediante inmunotinción fluorescente en MPC y MSC obtenidas en el Ejemplo 1 así como iSMC derivadas de las mismas como se describe en el Ejemplo 2. Las MPC y MSC eran α SMA- y Smoothelina-. Por el contrario, las iSMC aisladas tanto de MSC como de MPC fueron α SMA+ (Figura 3). Además, las iSMC aisladas de las MPC del Ejemplo 2 eran Smoothelina+. El análisis de la expresión intracelular de Desmina reveló que las MSC y las iSMC aisladas de las mismas son Desmina-. Por el contrario, tanto las MPC como las iSMC aisladas de las mismas son Desmina+ (Figura 3).

Ejemplo 6 - Expresión génica

El ARN total de 1×10^6 MPC o MSC obtenidas cada una como se muestra en el Ejemplo 1 y de iSMC derivadas de las mismas como se muestra en el Ejemplo 2 se aisló mediante RNEasy Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La preparación de las muestras para la hibridación de micromatrices se llevó a cabo como se describe en los manuales del sistema NuGEN Ovation PicoSL WTA V2 y del Módulo NuGEN Encore Biotin (NuGEN Technologies, Inc, San Carlos, CA, EE.UU.). Los arreglos hibridados se lavaron y tñieron en una estación Affymetrix Fluidics FS450, y las señales fluorescentes se midieron con un escáner Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G. Las funciones de fluidica y escaneado se controlaron mediante el software Affymetrix GeneChip Command Console v4.1.3. El procesamiento de las muestras se realizó en un proveedor de servicios y centro de Affymetrix, "KFB - Center of Excellence for Fluorescent Bioanalytics" (Regensburg, Alemania).

Las señales resumidas de los conjuntos de sondas en escala log₂ se calcularon utilizando el algoritmo RMA con la Affymetrix GeneChip Expression Console v1.4. Los ID de conjuntos de sondas con el mayor cambio log₂ de pliegues entre MPC y MPC-iSMC se utilizaron para el análisis y la comparación posterior con los cambios log₂ de pliegues entre MSC y MSC-iSMC. Se muestra un resumen de todos los genes analizados y los respectivos cambios log₂ en los pliegues entre MSC y MSC-iSMC, así como entre MPC y MPC-iSMC (Figura 12). Se consideró que los cambios de pliegues Log₂ ≥ 1 marcaban una regulación al alza y, por tanto, están marcados con un asterisco (*). Se generaron mapas térmicos con el programa Multiple Expression Viewer (MeV 3.1.0) para visualizar los cambios log₂ pliegues y realizar agrupaciones jerárquicas, así como agrupaciones de k-means según la distancia Euclidiana.

Se llevó a cabo un análisis de microarrays para estudiar los cambios en la expresión génica asociados al aislamiento de las iSMC de la presente invención. Smoothelina (SMTN), calponina1 (CNN1), tropomiosina1

(TPM1), transgelina (TGLN, SM22), integrina-alfa-3 (ITGA3), integrina-alfa-1 (ITGA1, CD49a) vinculina (VCL) y molécula de adhesión a células de melanoma (MCAM, CD146) (Espagnollet et al., 2014; Miano, 2010; Xie et al., 2011), así como el gen de compromiso miogénico desmina (DES) (Capetanaki et al., 1997) junto con todos los genes necesarios para la contracción del músculo liso vascular ("KEGG PATHWAY: Vascular smooth muscle contraction - Homo sapiens (human)", s.f.) se analizaron en detalle. Se compararon los cambios en la expresión génica entre las MPC y las iSMC derivadas de las mismas con los de las MSC y las iSMC derivadas de las mismas. Considerando un log₂ FC de 1 o más y un log₂ FC de -1 o menos como una regulación al alza o a la baja, respectivamente, el 20.33 por ciento de los 123 genes analizados fueron regulados al alza y sólo el 3.25 por ciento a la baja durante la diferenciación de MPC a MPC-iSMC, lo que sugiere una diferenciación hacia un fenotipo de célula muscular lisa. Los genes del clúster KEGG o genes marcadores de músculo liso conocidos en las MPC-iSMC en comparación con las MPC fueron *PPP1R14A*, *KCNMB1*, *PLCB4*, *ACTG2*, *ITPR1*, *ADCY6*, *CALCRL*, *KCNMA1*, *GNA13*, *CNN1*, *ADCY2*, *KCNMB4*, *GUCY1A3*, *ARAF*, *ITGA1*, *PPP1R12A*, *MAPK1*, *CALD1*, *KCNMB2*, *PRKACB*, *ARHGEF11*, *PPP1R12C*, *ITPR2*, *PLCB1* y *SMTN* (Figura 12).

Considerando un log₂ FC de 1 o más y un log₂ FC de -1 o menos como una regulación al alza y a la baja, respectivamente, el 12.20 por ciento de los 123 genes analizados fueron regulados al alza y sólo el 3.25 por ciento a la baja durante la diferenciación de MSC a MSC-iSMC, lo que sugiere una diferenciación hacia un fenotipo de célula muscular lisa. Los genes del clúster KEGG o genes marcadores de músculo liso conocidos en las MSC-iSMC en comparación con las MSC fueron *ACTA2*, *ACTG2*, *CALD1*, *GNAQ*, *ITPR1*, *MAPK1*, *MYL9*, *KCNMA1*, *PLCB4*, *PPP1R14A*, *PRKCE*, *CNN1*, *TPM1*, *TAGLN* e *ITGA1* (Figura 12). Los hallazgos de que la expresión génica de *ITGA1*, que codifica para las proteínas CD49a y *SMTN*, que codifica para la proteína smoothelina, se encontró regulada al alza en las MPC-iSMC, apoyan nuestros hallazgos de un mayor porcentaje de células CD49a positivas y células smoothelina positivas en las MPC-iSMC en comparación con las MPC, confirmando así la expresión de marcadores de músculo liso de las MPC-iSMC. El hallazgo de que la expresión génica de *ITGA1*, que codifica para CD49a, estaba regulada al alza en las MSC-iSMC, apoya nuestros hallazgos de un mayor porcentaje de células CD49a positivas en las MSC-iSMC en comparación con las MSC, confirmando así la expresión del marcador de músculo liso de las MPC-iSMC.

Aunque la expresión de la proteína de superficie CD146 (MCAM) fue aumentada en las MPC-iSMC, la expresión génica MCAM no fue aumentada en los experimentos de microarray, sugiriendo una regulación postranscripcional de la expresión CD146. Además, el análisis de conglomerados de k-means de las expresiones génicas con cambios en log₂ FC en MPC y MSC durante la diferenciación a MPC-iSMC y MSC-iSMC condujo a la identificación de genes regulados de forma similar al alza (Figura 4A) y a la baja (Figura 4B) entre MPC y MSC cuando se aislaron iSMC de las mismas respectivamente. Mientras que *PPP1R14A*, *ACTG2*, *PLCB4*, *ITPR1*, *MAPK1*, *CNN1*, *ITGA1* y *KCNMA1* estaban regulados al alza tanto en MPC como en MSC, *PLA2G2A* estaba regulado a la baja en ambos tipos celulares. En general, el 75.61 por ciento de los genes analizados están regulados de forma similar al alza, a la baja o a ninguno de los dos en las MPC y las MSC tras su diferenciación a iSMC. Aunque se encontraron más genes regulados al alza y menos genes regulados a la baja en las MPC (20.33 % regulados al alza y 3.25 % regulados a la baja) que en las MSC (12.20 % regulados al alza y 5.69 % regulados a la baja), no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de genes regulados al alza o a la baja entre las MPC y las MSC (Figura 4C).

Ejemplo 7 - Competencia de fusión

La competencia de fusión de las MPC y las iSMC según los Ejemplos 1 y 2 respectivamente se evaluó según su índice de fusión (FI). Para determinar el índice de fusión (FI), las células inducidas para la diferenciación del músculo esquelético en el Ejemplo 3, se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con PFA al 4% durante 10 minutos. A continuación, las células se lavaron tres veces con PBS y se tiñeron con una solución de Hoechst33342 de 2 µg/ml durante 20 minutos. Para cada muestra se capturaron al menos tres campos durante la obtención de imágenes de inmunofluorescencia y se superpusieron con imágenes de contraste de fase para facilitar la detección de núcleos y límites celulares. El índice de fusión se calculó para cada campo visual capturado dividiendo el número de núcleos dentro de los tubos por el número total de núcleos por campo tras calcular la media de todos los campos analizados. Sólo se consideraron miotubos las células que tenían al menos 3 núcleos. Para el análisis estadístico se analizaron al menos 3 poblaciones derivadas de diferentes pacientes para cada grupo de células.

La cuantificación del FI demostró que un número significativamente mayor de MPC experimentó miogénesis esquelética en comparación con las iSMC aisladas de las mismas en el Ejemplo 2, lo que sugiere una disminución del potencial miogénico esquelético de las MPC tras el aislamiento de las iSMC a partir de las MPC. (Figura 5A). Además, los tubos formados por iSMC contenían significativamente menos núcleos que los tubos formados por MPC (Figura 5B). En conjunto, las MPC parecen competentes para la fusión, mientras que las iSMC derivadas de las mismas se consideran no competentes para la fusión.

Ejemplo 8 - Electrofisiología

El análisis de patch-clamp se realizó en las MPC y iSMC obtenidas según los Ejemplos 1 y 2 respectivamente, según un protocolo publicado previamente (Park et al., 2013), con ligeras adaptaciones específicas del

experimento. Los procedimientos se llevaron a cabo de la siguiente manera. El registro electrofisiológico se realizó en una configuración de célula completa utilizando un amplificador de patch clamp Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City). Las pipetas de parche con resistencias de 1 a 4 MΩ se fabricaron con vidrio de borosilicato (GC150F-7.5, Clark Electromedical Instruments, Reino Unido) y se llenaron con solución de pipeta. Todos los datos se digitalizaron utilizando una interfaz DIGIDATA 1200 (Axon Instruments, Foster City), se suavizaron mediante un filtro de Bessel de cuatro polos y se guardaron en disco. Las trazas de corriente se muestrearon a 10 kHz y se filtraron a 2 kHz. Para la adquisición de datos se utilizó el paquete de software pClamp (Versión 10.0 Axon Instruments, Inc.). Para el análisis se utilizó Microcal Origin 7.0. Si no se indica lo contrario, los reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich. La corriente entrante de los canales Cav dependientes de voltaje se evocó aplicando pulsos despolarizantes de 500 ms desde un potencial de mantenimiento de -50 a 50 mV. Las trazas de corriente superpuestas de los canales Kv se evocaron mediante pulsos despolarizantes escalonados entre -80 y 60 mV en pasos de 20 mV a partir de un potencial de mantenimiento de 80 mV en MPC, MPC-iSMC y hBd-SMC.

