

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 823 234**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/19 (2006.01)

A61K 31/192 (2006.01)

A61K 31/185 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

A61K 31/415 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2011 PCT/US2011/049905**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2012 WO12030919**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2011 E 11822537 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 2613776**

54 Título: **Composición y método para la reparación y regeneración del músculo**

30 Prioridad:

01.09.2010 US 378996 P

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

06.05.2021

73 Titular/es:

**THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY (100.0%)
1020 Walnut Street
Philadelphia, PA 19017, US**

72 Inventor/es:

**IWAMOTO, MASAHIRO y
PACIFICI, MAURIZIO**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 823 234 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

Composición y método para la reparación y regeneración del músculo

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones para uso en reparación y regeneración del músculo.

5 Antecedentes de la invención

Las lesiones a los músculos incluyen lesiones agudas a los músculos del esqueleto, tales como contusiones (cardenales), laceraciones, isquemia, distensiones y rupturas completas. Estas lesiones pueden causar mucho dolor y pueden incapacitar a la persona afectada, evitando que sea capaz de asistir al trabajo o incluso de participar en actividades diarias normales.

10 Los músculos del esqueleto pueden lesionarse por una variedad de razones, incluyendo uso excesivo, trauma, infecciones y pérdida de circulación sanguínea. En general, los músculos tienen adecuada capacidad de reparación, en particular en gente joven, pero este proceso de reparación puede tornarse ineficaz en personas más viejas o después de repetidas rondas de uso excesivo, trauma severo u otros procesos. En tales casos, los músculos pierden la función y fuerza de contracción y pueden ser reemplazados por tejido cicatrizado (tejido conectivo) que, por pérdida de la contractilidad, causa pérdida de la función muscular. Las terapias corrientes incluyen masaje, ultrasonido, entrega hiperbárica de oxígeno y tratamientos con fármacos tales como fenoterol y factor-1 de crecimiento similar a la insulina. Estas terapias pueden suministrar algún resultado benéfico, pero están lejos de ser ideales en términos de efectividad y eficiencia. Adicionalmente, las terapias actuales no están dirigidas específicamente hacia mecanismos básicos de reparación y regeneración de la célula del músculo.

20 El documento WO 2010/088735 A1 describe un método para el uso de células progenitoras en diferenciación y/o reparación y/o regeneración de tejidos u órganos, en el que las células progenitoras son cultivadas con un retinoide antes de la administración.

De acuerdo con ello, existe una necesidad por métodos y composiciones que induzcan la reparación y regeneración del músculo, de manera rápida y efectiva.

25 Resumen de la invención

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones anexas. Cualquier otra divulgación de la presente descripción, independientemente de si se indica que es preferida o ejemplificada, no forma parte de la presente invención.

30 También se describe en esta memoria, pero no como realización de la invención reivindicada, un método para la reparación o regeneración del músculo en un sujeto, en el que el método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de receptor de ácido retinoico (RAR) a un sujeto, el cual tiene un tejido muscular dañado. El agonista de RAR puede ser un agonista de RAR γ .

Igualmente, métodos adicionales del tratamiento descritos en esta memoria, no son realizaciones consideradas de la invención reivindicada.

35 Un aspecto de la invención se refiere a un agonista de receptor gamma de ácido retinoico (RAR γ) para uso en la reparación o regeneración del músculo en un sujeto, en el que el uso comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva del agonista de receptor gamma de ácido retinoico (RAR γ) a un sujeto con tejido muscular dañado, para reparar o regenerar de ese modo el tejido muscular dañado. En una realización, la administración es local o sistémica. En una realización, la administración comienza durante un período de tiempo de señalización incrementada de retinoide endógeno en el sujeto, resultante del compromiso del tejido muscular dañado. En una realización, la administración comienza con posterioridad a 3 días después del compromiso del tejido muscular dañado por el sujeto. En una realización, la administración comienza aproximadamente 4 días después del compromiso del tejido muscular dañado por el sujeto. En una realización, la administración comienza aproximadamente 5 días después del compromiso del tejido muscular dañado por el sujeto. En una realización, la administración comienza aproximadamente 6 días después del compromiso del tejido muscular dañado por el sujeto. En una realización, la administración comienza aproximadamente 7 días después del compromiso del tejido muscular dañado por el sujeto. En una realización, la administración comienza aproximadamente 5 días, y continúa por menos día 7 después del compromiso del tejido muscular dañado por el sujeto. En una realización, la administración continúa hasta por lo menos el día 9 después del compromiso del tejido muscular dañado por el sujeto. El tejido muscular dañado puede ser el resultado de una lesión física o accidente, enfermedad, infección, exceso de uso, pérdida de circulación sanguínea o atrofia o desgaste muscular. En una realización, el tejido muscular dañado es un resultado de una miopatía. En una realización, la miopatía es una miopatía inflamatoria. En una realización, la miopatía es miositis ossificans. En una realización, la miopatía es distrofia muscular. En una realización, el sujeto tiene daño en el músculo esquelético.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un agonista de receptor gamma de ácido retinoico (RAR γ) para uso