Se observó que las células obtenidas mediante el Ejemplo 2 no mostraban corrientes entrantes ni salientes sensibles al voltaje de canales de calcio dependientes de voltaje o canales de potasio dependientes de voltaje, respectivamente. Por el contrario, las iSMC derivadas de MPC en el Ejemplo 2 mostraron tanto corrientes entrantes como salientes sensibles al voltaje, como también se encontró en las hBd-SMC (Figura 6). En resumen, el aislamiento de las iSMC mediante incubación con TGFβ1 y Heparina da lugar a una maduración funcional.

Ejemplo 9 - Contracción de la matriz de gel de colágeno

Para medir la contractilidad de las MSC y MPC obtenidas según el Ejemplo 1, así como las iSMC derivadas de las mismas según el Ejemplo 2, se sembraron en matrices de gel de colágeno y se cuantificó la reducción del tamaño porcentual del gel. En detalle, se retiraron los medios de cultivo de células subconfluentes en recipientes de cultivo celular estándar y se lavaron las células dos veces con 1X PBS. A continuación, se cubrieron las células con tripsina y se incubaron durante 5 minutos a 37°C. A continuación, se separaron las células golpeándolas contra las paredes del recipiente de cultivo y se resuspendieron tras añadir medio basal DMEM/Ham's F12. A continuación, las células se centrifugaron a 400*g durante 10 minutos.

Se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en DMEM/Ham's F12 para obtener 6*10⁵ células por ml. Para cada gel, se mezclaron 400 µl de suspensión celular con 200 µl de solución de colágeno de piel bovina (Thermo-Fisher Scientific, MA, EE. UU.). A continuación, se añadieron 3 µl de NaOH 0.1M, seguida inmediatamente de la resuspensión y se transfirieron 500 µl de la mezcla a un pocillo de una placa de 24 pocillos (NUNC, Thermo-Fisher Scientific, MA, EE. UU.). A continuación, se incubó la placa de 24 pocillos durante 30 minutos a 37°C para permitir la formación del gel. Después, cada gel se cubrió con 500 µl de DMEM/Ham's F12 y se liberó del fondo de la placa de 24 pocillos para que flotara en la superficie utilizando una punta de pipeta estéril. Por último, los geles se incubaron a 37°C, 5% CO₂ durante 24 horas para permitir la contracción del gel por las células incluidas. Para cuantificar la contracción del gel, se tomaron fotografías con microscopio estereoscópico y se calculó el área del gel aplicando el software FIJI (image J).

Las MPC y MSC aisladas según el paso (a) de la presente invención (Ejemplo 1) resultaron ser no contráctiles en el ensayo de contracción de matriz de gel de colágeno. Por el contrario, las iSMC aisladas según el paso (b) de la presente invención (Ejemplo 2) a partir de MPC y MSC mostraron una contractilidad significativamente mayor que las células procedentes de (MPC, MSC). En resumen, las SMDC transdiferenciadas a iSMC y aisladas según el paso (b) (Ejemplo 2) resultaron ser contráctiles en comparación con las células aisladas en el paso (a) (Ejemplo 1; Figura 7).

Ejemplo 10 - Regeneración de músculo liso utilizando iSMC

Para probar el potencial de las iSMC obtenidas según el Ejemplo 2 en términos de regeneración lisa, se inyectaron iSMC derivadas de MPC murinas (obtenidas según el Ejemplo 1) en el esfínter pilórico de ratones SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} hembra adultos. Para ello, primero se anestesió a los ratones aplicándoles 100 mg/kg de Ketamina; 10 mg/kg de Xilacina y 3 mg/kg de Acepromazina por vía intraperitoneal. Se aplicó crema protectora ocular durante el procedimiento. Las células crioconservadas fueron descongeladas recién, se lavaron una vez con 1X PBS y se centrifugaron a 400*g durante 10 minutos, seguido de la resuspensión en 1X PBS hasta alcanzar una concentración final de 40 000 000 células/ml. Mientras tanto, los ratones que recibieron las células se colocaron en una placa calefactora para mantener la temperatura corporal a 37 °C. A continuación, se mezclaron 25 µl de la suspensión celular (que contenía 1 000 000 de células) con 5 µl de perlas de poliestireno FluoSpheres[®], de 15 µm, de color amarillo verdoso o azul (Thermo-Fisher Scientific, MA, EE.UU.), necesarias para rastrear la localización de la inyección tras la cirugía. Para la inyección de iSMC en el esfínter pilórico, se realizó una laparotomía media seguida de la localización de la región del esfínter pilórico y la aplicación de 30 µl de mezcla de células y fluosfera utilizando una aguja 28G conectada a una jeringa de 1 ml. El peritoneo y la capa músculo-piel se cerraron por separado mediante sutura consecutiva con 6-0 ethicon PDS más monofilamentos absorbibles. En el postoperatorio se aplicaron 200 mg de Novalgín (Metamizol[®]) por kilogramo de peso corporal por vía subcutánea durante tres días. 12 semanas después de la inyección de células, los

ratones fueron sacrificados por dislocación cervical para obtener e imágenes de los músculos del esfínter pilórico.

La obtención de imágenes de regiones del esfínter pilórico recién aisladas se realizó con un IVIS Spectrum (PerkinElmer, MA, EE.UU.) utilizando el software Living Image® versión 4.5.2 (PerkinElmer, MA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, los esfínteres pilóricos de ratones SHO inyectados y de control se colocaron en una placa de petri de vidrio y se introdujeron en el sistema IVIS. Se tomaron imágenes de fluorescencia a una altura de 2 cm con tiempos de exposición automatizados para las correspondientes longitudes de onda de absorción y emisión de las perlas TdTomato y Fluosphere amarilla. Posteriormente, se ajustaron las intensidades de las señales para eliminar las señales de fondo comparándolas con explantes de esfínter de ratones de control.

Para el análisis histológico los animales fueron anestesiados profundamente con isoflurano y sacrificados por dislocación cervical. El tejido de interés se diseccionó inmediatamente y se criofijó sumergiéndolo en 2-metilbutano enfriado con nitrógeno líquido. El tejido se cortó a 15 μm en un Criostato Leica 1950 y los cortes se recogieron en portaobjetos Superfrost plus y se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento posterior. Para el análisis inmunohistológico, las secciones se fijaron con PFA al 4% y se lavaron con PBS que contenía un 0.1% de Tween-20 (Sigma-Aldrich). El bloqueo y la dilución de anticuerpos se realizaron con una solución de PBS que contenía un 1 % de fracción de seroalbúmina bovina (Sigma-Aldrich), un 0.2 % de gelatina de piel de pescado (Sigma-Aldrich) y un 0.1 % de Tween-20 (Sigma-Aldrich). Los anticuerpos primarios contra TdTomato (Sicgen) o αSMA (Thermo Scientific, MA, EE.UU.) se diluyeron 1:100 en medio de bloqueo y se incubaron durante la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los anticuerpos secundarios (Thermo scientific) se diluyeron 1:500 y se aplicaron a temperatura ambiente durante 4 horas. Los núcleos se tñeron con DAPI diluido a una concentración de trabajo de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma-Aldrich). Posteriormente, los cortes se montaron con Prolong Gold Antifade (Life Technologies). Las imágenes de fluorescencia se adquirieron utilizando un microscopio confocal LSM 710 y el software ZEN 2011 Black (Carl Zeiss).

Los inventores descubrieron que las iSMC aisladas según el Ejemplo 2 a partir de MPC que expresaban la proteína reportera TdTomato obtenidas según el Ejemplo 1 eran detectables y estaban co-localizadas con perlas fluorescentes co-inyectadas en el lugar del esfínter pilórico 12 semanas después de la implantación, lo que sugiere el injerto de ISMC en el lugar de la inyección. El examen histológico seguido de la inmunotinción de fluorescencia para TdTomato y αSMA sugirió que las células iSMC positivas para TdTomato se encontraban en el músculo circular del esfínter pilórico, así como en la muscularis mucosa cercana a las perlas fluorescentes coinyectadas (Figura 8). Las células iSMC positivas para TdTomato localizadas en la capa de músculo liso del esfínter pilórico también expresaban la proteína αSMA , lo que sugiere no sólo el injerto en el tejido muscular liso, sino también la conservación de las características fenotípicas de las células musculares lisas tras el injerto, necesarias para la regeneración del músculo liso (Figura 8).

Ejemplo 11 - Ingeniería tisular de los músculos lisos

Para probar la idoneidad de las células obtenidas por los procedimientos descritos en el presente documento para su uso en ingeniería de tejidos, se realizó un cultivo celular en 3D. Se empleó un procedimiento que permite la producción de estructuras similares a esfínteres en forma de anillo ya conocido en la técnica (Gwyther et al., 2011) utilizando células obtenidas según el Ejemplo 1 o 2. Para producir recipientes de cultivo para el cultivo en 3D, se fabricó un molde con tallados en forma de anillo (diámetro interior 4 mm; diámetro exterior 10 mm) de acero inoxidable con el fin de producir un molde negativo de PDMS apta para autoclave. A continuación, se preparó una solución de agarosa al 2% (p/v) pesando 5 g de agarosa de baja gelificación (Sigma-Aldrich, MA, EE. UU.) en un matraz Schott® lleno hasta 250 ml con medio basal F10 de Ham's. A continuación, tanto el molde de PDMS como la solución de agarosa se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos. A continuación, el molde de PDMS se rellenó con la solución de agarosa en condiciones estériles seguido de la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora para que la agarosa se solidificara. En un siguiente paso, se separó la agarosa solidificada del molde de PDMS, se cortaron cubos de la agarosa que contenían cada uno un molde en forma de anillo y se transfirieron a una placa de 6 pocillos rellena con 2 ml de medio basal F10 de Ham's seguido del almacenamiento a 37°C hasta su uso posterior. Para el cultivo en 3D, las células obtenidas en el Ejemplo 1 se centrifugaron a $400\times g$ durante 10 minutos y el sedimento celular se resuspendió en medio de cultivo hasta alcanzar una concentración de 5×10^6 células/ml. A continuación, se añadieron 200 μl de la suspensión celular en el molde de agarosa seguido de la incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas sin más alteraciones para permitir la formación de anillos de las células. Tras el tiempo de incubación, se desechó el medio fuera del molde dentro de la placa de 6 pocillos y la placa de 6 pocillos se llenó cuidadosamente con 5 ml de medio como el utilizado en el Ejemplo 1 para producir MPC o MSC cultivadas en 3D o cualquiera de estas últimas como el utilizado en el Ejemplo 2 para producir cultivos 3D de iSMC. Las células se cultivaron durante 6 días para permitir su maduración a 37°C , 5% CO_2 hasta su análisis. Tras 6 días de cultivación, las células se analizaron mediante microscopía óptica estándar, criosección seguida de inmunotinción (Ejemplo 12) o tinción de H&E, microscopía electrónica de barrido o sección semi/ultrafina seguida de tinción con azul de toluidina o microscopía electrónica de transmisión. Las MPC derivadas según el Ejemplo 1 que se transdiferenciaron hacia iSMC como se describe en el Ejemplo 2, formaron esfínteres en forma de anillo empleando los procedimientos descritos anteriormente basados en Gwyther et al., 2014 (Figura 9).

Ejemplo 12 - Criosección e inmunotinción

Para el análisis histológico de los cultivos 3D en forma de anillo (esfínteres de bioingeniería) obtenidos según el Ejemplo 11, se retiraron cuidadosamente los anillos del molde de agarosa y, utilizando una cuchara estéril, se lavaron transfiriéndolos a un tubo Eppendorf lleno de 1XPBS y, a continuación, se fijaron y permeabilizaron sumergiéndolos en MetOH preenfriado a -20°C durante 5 minutos. A continuación, se lavaron los anillos diluyendo MetOH tres veces con 1XPBS tras eliminar la mitad de la solución. Los esfínteres de bioingeniería se criofijaron sumergiéndolos en 2-metilbutano enfriado con nitrógeno líquido. Los especímenes se cortaron a 15 µm en un criostato CM1950 (Leica, Alemania) y los cortes se recogieron en portaobjetos Superfrost plus (Thermo-Fisher Scientific, MA, EE.UU.) y se conservaron a -20 °C hasta su posterior procesamiento. El bloqueo y la dilución de anticuerpos se realizaron con una solución de PBS que contenía un 1 % de fracción de albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich Co. LLC, MO, EE.UU.), un 0.2 % de gelatina de piel de pescado (Sigma-Aldrich Co. LLC, MO, EE.UU.) y un 0.1 % de Tween-20 (Sigma-Aldrich Co. LLC, MO, EE.UU.). El anticuerpo primario aSMA (Thermo-Fisher Scientific, MA, EE.UU.) se diluyó 1:100 en medio de bloqueo seguido de incubación durante una noche a 4 °C. Los anticuerpos secundarios (Thermo-Fisher Scientific, MA, EE.UU.) se diluyeron a 1:500 y se aplicaron a temperatura ambiente durante 4 horas. Los núcleos se tiñeron con DAPI diluido a una concentración de trabajo de 0.5 µg/ml (Sigma-Aldrich Co. LLC, MO, EE.UU.) y los filamentos de actina se tiñeron mediante incubación con faloidina (Thermo-Fisher Scientific, MA, EE.UU.) diluida al 1: 100 en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los cortes se montaron utilizando Prolong Gold Antifade (Thermo-Fisher Scientific, MA, EE.UU.). Las imágenes de fluorescencia se adquirieron utilizando un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-U.

Se descubrió que las células dentro de los anillos de tejido obtenidos según el Ejemplo 10 eran positivas para actina de músculo liso alfa y desmina (Figura 10). Mientras que en los anillos tisulares derivados de MPC el aSMA se expresaba especialmente en las células de la capa externa del anillo, en los anillos tisulares que contenían iSMC las células que expresaban aSMA se distribuían por todo el anillo. En detalle, se observó que más células dentro de los anillos que se formaron a partir de MPC diferenciadas a iSMC durante el cultivo 3D según la combinación de los Ejemplos 2 y 10 expresaban aSMA que las células dentro de los anillos que se formaron a partir de MPC (Figura 10). Por el contrario, la desmina se expresaba en todos los anillos tisulares, tanto en los anillos tisulares derivados de MPC como en los derivados de iSMC (Figura 10).

Ejemplo 13 - Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido se realizó en el departamento de histología y embriología de la Universidad Médica de Innsbruck, afortunadamente con la ayuda de Angelika Flörl y Kristian Pfaller. Para el análisis de las células cultivadas en 3D obtenidas mediante los Ejemplos 1 y 2 (como se describe en la sección 3.2.26) mediante microscopía electrónica de barrido, se liberaron los anillos de los moldes de agarosa, se lavaron una vez en un tubo Eppendorf® de 1.5 ml con 1x PBS y luego se fijaron con MetOH preenfriado (-20°C), seguido de 1 hora de postfijación en tetróxido de osmio al 1%, deshidratación con EtOH y secado de punto crítico en un secador de punto crítico Bal-Tec CPD 030 (Balzers, Lichtenstein). Las muestras se montaron con cemento de carbono conductor Leit-C según Göcke (Plano GmbH, Wetzlar, Alemania) sobre muñones de aluminio recubiertos por pulverización catódica con 15 nm de Au/Pd (Balzers) y se examinaron en un microscopio electrónico de barrido Gemini 982 (Carl Zeiss). Las MPC obtenidas según el Ejemplo 1 y transdiferenciadas hacia iSMC según se describe en el Ejemplo 2 durante el cultivo 3D (Ejemplo 2) aparecieron alargadas y como parte integrante del anillo tisular en la superficie de los anillos tisulares que se habían formado en el Ejemplo 10 (Figura 9). Las células parecían intactas en la superficie del anillo y potencialmente viables (Figura 9).

Ejemplo 14 - Microscopía electrónica de transmisión

Se realizó microscopía electrónica de transmisión en anillos de tejido obtenidos según el Ejemplo 10. Por lo tanto, los anillos se liberaron del molde de agarosa y se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5 ml lleno de 1XPBS para su lavado. A continuación, las muestras se transfirieron a un nuevo tubo Eppendorf® lleno de Glutaraldehído al 2.5% en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.3) para su fijación y almacenamiento (4°C). Tras al menos 24 horas de fijación, los anillos se lavaron dos veces con tampón fosfato y se fijaron en OsO₄ al 1% durante 45 minutos. Después, los anillos se lavaron tres veces con agua destilada, cada 15 minutos. A continuación, los anillos se desliquesaron en concentraciones crecientes de EtOH (70, 80, 90, 100 %), cada 30 minutos y luego se incubaron dos veces en Acetona fresca al 100 % cada 20 minutos. A continuación, las muestras se incrustaron en mezclas de Acetona-Epon 2:1 durante 150 minutos, seguidas de incubación en mezcla de Acetona-Epon 1:2 durante toda la noche. Por último, los anillos se incubaron en Epon puro girando en un rotador durante 24 horas con un cambio de Epon a las 8 horas. Para la polimerización del Epon, los anillos se incubaron a 60°C durante 24 horas. Las muestras embebidas en epon se recortaron con un Ultratrim (Reichert) y se obtuvieron secciones ultrafinas con un Ultracut S (Reichert). Las secciones ultrafinas se visualizaron a 80 kV con un TEM CM120 (de Philips/FEI) equipado con una cámara CCD MORADA (de Olympus/SIS).

Las diluciones estándar de AChE se prepararon en tampón fosfato (pH 7.2 con 0.1 % de triton X-100) y se utilizaron inmediatamente. Se adquirió un stock de AChE (de Electrophorus electricus) listo para usar de 50 U/ml a AAT Bioquest® Inc., Sunnyvale, CA, EE.UU. Se diluyó para preparar 1000 mU/ml de AChE según las instrucciones del fabricante, que se volvió a diluir en una relación de 1:2 para obtener 8 diluciones diferentes que oscilaban entre 4-500 mU/ml.

Medición colorimétrica:

Para medir la actividad de AChE, las células obtenidas por cultivo en medio de diferenciación de músculo esquelético según el Ejemplo 3 se trataron como sigue: Se retiró cuidadosamente el medio de diferenciación de la placa de 24 pocillos con la adición inmediata de 300 μ l de solución DTNB 0.5 mM (preparada en tampón fosfato, pH 7.2 con 0.1% de tritón X-100). Tras 2 minutos de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, se añadieron 50 μ l de ATI 5.76 mM (preparado en agua destilada). El contenido de la reacción se incubó durante 60 minutos a 30 °C en la oscuridad, seguido de la medición de DO a 412 nm en un lector de microplacas Anthos Zenyth 340rt (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido).

Para el análisis estándar de la enzima AChE: Se prepararon diluciones de enzima AChE estándar (AAT® Bioquest, Sunnyvale, EE.UU.) de 500 a 4 mU/ml como se ha descrito anteriormente y se mezclaron 200 μ l de cada dilución de enzima AChE estándar con 300 μ l de DTNB 0.5 mM y 50 μ l de ATI 5.76 mM. Se midió la DO de la mezcla durante 60 minutos en una placa de 24 pocillos.

Cálculo de AChE mU_{rel}/mg-proteína:

AChE mU_{rel} se calculó en base a los valores de OD412 obtenidos de la medición colorimétrica de 60 min de las células por extrapolación de curvas estándar lineales derivadas de mediciones estándar de AChE (OD a 412nm después de 7 u 8 minutos). A continuación, se calcularon los valores de AChE mU_{rel}/mg de proteína dividiendo AChE mU_{rel} por mg de proteína total (calculada según el Ejemplo 19) de las células correspondientes cultivadas en medio de diferenciación de músculo esquelético.