en la reducción del daño de tejido muscular en un sujeto con una miopatía por daño muscular, el uso que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva del agonista de RAR γ a dicho sujeto, para reducir de ese modo dicho daño en el tejido muscular. En una realización, el sujeto tiene daño en el músculo esquelético. En otra realización, la miopatía por daño muscular es una miopatía inflamatoria. En una realización, la miopatía por daño muscular es miositis ossificans. En una realización, la miopatía por daño muscular es una distrofia muscular. En una realización, el agonista de receptor gamma de ácido retinoico (RAR γ) para uso de acuerdo con el primer o segundo aspectos de la invención, comprende además la administración de un agente antiinflamatorio al sujeto. En realizaciones individuales: (i) el agonista de RAR γ es un agonista selectivo de RAR γ ; (ii) el agonista de RAR γ es un agonista selectivo de RAR γ/β ; (iii) el agonista de RAR γ tiene por lo menos 5 veces más afinidad de enlace por el receptor RAR γ , comparado con el receptor RAR β ; o (iv) el agonista de RAR γ tiene por lo menos 10 veces más afinidad de enlace por receptores RAR γ comparado con receptores RAR β . En una realización, el músculo lesionado es el resultado de lesión física o accidente, enfermedad, infección, uso excesivo, pérdida de circulación sanguínea o atrofia o desgaste muscular, y/o en los que el tejido muscular lesionado es músculo distrófico o un músculo envejecido, preferiblemente en el que el sujeto tiene miositis ossificans. En una realización, el agonista de RAR γ es seleccionado de entre el grupo que consiste en CD-271 (ácido 6-(4-metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-1530 (ácido 4-(6-hidroxi-7-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il-2-naftalenil)benzoico); CD-2247; palovaroteno (4-[(1E)-2-[5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-3-(ácido 1H-pirazol-1-ilmetil)-2-naftalenil]-etenil]-benzoico); BMS-270394 (ácido 3-fluoro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); BMS-189961 (ácido 3-fluoro-4-[2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); CH-55 (ácido 4-[(E)-3-(3,5-di-tert-butil-fenil)-3-oxo-propenil]-benzoico); ácido 6-[3-(adamantan-1-il)-4-(prop-2-iniloxi)fenil]naftaleno-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftaleno-2-il)propenil]tiofeno-2-carboxílico; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. en una realización, el agonista de RAR γ es ácido 4-[(1E)-2-[5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-3-(1H-pirazol-1-ilmetil)-2-naftalenil]-etenil]-benzoico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El sujeto puede ser un mamífero. El sujeto puede ser un ratón. El sujeto puede ser un humano. Además, se describe en esta memoria un método de reparación o regeneración del músculo en un sujeto, que comprende la administración de células pluripotentes o multipotentes de tallo que han sido tratadas previamente con un agonista de RAR γ , al sujeto en el sitio de la lesión del músculo, para reparar o regenerar de ese modo el músculo en el sitio. En los métodos descritos en esta memoria, la lesión del músculo puede ser una lesión de tejido compuesto. En los métodos descritos en esta memoria, la lesión de tejido compuesto puede comprender una lesión al músculo y hueso. En los métodos descritos en esta memoria, las células pretratadas de tallo pueden ser administradas en combinación con células no tratadas de tallo. En los métodos descritos en esta memoria, las células pretratadas de tallo y células no tratadas de tallo pueden ser administradas en una relación de 1:1. En los métodos descritos en esta memoria, las células pretratadas de tallo pueden haber sido pretratadas con el agonista de RAR γ por un periodo de aproximadamente 3 días. En los métodos descritos en esta memoria, las células pluripotentes de tallo pueden ser células pluripotentes inducidas de tallo. En los métodos descritos en esta memoria, las células pluripotentes de tallo pueden ser células de tallo mesenquimal. En los métodos descritos en esta memoria, la administración puede ser local. En los métodos descritos en esta memoria, la administración puede ser realizada por trasplante de las células dentro del sujeto. En los métodos descritos en esta memoria, las células pluripotentes de tallo pueden ser autólogas o heterólogas del sujeto. En los métodos descritos en esta memoria, las células pluripotentes de tallo pueden ser de mamíferos. En los métodos descritos en esta memoria, las células pluripotentes de tallo pueden ser de roedor. En los métodos descritos en esta memoria, las células pluripotentes de tallo pueden ser humanas. En los métodos descritos en esta memoria, el método puede comprender además la administración de una gente antiinflamatorio al sujeto. En los métodos descritos en esta memoria, el agonista de RAR γ puede ser seleccionado de entre el grupo que consiste en CD-271 ácido (6-(4-metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-394, CD-437 ácido (6-(4-hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-1530 ácido (4-(6-hidroxi-7-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il-2-naftalenil)benzoico); CD-2247; palovaroteno (ácido 4-[(1E)-2-[5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-3-(1H-pirazol-1-ilmetil)-2-naftalenil]-etenil]-benzoico); BMS-270394 ácido (3-fluoro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); BMS-189961 ácido (3-fluoro-4-[2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); CH-55 ácido (4-[(E)-3-(3,5-di-tert-butil-fenil)-3-oxo-propenil]-benzoico); ácido 6-[3-(adamantan-1-il)-4-(prop-2-iniloxi)fenil]naftaleno-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftaleno-2-il)propenil]tiofeno-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y combinaciones de ellos. En los métodos descritos en esta memoria, el músculo lesionado puede ser el resultado de lesión física o accidente, enfermedad, infección, uso excesivo, pérdida de circulación sanguínea o atrofia o desgaste muscular. En los métodos descritos en esta memoria, el tejido muscular lesionado puede ser músculo distrófico o un músculo envejecido. En los métodos descritos en esta memoria, el músculo lesionado puede ser el resultado de atrofia/desgaste muscular.

Además, en esta memoria se describe un método para la inducción o estimulación de diferenciación miogénica de células de tallo mesenquimal aisladas in vitro, que comprende el contacto de las células de tallo mesenquimal con una cantidad efectiva de un agonista de receptor gamma de ácido retinoico (RAR γ). En los métodos descritos en esta memoria, el contacto puede ser por un periodo de tiempo seleccionado del grupo consistente en aproximadamente 12 horas, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, y aproximadamente 3 días.

Además, en esta memoria se describe un método para la inducción o estimulación de diferenciación dirigida al linaje

de una célula pluripotente de tallo en un linaje mesenquimal, en el que el método comprende el contacto de la célula pluripotente de tallo con una cantidad efectiva de un agonista de receptor gamma de ácido retinoico (RAR γ). En los métodos descritos en esta memoria, la célula pluripotente de tallo puede ser una célula pluripotente inducida de tallo.

5 En los métodos descritos en esta memoria, el linaje mesenquimal puede ser seleccionado del grupo consistente en miogénico, osteogénico, condrogénico, tendonogénico, ligamentogénico, estromagénico de médula, adipogénico, y dermogénico. En los métodos descritos en esta memoria, la célula pluripotente de tallo puede ser de mamífero. En los métodos descritos en esta memoria, la célula pluripotente de tallo puede ser de roedor. En los métodos descritos en esta memoria, la célula pluripotente de tallo puede ser de humano. En los métodos descritos en esta memoria, el agonista de RAR γ puede ser seleccionado de entre el grupo que consiste en CD-271 (ácido 6-(4-metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-1530 (ácido 4-(6-hidroxi-7-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il-2-naftalenil)benzoico); CD-2247; palovaroteno (ácido 4-[(1E)-2-[5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-3-(1H-pirazol-1-ilmetil)-2-naftalenil]-etenil]-benzoico); BMS-270394 (ácido 3-fluoro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); BMS-189961 (ácido 3-fluoro-4-[2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); CH-55 (ácido 4-[(E)-3-(3,5-di-tert-butil-fenil)-3-oxo-propenil]-benzoico); ácido 6-[3-(adamantan-1-il)-4-(prop-2-iniloxi)fenil]naftaleno-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftaleno-2-il)propenil]tiofeno-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y combinaciones de ellos.

20 Además, en esta memoria se describe una composición que comprende células de tallo mesenquimal, en el que una porción de las células de tallo mesenquimal ha sido tratada previamente mediante contacto con un agonista de RAR γ , para generar de ese modo células pretratadas de tallo mesenquimal. En las composiciones descritas en esta memoria, la porción de células pretratadas de tallo mesenquimal puede ser seleccionada de entre el grupo que consiste en 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, y 90%.

25 Además, en esta memoria se describe una composición que comprende una población de células pluripotentes de tallo, en la que por lo menos una célula de la población tuvo contacto con un agonista de RAR γ para generar de ese modo una a célula pretratada pluripotente de tallo. en las composiciones descritas en esta memoria, la célula pluripotente de tallo puede ser una célula pluripotente inducida. en las composiciones descritas en esta memoria, la célula pluripotente de tallo puede ser una célula de tallo mesenquimal. en las composiciones descritas en esta memoria, la célula de tallo puede ser una célula aislada de tallo. en las composiciones descritas en esta memoria, la célula de tallo puede ser de mamífero. en las composiciones descritas en esta memoria, la célula de tallo puede ser murina. en las composiciones descritas en esta memoria, la célula de tallo puede ser humana. en las composiciones descritas en esta memoria, el agonista de RAR γ puede ser seleccionado de entre el grupo que consiste en CD-271 (ácido 6-(4-metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-1530 (ácido 4-(6-hidroxi-7-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il-2-naftalenil)benzoico); CD-2247; palovaroteno (ácido 4-[(1E)-2-[5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-3-(1H-pirazol-1-ilmetil)-2-naftalenil]-etenil]-benzoico); BMS-270394 (ácido 3-fluoro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); BMS-189961 (ácido 3-fluoro-4-[2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); CH-55 (ácido 4-[(E)-3-(3,5-di-tert-butil-fenil)-3-oxo-propenil]-benzoico); ácido 6-[3-(adamantan-1-il)-4-(prop-2-iniloxi)fenil]naftaleno-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftaleno-2-il)propenil]tiofeno-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y combinaciones de ellos.

Además, en esta memoria se describe una composición farmacéutica que comprende una composición que comprende una población de célula pluripotente de tallo descrita en esta memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Además, en esta memoria se describe un kit para la reparación o regeneración del músculo, que comprende por lo menos uno de un agonista de RAR γ , un agonista de RAR γ y una célula de tallo, o una composición que comprende una célula de tallo, descrita en esta memoria. En los kits descritos en esta memoria, la célula de tallo puede ser una célula pluripotente inducida de tallo. En los kits descritos en esta memoria, la célula de tallo puede ser una célula de tallo mesenquimal. En los kits descritos en esta memoria, el agonista de RAR γ puede ser formulado en una composición farmacéutica. En los kits descritos en esta memoria, el agonista de RAR γ puede ser formulado para aplicación tópica. En los kits descritos en esta memoria, la célula de tallo puede ser una célula aislada de tallo. En los kits descritos en esta memoria, la célula de tallo puede ser de mamífero. En los kits descritos en esta memoria, la célula de tallo puede ser de roedor. En los kits descritos en esta memoria, la célula de tallo puede ser de humano. En los kits descritos en esta memoria, el agonista de RAR γ puede ser seleccionado de entre el grupo que consiste en CD-271 (ácido 6-(4-metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-1530 (ácido 4-(6-hidroxi-7-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il-2-naftalenil)benzoico); CD-2247; palovaroteno (ácido 4-[(1E)-2-[5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-3-(1H-pirazol-1-ilmetil)-2-naftalenil]-etenil]-benzoico); BMS-270394 (ácido 3-fluoro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); BMS-189961 (ácido 3-fluoro-4-[2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); CH-55 (ácido 4-[(E)-3-(3,5-di-tert-butil-fenil)-3-oxo-propenil]-benzoico); ácido 6-[3-(adamantan-1-il)-4-(prop-2-iniloxi)fenil]naftaleno-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-

tetrahidronaftaleno-2-il)propenil]tiofeno-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y combinaciones de ellos. En los kits descritos en esta memoria, el kit puede comprender además instrucciones para el uso.

Breve descripción de los dibujos

5 La figura 1 es un gráfico de barras de datos obtenidos a partir del análisis histológico de tejido de músculos del esqueleto 4 semanas después de la lesión. Para evaluar y cuantificar los cambios de la estructura del tejido de músculos del esqueleto, se tomaron imágenes de secciones seriales teñidas con tricromo y se usaron para determinar las cantidades relativas de fibra del músculo, tejidos fibroso y adiposo en áreas múltiples definidas, mediante software ImagePro. Las áreas analizadas tenían 9 x 9 cuadrículas cada una (aproximadamente 3 x 3 mm) que incluían el sitio lesionado original (2 x 2 mm). Nótese que la lesión del músculo causó una disminución en el área de fibra muscular total y un aumento acompañante en las áreas de tejidos fibroso y adiposo. En contraste, el tratamiento con CD1530 restauró de manera importante la composición del tejido.

La figura 2 es una representación gráfica de los datos obtenidos a partir de análisis histomorfométrico de la composición del músculo lesionado.

15 La figura 3 son nombres y estructuras químicas de algunos agonistas de RAR γ ejemplares.

La figura 4 es una serie de gráficos de barras con datos de resultados experimentales, que indican que la concentración local de RA desciende primero y luego aumenta de manera transitoria después de la lesión del músculo.

La figura 5 es una serie de gráficos de líneas con datos de resultados experimentales, que indican que la concentración local de RA disminuye primero y luego aumenta de manera transitoria después de la lesión del músculo.