Medición de la actividad de la creatina cinasa

Para medir la actividad de AChE, las células obtenidas por cultivo en medio de diferenciación de músculo esquelético según el Ejemplo 3 se trataron como sigue: Se retiró suavemente el medio de las células cultivadas en una placa de 24 pocillos y se lavaron las células con 1 ml de solución salina de Tryrode (Sigma-Aldrich Co. LLC, MO, EE.UU.). Inmediatamente después, se añadieron 70 μ l de tampón de lisis directamente sobre las células. El tampón de lisis se preparó añadiendo 10 μ l de Triton-X-100 a 10 ml de dH₂O(LC-MS-Ultrachromasol, Fluka). Tras 5 minutos de incubación a 4 °C en la oscuridad, se añadieron 400 μ l de CK-NAC (Thermo Scientific, MA, EE.UU.), previamente disueltos añadiendo 10 ml de dH₂O. La reacción se analizó en un lector de microplacas Anthos Zenith 340rt (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido) ajustado a 30°C, mediante medición de la absorbancia a 340 nm. Si no se indica lo contrario, se utilizaron para el análisis posterior los valores de OD340 nm tomados 21 minutos después de la adición de CK-NAC. La actividad CK en mU_{rel} se calculó según las instrucciones del fabricante y, si no se indicaba lo contrario, se normalizó dividiéndola por mg de proteína total de las células correspondientes.

Mientras que las MPC del Ejemplo 3 analizadas para actividad ACHE y CK según este ejemplo resultaron ser AChE+ y CK+, las iSMC de la presente invención (Ejemplo 3) resultaron ser AChE- y CK- (Figura 14).

Ejemplo 18 - Comparación de células según la presente invención con células conocidas en la técnica

Turner et al. 2018 describieron el aislamiento de SMDC, que se caracterizaron por ser CD56+ o CD56-. Para comparar las células descritas por Turner et al. 2018 con células de la presente invención, se contactó con los autores del estudio referido y se les solicitó el suministro de muestras. Los autores aceptaron entregar células aisladas según Turner et al. 2018, por lo que estas células pudieron ensayarse según los Ejemplos 3, 4, 5, 7, 8, 9, 16 y 17 de la presente invención y se compararon con MPC, MSC, MPC-iSMC y MSC-iSMC aisladas por el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 15.

Frudinger et al. 2018 describieron el aislamiento de las SMDC, que se caracterizaron por ser CD56+. Para comparar las células descritas por Frudinger et al. 2018 con células de la presente invención, se contactó con los autores del estudio referido y se les solicitó el suministro de muestras. Los autores aceptaron repartir células aisladas según Frudinger et al. 2018, por lo que estas células se ensayaron según los Ejemplos 3, 4, 5, 7, 8, 9, 16 y 17 de la presente invención y se compararon con MPC, MSC, MPC-iSMC y MSC-iSMC aisladas por el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 15.

Ejemplo 19 - Cuantificación de proteínas

Las células obtenidas por cultivo en medio de diferenciación de músculo esquelético según el Ejemplo 3 se analizaron para la cuantificación de proteínas totales según Turner et al. 2018. Por lo tanto, las células adherentes se lavaron primero dos veces con PBS, se cubrieron posteriormente con PBST (0.1% Triton X-100) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se resuspendió el lisado y se

transfirió a un tubo Eppendorf®, se agitó brevemente en vórtex y se centrifugó durante 4 minutos a 1200*g. Por último, el sobrenadante claro se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo y se determinó la concentración de proteínas utilizando el Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, MA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante midiendo la OD a 540 nm con un lector de microplacas Anthos Zenyth 340rt (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido).

Referencias

- Abrahamsson, H. (2007). *Gut*, 56(6), 877-883.
- Al-Ali, S., Blyth, P., Beatty, S., Duang, A., Parry, B., & Bissett, I. P. (2009). *Journal of Anatomy*, 215(2), 212-220.
- Bajpai, V. K., Mistriotis, P., Loh, Y.-H., Daley, G. Q., & Andreadis, S. T. (2012). *Cardiovascular Research*, 96(3), 391-400.
- Belkin, V. M., Belkin, A. M. & Koteliansky, V. E. (1990). *The Journal of Cell Biology*, 111(5 Pt 1), 2159-2170.
- Bohl, J. L., Zakhem, E., y Bitar, K. N. (2017). *Stem Cells Translational Medicine*, 6(9), 1795-1802.
- Capelli, C. C., Chancellor, M. B., Huard, J., & Qu, Z. (2002). WQ2001078754A3
- Capetanaki, Y., Milner, D. J., & Weitzer, G. (1997). *Cell Structure and Function*, 22(1), 103-116.
- Chancellor, M. B., Huard, J., Capelli, C. C., & Qu, Z. (2001). WQ2001078754 A2
- Dash, B. C., Levi, K., Schwan, J., Luo, J., Bartulos, O., Wu, H., Qiu, C., Yi, T., Ren, Y., Campbell, S., Rolle, M. W., & Qyang, Y. (2016). *Stem Cell Reports*, 7(1), 19-28.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
- Espagnolle, N., Guilloton, F., Deschaseaux, F., Gadelorge, M., Sensébé, L., & Bourin, P. (2014). *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(1), 104-114.
- Frudinger, A., Kölle, D., Schwaiger, W., Pfeifer, J., Paede, J., & Halligan, S. (2010). *Gut*, 59(1), 55-61.
- Frudinger, A., Pfeifer, J., Paede, J., Kolovetsiou-Kreiner, V., Marksteiner, R., & Halligan, S. (2015). *Colorectal Disease: The Official Journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, 17(9), 794-801.
- Frudinger, Andrea, Marksteiner, R., Pfeifer, J., Margreiter, E., Paede, J., & Thurner, M. (2018). *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), 233.
- Goode, P. S., Burgio, K. L., Halli, A. D., Jones, R. W., Richter, H. E., Redden, D. T., Baker, P. S., & Allman, R. M. (2005). *Journal of the American Geriatrics Society*, 53(4), 629-635.
- Huard, J., Yokoyama, T., Pruchnic, R., Qu, Z., Li, Y., Lee, J. Y., Somogyi, G. T., de Groat, W. C., & Chancellor, M. B. (2002). *Gene Therapy*, 9(23), 1617-1626.
- Iivanainen, A., Sainio, K., Sariola, H., & Tryggvason, K. (1995). *FEBS Letters*, 365(2-3), 183-188.
- Jung, Y., Bauer, G., & Nolte, J. A. (2012). *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 30(1), 42-47.
- Krauss, R. S., Chihara, D., & Romer, A. I. (2016). *Skeletal Muscle*, 6.
- Lecourt, S., Marolleau, J.-P., Fromigué, O., Vauchez, K., Andriamanalijaona, R., Ternaux, B., Lacassagne, M.-N., Robert, I., Boumédiène, K., Chéreau, F., Marie, P., Larchéro, J., Fiszman, M., & Vilquin, J.-T. (2010). *Experimental Cell Research*, 316(15), 2513-2526.
- Li, Y., Wen, Y., Wang, Z., Wei, Y., Wani, P., Green, M., Swaminathan, G., Ramamurthi, A., Pera, R. R., & Chen, B. (2016). *STEM CELLS Translational Medicine*, 5(12), 1719-
- Lu, S.-H., Lin, A. T. L., Chen, K.-K., Chiang, H. S., & Chang, L. S. (2011). *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(3), 587-592.
- Marolleau, J.-P., Vauchez, K. & Vilquin, J.-T. (2010). EP2206774A1.
- McHugh, K. M. (1995). *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 204(3), 278-290.
- Meyer, I., & Richter, H. E. (2015). *Women's Health (London, England)*, 11(2), 225-238.
- Mimura, T., Kaminishi, M., & Kamm, M. A. (2004). *Digestive Surgery*, 21(3), 235-241.