20 La figura 6 es un gráfico de barras de datos obtenidos a partir del análisis histológico de tejido muscular de esqueleto, 4 semanas después de la lesión, siguiendo los tiempos indicados de tratamiento con agonista de RAR γ . En el gráfico, el izquierdo lleno en segmento indica músculo. El segmento que está a la derecha de aquel es mostrado como abierto (blanco) e indica adiposo. El segmento a la derecha de aquel, lleno, indica tejido fibroso.

Descripción detallada de la invención

25 Aspectos de la invención se refieren al hallazgo según el cual las células progenitoras de tallo pueden ser inducidas para soportar diferenciación de músculo por exposición crónica o aguda a agonista de receptor gamma de ácido retinoico (RAR γ s). De acuerdo con ello, en un aspecto, la invención suministra un agonista de receptor gamma de ácido retinoico (RAR γ) para uso en la reparación o regeneración del músculo en un sujeto, en el que el uso comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de receptor gamma de ácido retinoico (RAR γ) a un sujeto, el cual tiene un tejido muscular dañado, para reparar o regenerar de ese modo el tejido muscular dañado.

30 Como se usa en esta memoria, el término "tejido muscular dañado" se refiere a un tejido muscular, tal como un músculo esquelético o cardíaco, que ha sido alterado por ejemplo por una lesión física o accidente, enfermedad, infección, uso excesivo, pérdida de circulación sanguínea, o por factores genéticos o ambientales. Un tejido muscular dañado puede ser un músculo distrófico o un músculo envejecido. Los ejemplos de síntomas de daño muscular incluyen hinchamiento, formación de cardenales o enrojecimiento, cortes abiertos como consecuencia de una lesión, dolor en reposo, dolor cuando se usa un músculo específico o la articulación en relación con aquel músculo, debilidad del músculo o tendones y una inhabilidad absoluta para usar el músculo.

35 El tejido muscular dañado puede ser el resultado de atrofia/desgaste muscular. El tejido muscular dañado puede ser el resultado de una lesión física.

El músculo dañado puede ser un músculo esquelético.

40 La enfermedad que da como resultado tejido muscular dañado puede ser una miopatía. Sin limitación, la miopatía puede ser una miopatía congénita o una miopatía adquirida. Las miopatías ejemplares incluyen distrofias, miononía (neuromiononía), miopatías congénitas (por ejemplo miopatía nemalina, miopatía multi/mininúcleo, miopatía centronuclear (o miopatía miotubular)), miopatías mitocondriales, parálisis periódica familiar, miopatías inflamatorias, miopatías metabólicas (por ejemplo enfermedad de almacenamiento de glicógeno y desorden de almacenamiento de lípidos), dermatomiositis, polimiositis incluyendo miositis corporal, miositis ossificans, rabdomiólisis y mioglobulinurias.

45 La miopatía puede ser una distrofia seleccionada de entre el grupo que consiste en distrofia muscular, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia simpática de Reflex, distrofia de retina, distrofia de Conal, distrofia miotónica, distrofia de córnea, y cualquier combinación de ellas.

50 Sin desear estar atados a una teoría, los métodos descritos en esta memoria reducen y/o inhiben la formación de tejido de cicatriz en el tejido muscular dañado. De acuerdo con ello la formación de tejido de cicatriz en el tejido muscular dañado puede ser reducida en por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%,

por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60 %, por lo menos 70 %, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o 100% (reducción completa) respecto a un nivel de referencia.

5 La cantidad de tejido adiposo y/o tejido conectivo en el tejido muscular dañado puede ser reducida en por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60 %, por lo menos 70 %, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o 100% (reducción completa) respecto a un nivel de referencia.

10 Nuevamente, sin desear estar atados a una teoría, los métodos descritos en esta memoria conducen a un incremento en la cantidad de cadena pesada de miosina (MHC) en el tejido muscular dañado. De acuerdo con ello, la cantidad de cadena pesada de miosina (MHC) en el tejido muscular dañado puede aumentar en por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60 %, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90 %, por lo menos, 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, o 100 veces o más, respecto al nivel de referencia.

15 Adicionalmente, los métodos descritos en esta memoria aumentan el número de células de tipo músculo elongadas positivas para MHC. De acuerdo con ello, el número de células de tipo músculo elongadas positivas para MHC en el tejido muscular dañado puede aumentar en por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60 %, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90 %, por lo menos, 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, o 100 veces o más, respecto al nivel de referencia.

20 Como se discute en esta memoria, las células progenitoras de tallo pueden ser inducidas o estimuladas para que soporten diferenciación de músculo, mediante exposición aguda o crónica a agonistas de receptor gamma de ácido retinoico (RAR γ). De acuerdo con ello, se observa un incremento en los factores miogénicos reguladores. Los factores reguladores miogénicos son factores de transcripción de hélice-bucle-hélice básicos (bHLH) que regulan la miogénesis. Véase por ejemplo, Perry, R. & Rudnick, M. (2000). "Molecular mechanisms regulating miogenic determination and differentiation", *Front Biosci* 5: D750-67 (2000). Los factores miogénicos reguladores ejemplares incluyen MioD (Myf3), Myf5, miogenina, y MRF4 (Myf6). MioD es uno de los marcadores más tempranos de compromiso miogénico. El MioD es expresado en células satélite activadas, pero no en células satélite inactivas. Aunque MioD marca el compromiso de mioblasto, el desarrollo del músculo no es cortado dramáticamente en ratones mutantes que carecen del gen MioD. Es probable que esto sea debido a redundancia funcional de Myf5.

30 De acuerdo con ello, el nivel de por lo menos factor regulador miogénico en el tejido muscular dañado puede aumentar en por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60 %, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90 %, por lo menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, o 100 veces o más, respecto al nivel de referencia.

35 La cantidad de por lo menos una laminina en el tejido muscular dañado puede incrementarse en por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60 %, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90 %, por lo menos, 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, o 100 veces o más, respecto al nivel de referencia.

Agonistas de receptor de ácido retinoico (RAR)

40 Como se usa en esta memoria, el término "agonista de RAR" es cualquier compuesto que es capaz de transactivar cualquiera de los receptores de ácido retinoico con un ED50 menor que 1000nM, menor que 500nM, menor que 250nM, menor que 200nM, menor que 100nM, menor que 50nM, menor que 25nM, menor que 20nM, menor que 10nM, menor que 1nM, menor que 0.1nM, menor que 0.01nM, o menor que 0.001nM.

45 Los receptores de retinoide son clasificados en dos familias, los receptores de ácido retinoico (RARs) y los receptores de retinoide X (RXRs), en los que cada uno consiste en tres subtipos distintos α , β , y γ . Cada subtipo de la familia de gen de RAR codifica un número variable de isoformas que surge del entretejido diferencial de dos transcripciones primarias de ARN. El ácido retinoico todo trans (ATRA) y sus otros análogos retinoides que ocurren de modo natural (ácido 9-cis retinoico, ácido 3-4 dideshidro retinoico todo trans, ácido 4-oxo retinoico y retinol) son compuestos reguladores pleiotrópicos que se enlazan con receptores retinoides. Por ejemplo, el ATRA se enlaza con aproximadamente igual afinidad con todos los tres subtipos de RAR, pero no se enlaza con los receptores de RXR. En lugar de ello, para estos receptores, el ácido 9-cis retinoico es el ligando natural.

50 Como se usa en esta memoria, el término "transactivación" se refiere a la habilidad de un agonista de RAR para activar la transcripción de un gen, donde la transcripción de gen es iniciada por el enlace de un ligando receptor particular de ácido retinoico que se está probando, es decir, RAR α , RAR β , o RAR γ . La determinación de la habilidad de un compuesto para transactivar receptor de ácido retinoico puede ser ejecutada mediante métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. En Bernard et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 186: 977-983 (1992) y Apfel et al., *Proc. Nat. Sci. Acad. (USA)*, 89: 7129-7133 (1992) se encuentran ejemplos de tales métodos.

55 El agonista de RAR puede ser un agonista selectivo de RAR γ . Como se usa en esta memoria, el término "agonista selectivo de RAR γ " se refiere a un compuesto que es capaz de enlazarse selectivamente al receptor de RAR γ y

promover la activación de RAR γ . Generalmente, los agonistas selectivos de RAR γ se enlazarán con el receptor de RAR γ a concentraciones significativamente más bajas que los receptores RAR α y RAR β . Por ejemplo, un agonista selectivo de RAR γ se enlazará con el receptor de RAR γ con una selectividad de más de 5 veces, más de 10 veces, más de 20 veces, más de 30 veces, más de 40 veces, más de 50 veces, más de 60 veces, más de 70 veces, más de 80 veces, más de 90 veces o más, que los receptores de RAR α y RAR β .

La selectividad de agonista de RAR γ de un compuesto puede ser determinada mediante ensayos rutinarios de enlace de ligando, conocidos por alguien con destreza en la técnica, tales como se describen en Apfel et al., Proc. Nat. Sci. Acad. (USA), 89: 7129-7133 (1992); M. Teng et al., J. Med. Chem., 40: 2445-2451 (1997); y PCT Pub. No. WO1996/30009.

El agonista de RAR puede ser un agonista selectivo de RAR γ/β . Como se usa en esta memoria, el término "agonista selectivo de RAR γ/β " se refiere a un compuesto que se enlaza selectivamente con receptores de RAR γ y RAR β , promoviendo la activación de RAR γ y RAR β y moderando la activación de receptores de RAR α .

El agonista de RAR puede ser un agonista de RAR que es por lo menos selectivo para gamma y es moderador para RAR α . Como se usa en esta memoria, el término "agonista de RAR que es por lo menos selectivo para gamma y es moderador para RAR α " se refiere a un compuesto que es selectivo para RAR γ o selectivo para RAR γ/β .

El agonista de RAR puede ser un panagonista de RAR. Como se usa en esta memoria, el término "panagonista de RAR" se refiere a un compuesto que se enlaza con receptores de RAR α , RAR β , y RAR γ con afinidad similar, promoviendo la activación de RAR α , RAR β , y RAR γ .

Los agonistas ejemplares de RARs incluyen CD-271 (ácido 6-(4-metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-1530 (ácido 4-(6-hidroxi-7-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il-2-naftalenil)benzoico); CD-2247; palovaroteno (ácido 4-[(1E)-2-[5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-3-(1H-pirazol-1-ilmetil)-2-naftalenil]-etenil]-benzoico); BMS-270394 (ácido 3-fluoro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); BMS-189961 (ácido 3-fluoro-4-[2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); CH-55 (ácido 4-[(E)-3-(3,5-di-tert-butil-fenil)-3-oxo-propenil]-benzoico); ácido 6-[3-(adamantan-1-il)-4-(prop-2-iniloxi)fenil]naftaleno-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftaleno-2-il)propenil]tiofeno-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Otros agonistas de RARs dispuestos para la presente invención son descritos, por ejemplo, en los documentos U.S. Pat. No. 5,624,957; No. 5,760,084; No. 6,331,570; No. 6,300,350; No. 5,700,836; No. 5,726,191; No. 5,498,795; No. 5,130,335; sol. de pat. int. pub. No. WO1997/037648, No. WO2007/068579, y No. WO2007/068580; solicitud de patente francesa No. FR2739557 publicada el 11 de abril de 1997; y patente japonesa pub. No. 62/053981. Agonistas de RARs adicionales dispuestos para la presente invención incluyen aquellos descritos en Biochem. Biophys. Res. Commun. 179: 1554-1561 (1992), Biochem. Biophys. Res. Commun. 186: 977-984 (1992), Int. J. Cancer 71: 497 (1997), Skin Pharmacol. 8: 292-299 (1995), J. Med. Chem. 39: 2411-2421 (1996), Cancer Res. 55: 4446-4451 (1995), Cancer Letters 115: 1-7 (1997), J. Med. Chem. 32: 834-840 (1989).

Sales farmacéuticamente aceptables

Como se usa en esta memoria, el término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a las sales no tóxicas convencionales o sales de amonio cuaternario de los agonistas de RAR, por ejemplo de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Estas sales pueden ser preparadas *in situ* en el proceso de manufactura del vehículo de administración o la forma de dosificación, o por reacción separadamente de un agonista purificado de RAR en su forma de base o ácido libre, con un ácido o base orgánico o inorgánico adecuado, y aislamiento de la sal así formada, durante la purificación subsiguiente. Las sales convencionales no tóxicas incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos tales como sulfúrico, sulfámico, fosfórico y nítrico; y las sales preparadas de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, palmítico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etano disulfónico, oxálico e isotiónico. Véase, por ejemplo, Berge et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19 (1977).