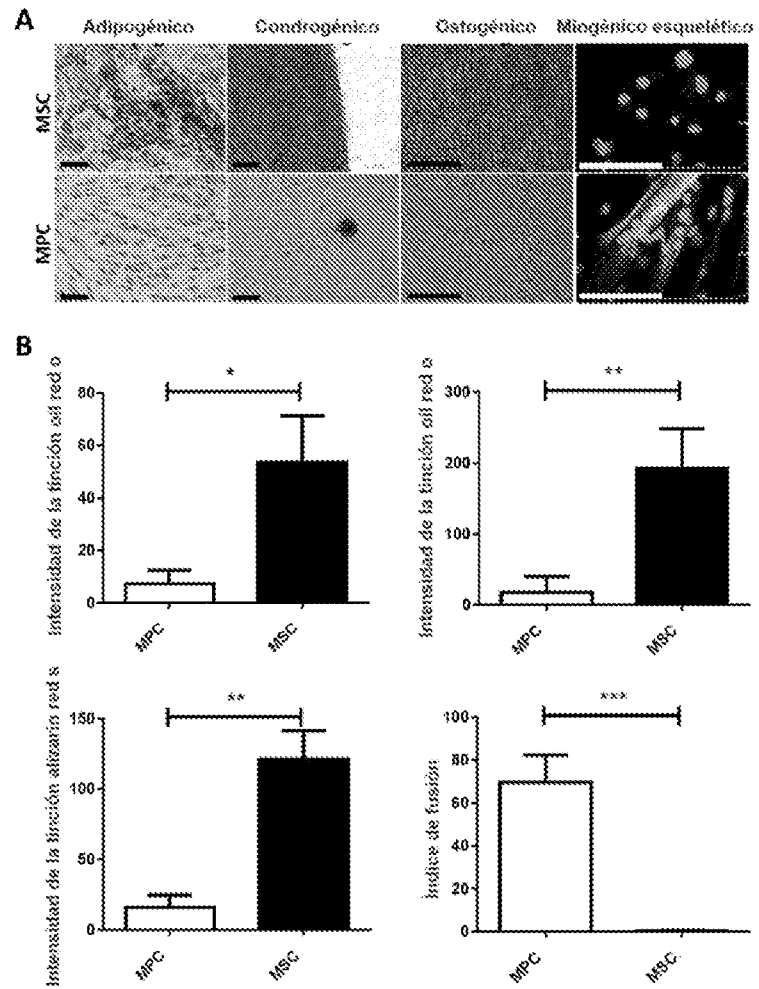
- Niessen, P., Rensen, S., Deursen, J. van, Man, J. D., Laet, A. D., Vanderwinden, J.-M., Wedel, T., Baker, D., Doevendans, P., Hofker, M., Gijbels, M., & Eys, G. van. (2005). *Gastroenterology*, 129(5), 1592-1601.
- Park, W. S., Heo, S. C., Jeon, E. S., Hong, D. H., Son, Y. K., Ko, J.-H., Kim, H. K., Lee, S. Y., Kim, J. H., & Han, J. (2013). *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 305(4), C377-91.
- 5 Popescu, L. M., Gherghiceanu, M., Mandache, E., & Cretoiu, D. (2006). *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(4), 960-990.
- Quander, C. R., Morris, M. C., Melson, J., Bienias, J. L., & Evans, D. A. (2005). *The American Journal of Gastroenterology*, 100(4), 905-909.
- 10 Qu-Petersen, Z., Deasy, B., Jankowski, R., Ikezawa, M., Cummins, J., Pruchnic, R., Mytinger, J., Cao, B., Gates, C., Wernig, A., & Huard, J. (2002). *The Journal of Cell Biology*, 157(5), 851-864.
- Ramkumar, D., & Schulze, K. S. (2005). *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 17 Suppl 1, 22-30.
- Rao, S. S. C. (2004). *Gastroenterology*, 126(1 Suppl 1), S14-22.
- Rochlin, K., Yu, S., Roy, S., & Baylies, M. K. (2010). *Developmental Biology*, 341(1), 66-83.
- 15 Romanska, H. M., Bishop, A. E., Moscoso, G., Walsh, F. S., Spitz, L., Brereton, R. J., & Polak, J. M. (1996). *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 22(4), 351-358.
- Sanders, K. M. (2008). *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 17 Suppl 1, 22-30.
- Sandison, M., & McCarron, J. (2015). *The FASEB Journal*, 29(1 Supplement), 418.8.
- 20 Skuk, D., Goulet, M. & Tremblay, J. P. (2014). *Cell Transplantation*, 23(1), 13-25.
- Thurner, M., Asim, F., Garczarczyk-Asim, D., Janke, K., Deutsch, M., Margreiter, E., Troppmair, J., & Marksteiner, R. (2018). *PLOS ONE*, 13(3), e0194561.
- Vaizey, C. J., Kamm, M. A., & Bartram, C. I. (1997). *Lancet (London, England)*, 349(9052), 612-615.
- van de Rijn, M., Hendrickson, M. R., & Rouse, R. V. (1994). *Human Pathology*, 25(8), 766-771.
- 25 van Eys, G. J., Niessen, P. M., & Rensen, S. S. (2007). *Trends in Cardiovascular Medicine*, 17(1), 26-30.
- Wang, G., Jacquet, L., Karamariti, E., & Xu, Q. (2015). *The Journal of Physiology*, 593(14), 3013-3030.
- Wang, J. Y., & Abbas, M. A. (2013). *The Permanente Journal*, 17(3), 65-73.
- Wang, J., Zohar, R., & McCulloch, C. A. (2006). *Experimental Cell Research*, 316(15), 2513-2526.
- Wang, Y., Han, Z., Song, Y., & Han, Z. C. (2012). *Stem Cells International*, 2012.
- 30 Webb, R. C. (2003). *Advances in Physiology Education*, 27(4), 201-206.
- Wörl, J., Breuer, C., & Neuhuber, W. L. (2009). *Developmental Dynamics*, 238(4), 864-874. Yin, H., Price, F. & Rudnicki, M. A. (2013). *Physiological Reviews*, 93(1), 23-67.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* para obtener células musculares lisas inducidas (iSMC), el procedimiento comprende los pasos de:
- (a) aislar células derivadas de músculo esquelético a partir de tejido muscular esquelético obtenido de un sujeto;
- 5 (b) transdiferenciar células derivadas de músculo esquelético cultivando las células en un medio que contenga TGF-beta, en particular TGFb1, TGFb2 y/o TGFb3, más preferiblemente TGFb1 y/o TGFb3, más preferiblemente TGFb1, y heparina para obtener iSMC,
- en las que las células derivadas del músculo esquelético son células progenitoras miogénicas (MPC) **caracterizadas por** la expresión positiva de CD56 y desmina, y la expresión negativa de CD34;
- 10 o en las que las células derivadas del músculo esquelético son células estromales mesenquimales (MSC) **caracterizadas por** la expresión positiva de CD105, CD73, y la expresión negativa de CD34 y CD56.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que las iSMC obtenidas en el paso (b) no son competentes para la fusión y/o **se caracterizan por la** expresión positiva de aSMA, CD49a y CD146.
3. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las iSMC obtenidas a partir de MPC en el paso (b) se **caracterizan por** la expresión positiva de aSMA, CD49a, desmina, CD56 y CD146, y la expresión negativa de CD34;
- 15 y en las que las iSMC obtenidas a partir de MSC en el paso (b) **se caracterizan por** la expresión positiva de aSMA, CD49a y CD146, y la expresión negativa de CD56.
4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que después del paso (a) se lleva a cabo un paso (a1) que comprende la proliferación de las células derivadas del músculo esquelético, preferiblemente para recibir $20-40 \times 10^6$ células.
- 20 5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el paso b) se lleva a cabo durante uno a seis días.
6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el paso (b) se lleva a cabo en un medio de cultivo celular que contiene 1-10 $\mu\text{g/ml}$ de TGFb1 y 10-30 $\mu\text{g/ml}$ de Heparina o 1-6 U/ml de Heparina.
- 25 7. Una población de células musculares lisas inducidas (iSMC) obtenidas por el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que las iSMC obtenidas en el paso (b) no son competentes para la fusión y **se caracterizan por** la expresión positiva de aSMA, CD49a y CD146.
- 30 8. Una población de células musculares lisas inducidas (iSMC) obtenidas a partir de MPC **caracterizadas por** la expresión positiva de aSMA, desmina, CD56, CD49a y CD146, la expresión negativa de CD34 y AChE y en la que las iSMC se **caracterizan además por la** expresión negativa de CD49e y en que no son competentes para la fusión.
- 35 9. Una población de células musculares lisas inducidas (iSMC) obtenidas a partir de MSC **caracterizadas por** la expresión positiva de aSMA, CD49a y CD 146, la expresión negativa de CD56 y AChE y en la que las iSMC se **caracterizan además por la** expresión negativa de CD49e y en que no son competentes para la fusión.
10. La población de células musculares lisas inducidas (iSMC) según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la que las iSMC expresan canales funcionales de calcio y/o potasio.
- 40 11. La población de células musculares lisas inducidas (iSMC) según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto.
12. La población de células musculares lisas inducidas para el uso según la reivindicación 11, en la que la enfermedad o el trastorno son deficiencias musculares lisas seleccionadas preferiblemente del grupo que consiste en incontinencia anal, incontinencia urinaria, enfermedad por reflujo, gastroparesia, vejiga hiperactiva e hipoactiva y/o en la que la deficiencia muscular lisa es una deficiencia de un músculo del esfínter.
- 45 13. La población de células musculares lisas inducidas según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 para su uso en ingeniería tisular o terapia celular.
14. Uso *in vitro* de células musculares lisas inducidas según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 para el control de fármacos.

PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS INDUCIDAS

Figura 1



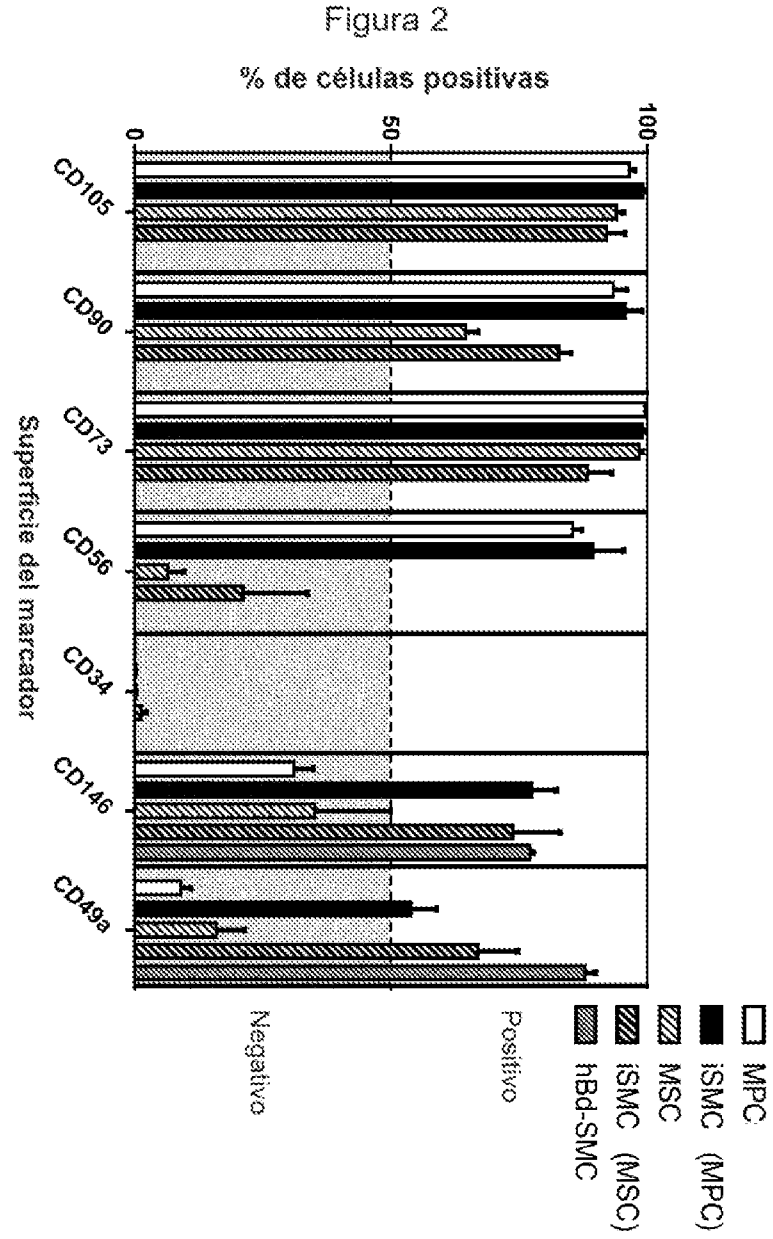


Figura 3

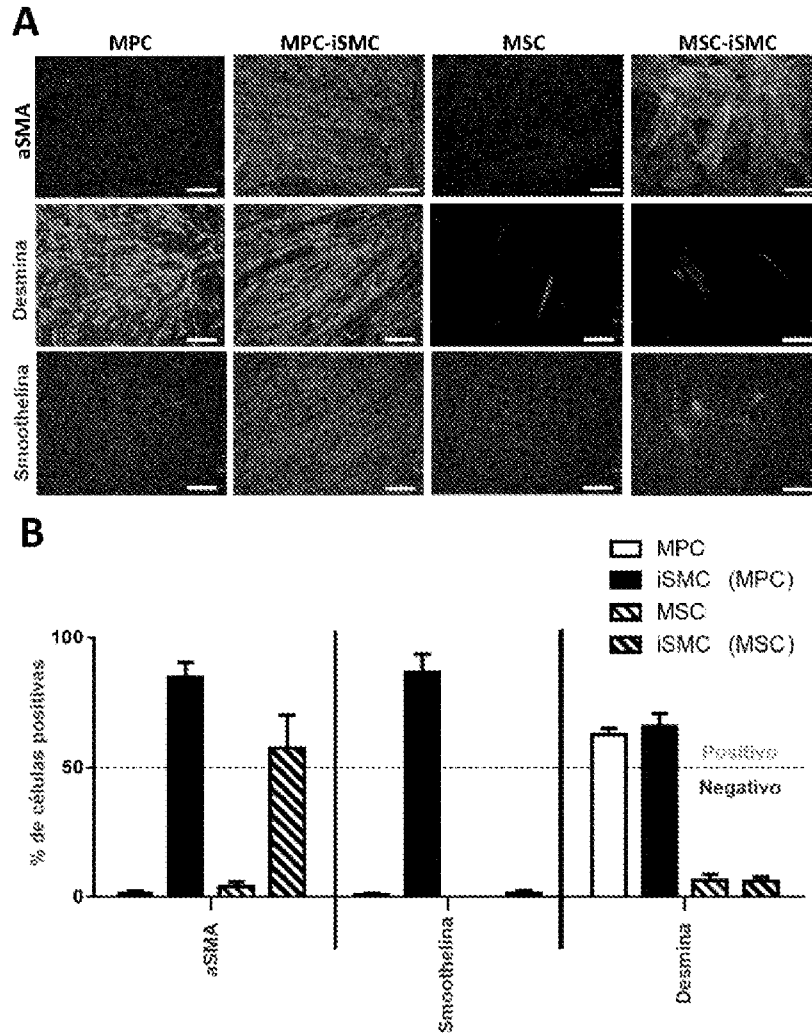


Figura 4

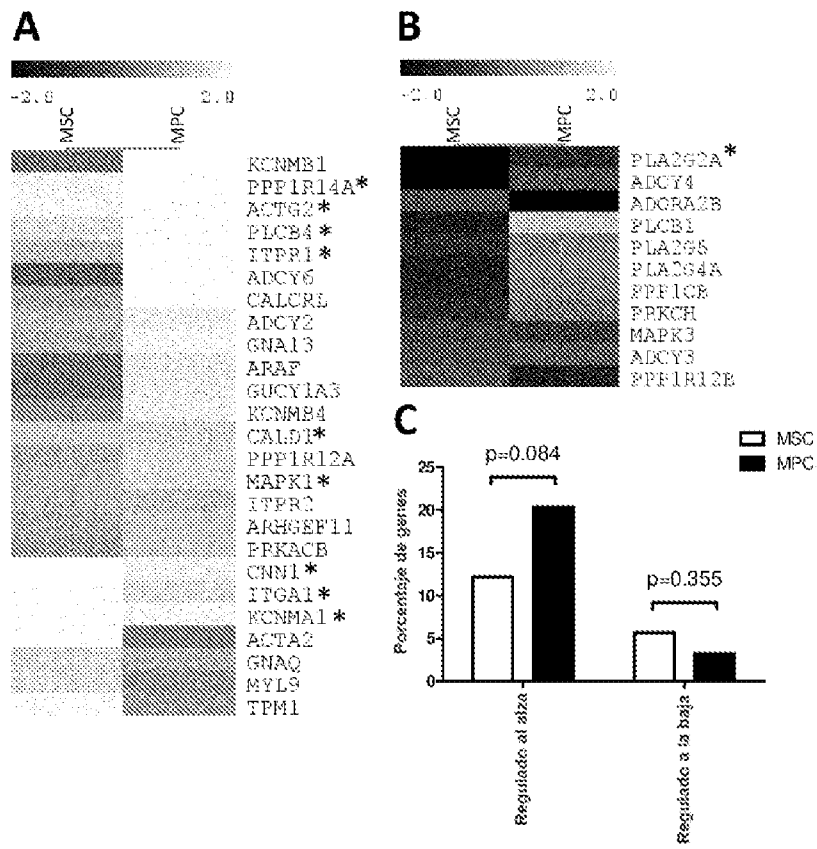


Figura 5

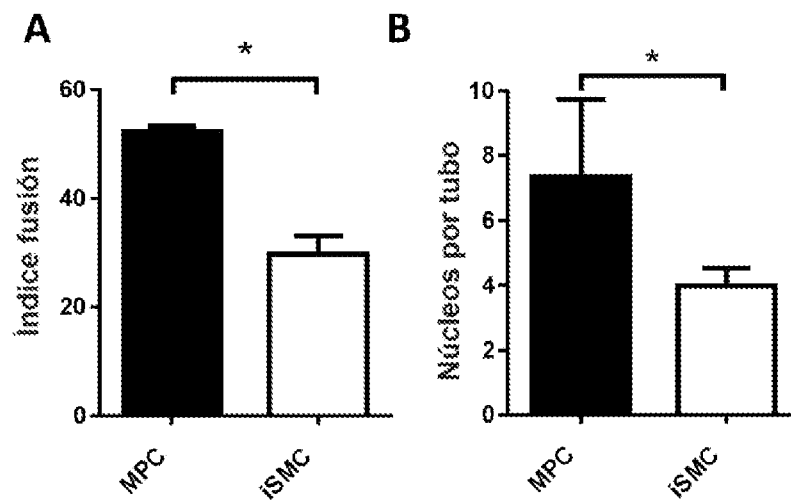
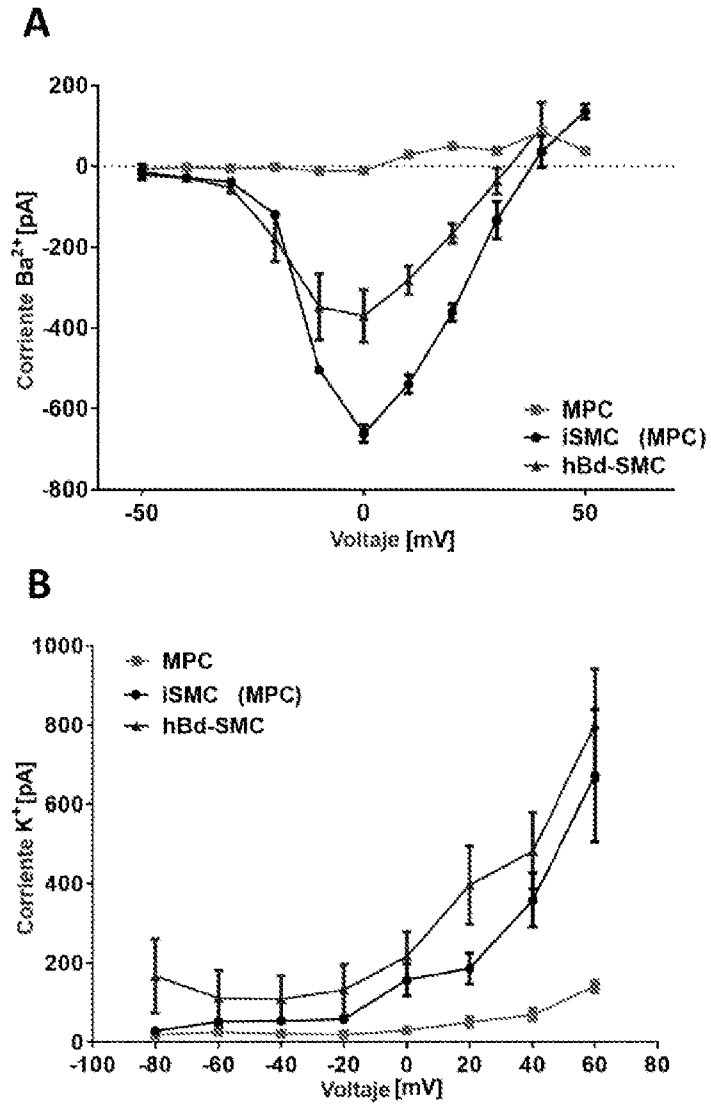