Las sales representativas incluyen las sales de bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, succinato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, nafilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato, y laurilsulfonato.

Profármacos

A continuación se divulgan profármacos de los compuestos reivindicados. Sin embargo, tales profármacos, no forman parte de la presente invención.

Como se usa en esta memoria, un "profármaco" se refiere a compuestos que pueden ser convertidos, vía algún proceso químico o fisiológico (por ejemplo procesos enzimáticos e hidrólisis metabólica), en un agonista de RAR. Así, el término "profármaco" se refiere también a un precursor de un compuesto biológicamente activo que es

farmacéuticamente aceptable. Un profármaco puede estar inactivo cuando es administrado a un sujeto, es decir un éster, pero ser convertido *in vivo* en un compuesto activo, por ejemplo, mediante hidrólisis en el ácido carboxílico libre o hidroxilo libre. El compuesto de profármaco ofrece frecuentemente ventajas de solubilidad, compatibilidad con el tejido o retardo en la liberación en un organismo. También se entiende que el término "profármaco" incluye cualesquier vehículos enlazados de manera covalente, que liberan el compuesto activo *in vivo* cuando tal profármaco es administrado a un sujeto. Los profármacos de un compuesto activo pueden ser preparados modificando grupos funcionales presentes en el compuesto activo, de manera que las modificaciones son escindidas, sea en manipulación de rutina o *in vivo*, hasta el compuesto progenitor activo. Los profármacos incluyen compuestos en los que un grupo hidroxilo, amino o mercapto está enlazado a cualquier grupo que, cuando el profármaco del compuesto activo es administrado a un sujeto, se escinde para formar el grupo hidroxilo libre, amino libre o mercapto libre, respectivamente. Los ejemplos de profármacos incluyen, pero no están limitados a, derivados de acetato, formiato y benzoato de un grupo funcional alcohol o derivados de acetamida, formamida y benzamida de un grupo funcional amina en el compuesto activo y similares. Véase Harper, "Drug Latentiation" en Jucker, ed. *Progress in Drug Research* 4:221-294 (1962); Morozowich et al, "Application of Physical Organic Principles to Prodrug Design" en E. B. Roche ed. *Design of Biopharmaceutical Properties through Prodrugs and Analogs*, APHA Acad. Pharm. Sci. 40 (1977); Bioreversible Carriers in Drug Design, Theory and Application, E. B. Roche, ed., APHA Acad. Pharm. Sci. (1987); Design of prodrugs, H. Bundgaard, Elsevier (1985); Wang et al. "Prodrug approaches to the improved delivery of peptide drug" en *Curr. Pharm. Design.* 5(4):265-287 (1999); Pauletti et al. (1997) Improvement in peptide bioavailability: Peptidomimetics and Prodrug Strategies, *Adv. Drug. Delivery Rev.* 27:235-256; Mizen et al. (1998) "The Use of Esters as Prodrugs for Oral Delivery of (3-Lactam antibiotics," *Pharm. Biotech. II*,:345-365; Gagnault et al. (1996) "Designing Prodrugs and Bioprecursors I. Carrier Prodrugs," *Pract. Med. Chem.* 671-696; Asgharnejad, "Improving Oral Drug Transport", en *Transport Processes in Pharmaceutical Systems*, G. L. Amidon, P. I. Lee y E. M. Topp, Eds., Marcell Dekker, p. 185-218 (2000); Balant et al., "Prodrugs for the improvement of drug absorption via different routes of administration", *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 15(2): 143-53 (1990); Balimane y Sinko, "Involvement of multiple transporters in the oral absorption of nucleoside analogues", *Adv. Drug Delivery Rev.*, 39(1-3): 183-209 (1999); Browne, "Fosphenytoin (Cerebyx)", *Clin. Neuropharmacol.* 20(1): 1-12 (1997); Bundgaard, "Bioreversible derivatization of drugs-principle and applicability to improve the therapeutic effects of drugs", *Arch. Pharm. Chemi* 86(1): 1-39 (1979); Bundgaard H. "Improved drug delivery by the prodrug approach", *Controlled Drug Delivery* 17: 179-96 (1987); Bundgaard H. "Prodrugs as a means to improve the delivery of peptide drugs", *Arfv. Drug Delivery Rev.* 8(1): 1-38 (1992); Fleisher et al. "Improved oral drug delivery: solubility limitations overcome by the use of prodrugs", *Arfv. Drug Delivery Rev.* 19(2): 115-130 (1996); Fleisher et al. "Design of prodrugs for improved gastrointestinal absorption by intestinal enzyme targeting", *Methods Enzymol.* 112 (Drug Enzyme Targeting, Pt. A): 360-81, (1985); Farquhar D, et al., "Biologically Reversible Phosphate-Protective Groups", *Pharm. Sci.*, 72(3): 324-325 (1983); Freeman S, et al., "Bioreversible Protection for the Phospho Group: Chemical Stability and Bioactivation of Di(4-acetoxi-benzil) Metilfosfonate with Carboxiesterase," *Chem. Soc., Chem. Commun.*, 875-877 (1991); Friis y Bundgaard, "Prodrugs of phosphates and phosphonates: Novel lipophilic alphaaciloxialkyl ester derivatives of phosphate- or phosphonate containing drugs masking the negative charges of these groups", *Eur. J. Pharm. Sci.* 4: 49-59 (1996); Gangwar et al., "Pro-drug, molecular structure and percutaneous delivery", *Des. Biopharm. Prop. Profármacos Analogs*, [Symp.] Meeting Date 1976, 409-21. (1977); Nathwani y Wood, "Penicillins: a current review of their clinical pharmacology and therapeutic use", *Drugs* 45(6): 866-94 (1993); Sinhababu y Thakker, "Prodrugs of anticancer agents", *Adv. Drug Delivery Rev.* 19(2): 241-273 (1996); Stella et al., "Prodrugs. Do they have advantages in clinical practice?", *Drugs* 29(5): 455-73 (1985); Tan et al. "Development and optimization of anti-HIV nucleoside analogs and prodrugs: A review of their cellular pharmacology, structure-activity relationships and pharmacokinetics", *Adv. Drug Delivery Rev.* 39(1-3): 117-151 (1999); Taylor, "Improved passive oral drug delivery via prodrugs", *Adv. Drug Delivery Rev.*, 19(2): 131-148 (1996); Valentino y Borhardt, "Prodrug strategies to enhance the intestinal absorption of peptides", *Drug Discovery Today* 2(4): 148-155 (1997); Wiebe y Knaus, "Concepts for the design of anti-HIV nucleoside prodrugs for treating cephalic HIV infection", *Adv. Drug Delivery Rev.*: 39(1-3):63-80 (1999); Waller et al., "Prodrugs", *Br. J. Clin. Pharmac.* 28: 497-507 (1989).

Composiciones farmacéuticas

Para administración a un sujeto, los agonistas de RAR pueden ser suministrados en composiciones farmacéuticamente aceptables. Estas composiciones farmacéuticamente aceptables comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más de los agonistas de RAR, formulados conjuntamente con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables (aditivos) y/o diluyentes. Como se describe posteriormente, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser formulada especialmente para administración en forma sólida o líquida, incluyendo aquellas adaptadas para lo siguiente: (1) administración oral, por ejemplo, pociones (soluciones suspensiones acuosas como no acuosas), sondas, pastillas, grageas, cápsulas, píldoras, comprimidos (por ejemplo aquellos focalizados en la absorción bucal, sublingual y sistémica), bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación en la garganta; (2) administración parenteral, por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril, o formulación de liberación sostenida; (3) aplicación tópica, por ejemplo, como una crema, ungüento, o un parche de liberación controlada o atomizado aplicado a la piel; (4) intravaginalmente o intrarectalmente, por ejemplo, como un pesario, crema o espuma; (5) sublingualmente; (6) ocularmente; (7) transdérmicamente; (8) transmucosalmente; o (9) nasalmente. Adicionalmente, pueden implantarse compuestos dentro de un paciente, o inyectarse usando un sistema de entrega de fármaco. Véase, por ejemplo, Urquhart, et al., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24: 199-236 (1984); Lewis, ed. "Controlled Release of Pesticides and

Pharmaceuticals" (Plenum Press, Nueva York, 1981); U.S. Pat. No. 3,773,919; y U.S. Pat. No. 35 3,270,960.

Como se usa aquí, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que están dentro del alcance del juicio médico sensato, adecuados para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesivas toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.

Como se usa aquí, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" indica un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un líquido o relleno sólido, diluyente, excipiente, ayuda de manufactura (por ejemplo, lubricante, talco, estearato de magnesio, calcio o zinc o ácido esteárico), o material que encapsula solvente, involucrado en el porte o transporte del compuesto sujeto desde un órgano o porción del cuerpo hasta otro órgano o porción del cuerpo. Cada vehículo tiene que ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación, y no dañino para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetil celulosa de sodio, metilcelulosa, etil celulosa, celulosa microcristalina y acetato de celulosa; (4) goma tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, lauril sulfato de sodio y talco; (8) excipientes, tales como manteca de cocoa y ceras para supositorio; (9) aceites, tales como aceite de maní, aceite de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol (PEG); (12) ésteres, tales como etil oleato y etil laurato; (13) agar; (14) agentes de amortiguación, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) etil alcohol; (20) soluciones con pH amortiguado; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; (22) agentes de relleno, tales como polipéptidos y aminoácidos (23) componentes del suero, tales como albúmina de suero, HDL y LDL; (22) alcoholes C₂-C₁₂, tales como etanol; y (23) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas. En la formulación pueden estar presentes también agentes humectantes, colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes de perfume, conservadores y antioxidantes. Los términos tales como "excipiente", "vehículo", "vehículo farmacéuticamente aceptable" o similares, son usados de manera intercambiable en esta memoria.

Como se usa en esta memoria, la frase "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad de un agente activo (por ejemplo un agonista de RARy) suficiente para producir el cambio o efecto deseado (por ejemplo células de cebado de tallo mesenquimal respecto a la diferenciación miogénica en vitro).

Como se usa en esta memoria, la frase "cantidad terapéuticamente efectiva" indica la cantidad de un compuesto, material o composición que comprende un agonista de RAR, que es efectiva para producir algún efecto terapéutico deseado en por lo menos una subpoblación de células en un animal, con una relación beneficio/riesgo razonable, aplicable a cualquier tratamiento médico. Por ejemplo, una cantidad de un agonista de RARy administrada a un sujeto, que es suficiente para producir una reparación o regeneración del músculo medible, estadísticamente significativa.

Como se usa en esta memoria, el término "reparación" se refiere a un proceso en el cual los daños de un tejido muscular son aliviados o eliminados completamente. Por lo menos un síntoma de daño en el tejido muscular, puede ser aliviado en al menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, o por lo menos 50%. Por ejemplo, en "Skeletal Muscle Damage and Repair" Tiidus, P.M., ed., Human Kinetics (2008) se describen los síntomas del daño muscular.

La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está bien dentro de la capacidad de aquellos expertos en la técnica. Generalmente, una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar con la historia, edad, condición, sexo del sujeto, así como con la severidad y tipo de la condición médica en el sujeto, y administración de otros agentes farmacéuticamente activos.

Como se usa en esta memoria, el término "administra" se refiere a la colocación de una composición dentro de un sujeto, por un método o ruta que da como resultado la localización por lo menos parcial de la composición, en un sitio deseado, tal que se produce el efecto deseado. Las rutas adecuadas de administración para los métodos de la invención incluyen administración local y sistémica. Generalmente, la administración local da como resultado mayor entrega de agonista de RAR (o células tratadas con agonista de RAR) a una ubicación específica, comparada con la totalidad del cuerpo del sujeto, mientras la administración sistémica da como resultado una entrega de un agonista de RAR (o células tratadas con agonista de RAR) a esencialmente la totalidad del cuerpo del sujeto. Un método de administración local es la inyección intramuscular.