Figura 6



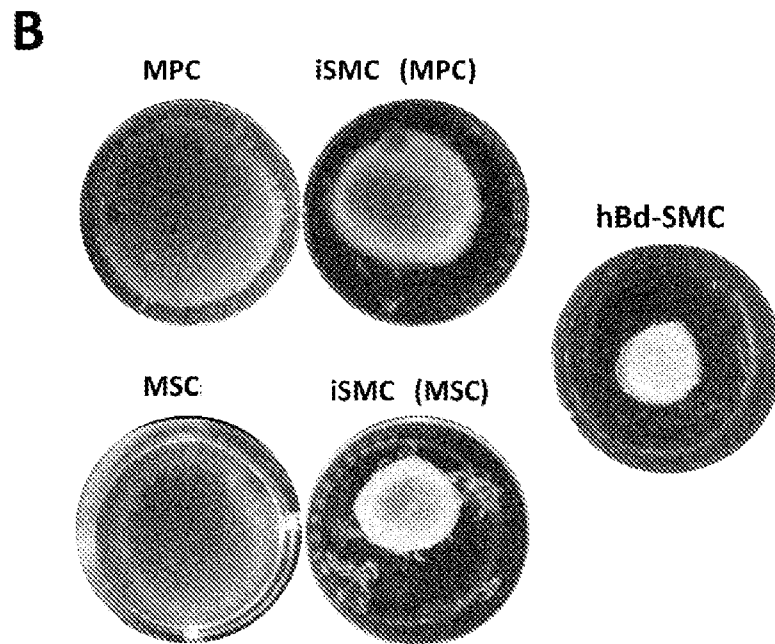
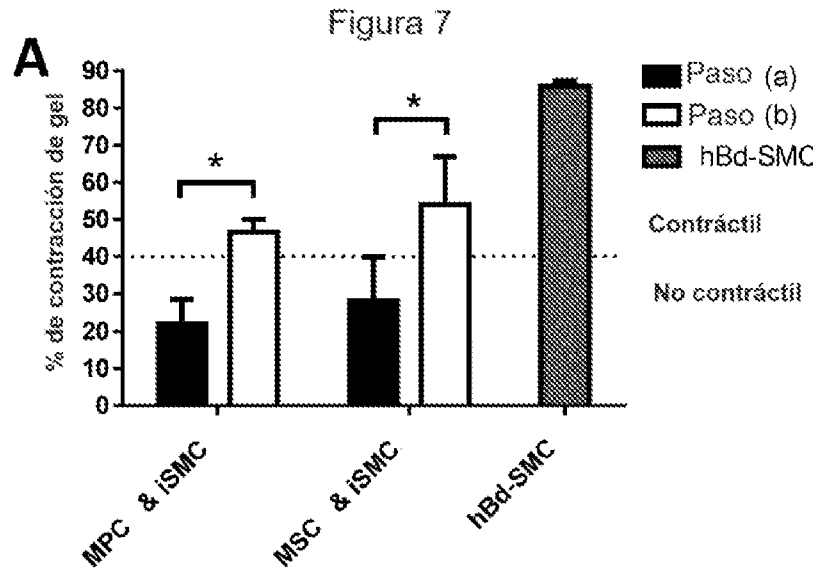


Figure 8

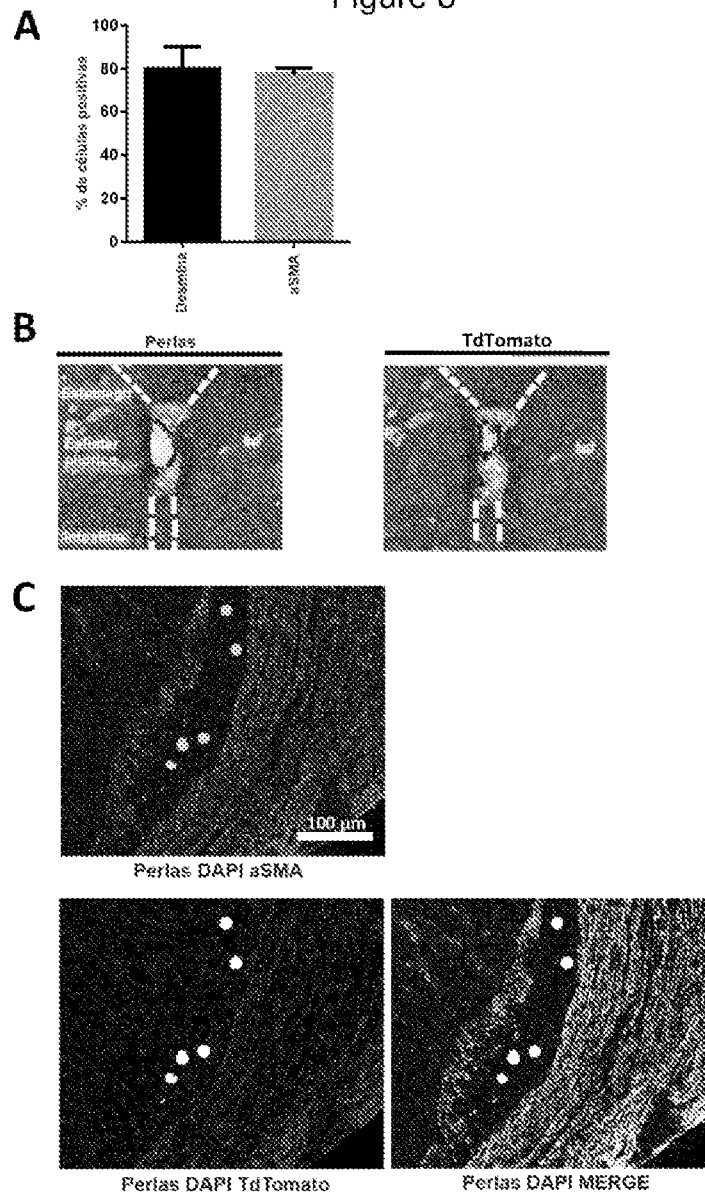


Figura 9

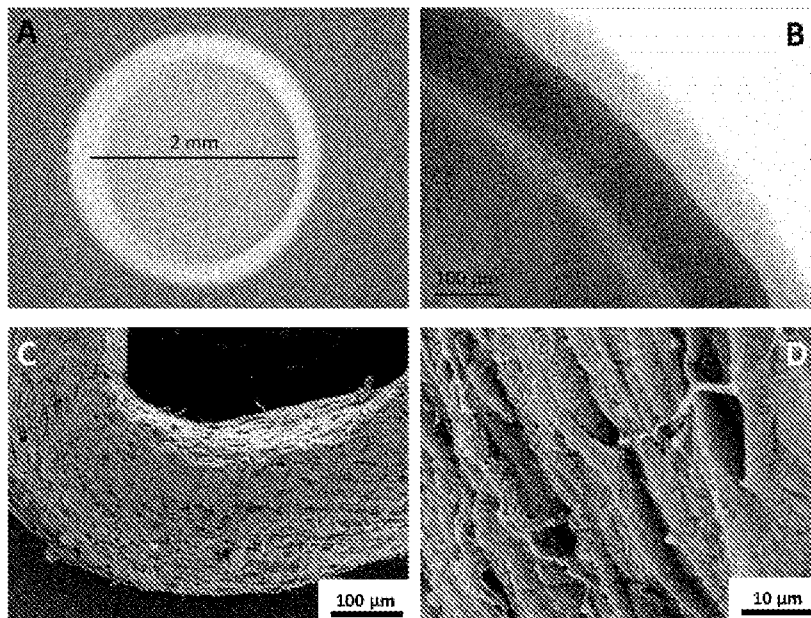


Figura 10

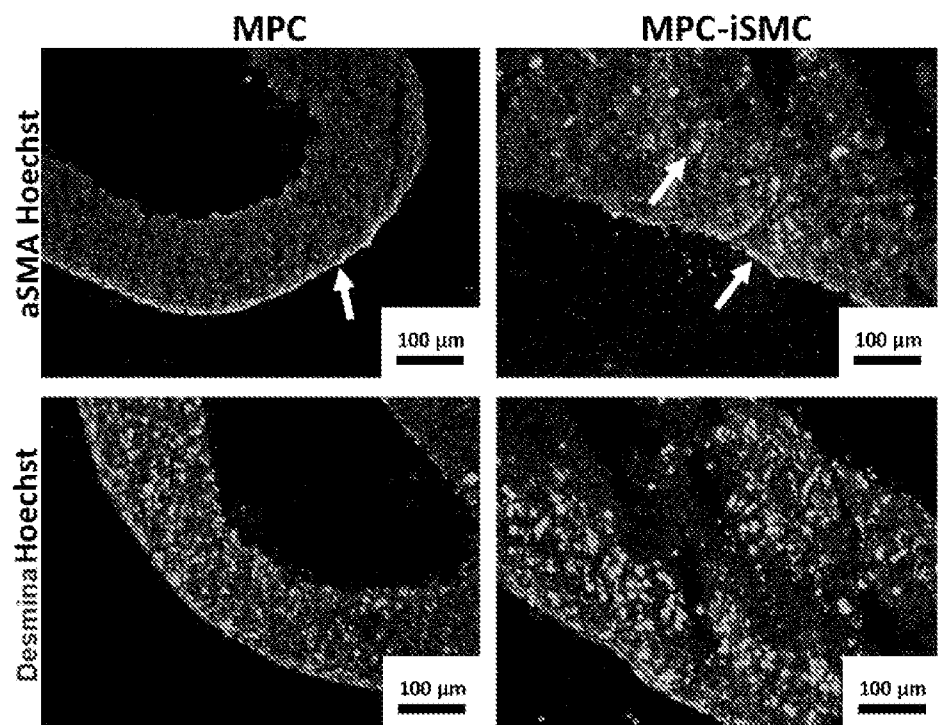


Figura 11

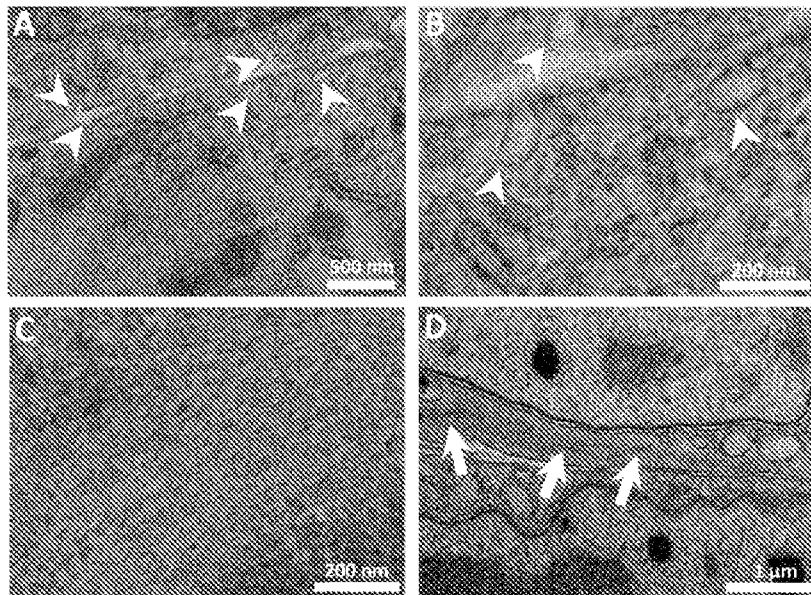


Figura 12

Gen	MSC	MPC	Gen	MSC	MPC	Gen	MSC	MPC
ACTA2	2.38*	0.22	GUCY1B3	-0.3	0.52	PLA2G6	-0.04	-0.15
ACTG2	1.89*	2.86	ITPR1	1.02*	2.86*	PLCB1	-1.5	1.02*
ADCY1	0.06	-0.02	ITPR2	0.98	1.06*	PLCB2	0.42	0.55
ADCY2	0	1.76*	ITPR3	-0.25	-0.04	PLCB3	-0.19	-0.31
ADCY3	-0.68	-0.48	KCNMA1	2.93*	1.91*	PLCB4	1.52*	3.27*
ADCY4	-3.34	-0.62	KCNMB1	0.03	3.85*	PPP1CA	-0.01	-0.02
ADCY5	-0.52	0.14	KCNMB2	-0.51	1.24*	PPP1CB	-1.38*	0.16
ADCY6	-0.23	2.25*	KCNMB3	-0.26	0.08	PPP1CC	-0.21	0.53
ADCY7	0.32	0.24	KCNMB4	0.48	1.74*	PPP1R12A	0.85	1.47*
ADCY8	0.11	0.12	KCNU1	0.49	0.08	PPP1R12B	-0.52	-1.36
ADCY9	0.14	0.68	MAP2K1	-0.22	0.59	PPP1R12C	-0.1	1.16*
ADORA2B	-0.66	-2.81	MAP2K2	-0.25	-0.93	PPP1R14A	1.83*	4.03*
ADRA1A	0.16	0.22	MAPK1	1*	1.44*	PRKACA	-0.13	0.29
ADRA1B	0.14	-0.41	MAPK3	-0.82	-0.94	PRKACB	0.62	1.22*
ADRA1D	0.24	0.3	MRV11	-0.13	-0.05	PRKACG	0.09	-0.38
AGTR1	0.65	0.23	MYH11	-0.23	0.7	PRKCA	0.23	-0.1
ARAF	0.04	1.65*	MYL6	0.11	0.37	PRKCB	-0.1	0.44
ARHGEF11	0.8	1.21*	MYL6B	-0.13	-1	PRKCD	0	0.68
ARHGEF12	0.38	0.01	MYL9	1.5*	0.49	PRKCE	1.02*	-0.32
AVPR1A	0.1	0.2	MYLK	-0.28	-0.16	PRKCG	0.39	0.13
AVPR1B	-0.18	-0.26	MYLK2	0.59	0.38	PRKCH	-1.14	-0.1
CACNA1C	-0.06	0.23	MYLK3	-0.15	0.52	PRKCQ	0.26	0.22
CACNA1D	0.03	0.16	MYLK4	-0.1	0.28	PRKGI	0.44	0.41
CACNA1F	0.39	0.17	NPR1	0.53	0.21	PTGIR	-0.37	0.41
CACNA1S	0.4	-0.41	NPR2	0.02	0.31	RAF1	-0.43	-0.73
CALCR1	0.69	2.22	PLA2G10	-0.14	-0.34	RAMP1	-0.36	-0.34
CALD1	1.21*	1.36*	PLA2G12A	0.09	0.79	RAMP2	-0.1	-0.31
CALM2	0.42	0.42	PLA2G12B	-0.14	-0.02	RAMP3	0.06	0.43
CALML3	-0.07	0.2	PLA2G1B	-0.09	0.45	RHOA	0.63	0.56
CALML4	-0.66	0.4	PLA2G2A	-4.99	-1.18	ROCK1	-0.21	0.22
CALML5	-0.2	-0.12	PLA2G2C	0.11	-0.21	ROCK2	0.03	0.84
CALML6	0.55	-0.14	PLA2G2D	0.08	0.39	ROCK2	0.42	0.84
CYP4A11	0.16	0.38	PLA2G2E	0.01	0.02	CNN1	4.06*	1.8*
EDNRA	0.19	-0.1	PLA2G2F	0.51	-0.17	DES	-0.36	0.08
GNA11	0.48	0.01	PLA2G3	-0.02	0.26	TPM1	1.96*	0.61
GNA12	0.56	0.32	PLA2G4A	-1.46	0.26	SMTN	-0.29	1.02*
GNA13	0.83	1.88*	PLA2G4C	-0.25	-0.1	TAGLN	1.06*	0.14
GNAQ	1.44*	0.88	PLA2G4D	-0.03	0.33	VCL	-0.3	-0.16
GNAS	0.2	0.51	PLA2G4E	-0.37	0.07	ITGA3	0.74	0.84
GUCY1A2	-0.11	-0.3	PLA2G4F	-0.29	0.2	ITGA1	2.77*	1.51*
GUCY1A3	0.05	1.7*	PLA2G5	-1.18	0.16	MCAM	0.17	0.6

Figura 13

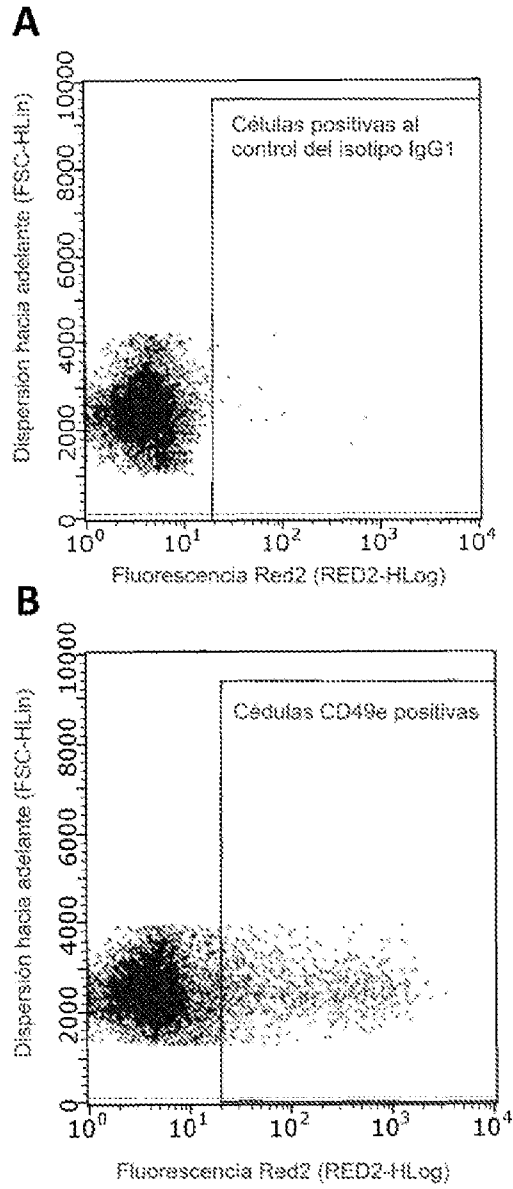


Figura 14

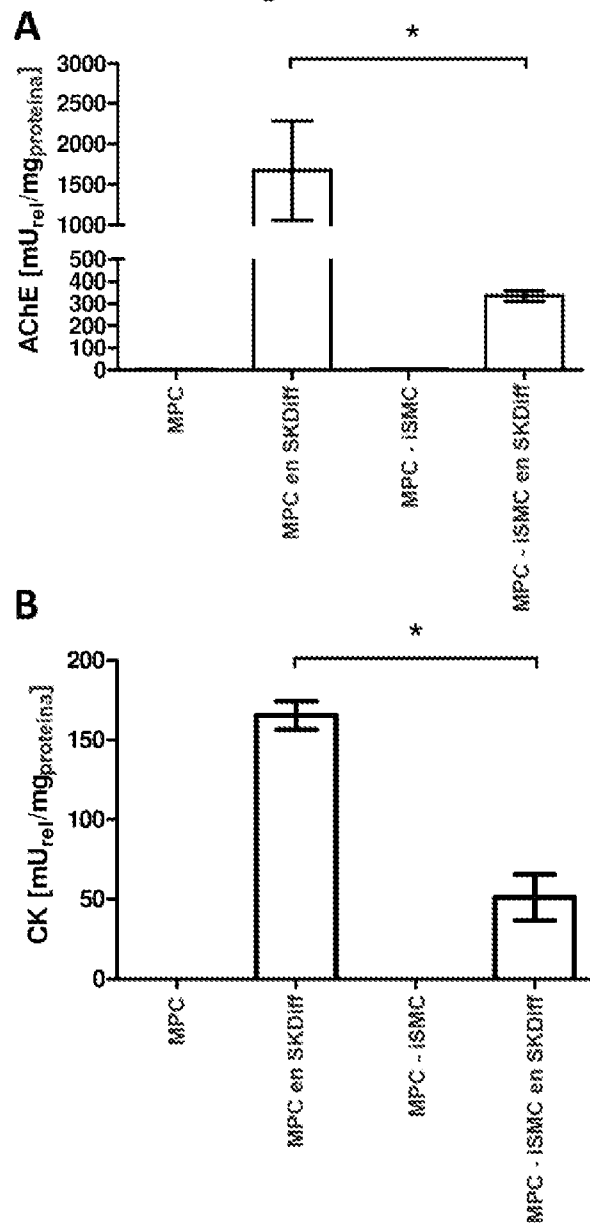


Figura 15

Marcador	SMDC CD56+ (Turner et al 2018)	SMDC CD56- (Turner et al 2018)	SMDC (Frudinger et al. 2018)	MPC	MSC	MPC-ISMIC	MSC-ISMIC
Mitocondrio esquelético	sí	no	sí	sí	no	no	no
Multipotente	no	sí	no	no	sí	no	no
CD105	+	+	+	+	+	+	+
CD90	+	+	+	+	+	+	+
CD73	+	+	+	+	+	+	+
CD56	+	-	+	+	-	+	-
CD34	-	-	-	-	-	-	-
CD146	-	-	-	-	-	+	+
CD49a	-	-	-	-	-	+	+
αSMA	-	-	-	-	-	+	+
Desmina	+	-	+	+	-	+	-
ACHE	+	-	+	+	-	-	-
CK	+	-	+	+	-	-	-