En el contexto de la administración de células tratadas con un agonista de RAR, el término "administración" incluye también el trasplante de tal célula dentro de un sujeto. Como se usa en esta memoria, el término "trasplante" se refiere al proceso de implantación o transferencia de por lo menos una célula dentro de un sujeto. El término "trasplante" incluye, por ejemplo autotrasplante (retiro y transferencia de célula(s) desde una ubicación en un paciente a la misma u otra ubicación en el mismo paciente), alotrasplante (trasplante entre miembros de la misma especie), y xenotrasplante (trasplantes entre miembros de diferentes especies). Las personas expertas son bien conscientes de los métodos para la implantación o trasplante de células de tallo mesenquimal para reparación y regeneración del

músculo, que están dispuestos para la presente invención. Véase por ejemplo, U.S. Pat. No. 7,592,174 y U.S. Pat. Pub. No. 2005/0249731.

5 Además, el agonista de RAR puede ser formulado en la forma de ungüentos, cremas, polvos u otras formulaciones adecuadas para formulaciones tópicas. Dado que el peso molecular de los agonistas de RAR es generalmente menor que 500 daltons, estas formulaciones pueden entregar el agonista desde la piel hasta el tejido muscular más profundo. De acuerdo con ello, tales formulaciones pueden comprender uno o más agentes que mejoran la penetración del ingrediente activo a través de la piel. Para aplicaciones tópicas, el agonista de RAR puede ser incluido en vendajes y/o composiciones para el recubrimiento de la piel.

10 Un compuesto o composición descritos en esta memoria pueden ser administrados por cualquier ruta apropiada conocida en la técnica, incluyendo rutas oral o parenteral, incluyendo administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, aérea (aerosol), pulmonar, nasal, rectal, y tópica (incluyendo bucal y sublingual).

15 Los modos ejemplares de administración incluyen inyección, infusión, instilación, inhalación o ingestión. "Inyección" incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, intracerebro espinal, y intraesternal. Preferiblemente, las composiciones son administradas mediante infusión o inyección intravenosa.

20 Como se usa en esta memoria, un "sujeto" indica un humano o animal. Usualmente el animal es un vertebrado tal como un primate, roedor, animal doméstico o animal de juego. Los primates incluyen chimpancés, monos cynomologos, monos araña y macacos, por ejemplo, Rhesus. Los roedores incluyen ratones, ratas, marmotas, hurones, conejos y hámsters. Los animales domésticos y de juego incluyen vacas, caballos, cerdos, ciervos, bisontes, búfalos, especies de felinos, por ejemplo gatos domésticos, especies caninas, por ejemplo perro, zorro, lobo, especies de aves, por ejemplo pollo, emú, avestruz y pescados, por ejemplo trucha, bagre y salmón. Paciente o sujeto incluye cualquier subconjunto de los anteriores, por ejemplo todos los anteriores, pero excluyendo uno o más grupos o especies tales como humanos, primates o roedores. El sujeto puede ser un mamífero, por ejemplo un primate, por ejemplo un humano. Los términos "paciente" y "sujeto" son usados de manera intercambiable en esta memoria. Los términos "paciente" y "sujeto" son usados de manera intercambiable en esta memoria. Un sujeto puede ser macho o hembra.

30 Preferiblemente, el sujeto es un mamífero. El mamífero puede ser un humano, primate no humano, ratón, rata, perro, gato, caballo o vaca. Los mamíferos diferentes a los humanos pueden ser usados de manera ventajosa, como sujetos que representan modelos animales de desórdenes asociados con enfermedades autoinmunes o inflamación. Adicionalmente, los métodos y composiciones descritos en esta memoria pueden ser usados para tratar animales domesticados y/o mascotas.

Un sujeto puede ser uno que ha sido diagnosticado previamente con o identificado como doliente de o que tiene un desorden, caracterizado por daño muscular o atrofia/desgaste muscular.

35 Un sujeto puede ser uno que no está siendo tratado actualmente con un agonista de RAR.

Un sujeto puede ser uno que ha sido diagnosticado previamente con una enfermedad que está siendo tratada con un régimen terapéutico que comprende un agonista de RAR, en el que la enfermedad no es una enfermedad caracterizada por daño muscular o atrofia/desgaste muscular.

40 De acuerdo con ello, el método de tratamiento puede comprender el ajuste del régimen terapéutico del sujeto, tal que se reduce por lo menos un síntoma del daño muscular. Sin limitación, un régimen terapéutico puede ser ajustado mediante la modulación de la frecuencia de administración del RAR y/o alterando el sitio o modo de administración.

El método puede comprender además el diagnóstico de un sujeto respecto al daño muscular o atrofia/desgaste del músculo, antes de tratar el sujeto para la reparación o regeneración del músculo.

45 El método puede comprender además la elección de un sujeto con daño muscular o atrofia/desgaste muscular, antes de tratar el sujeto para la reparación o regeneración del músculo.

Terapia de combinación

50 El agonista de RAR de la presente invención puede ser administrado al sujeto junto con una terapia seleccionada de entre masaje, ultrasonido, entrega hiperbárica de oxígeno. Adicionalmente y/o alternativamente, el agonista de RAR puede ser administrado a un sujeto en combinación con un agente farmacéuticamente activo. Los ejemplares de compuestos farmacéuticamente activos incluyen aquellos hallados en Harrison's Principles of Internal Medicine, 13^a edición, Eds. T.R. Harrison et al. McGraw-hill N.Y., NY; Physicians Desk Reference, 50a edición, 1997, Oradell Nueva Jersey, Medical Economics Co.; Pharmacological Basis of Therapeutics, 8a edición, Goodman y Gilman, 1990; United States Pharmacopeia, The National Formulary, USP XII NF XVII, 1990; edición actual de Goodman y Oilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics; y la actual edición de The Merck Index.

El agente farmacéuticamente activo puede incluir aquellos agentes conocidos en la técnica, para tratamiento de inflamación o de desórdenes asociados con inflamación, o infecciones. Los ejemplares de agentes antiinflamatorios incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroides (NSAIDs - tales como aspirina, ibuprofeno, o naproxeno, corticoesteroides (tales como prednisona), medicación contra la malaria (tal como hidrocloroquina), metotrexato, sulfasalazina, leflunomida, medicaciones contra TNF, ciclofosfamida y micofenolato.

El agente farmacéuticamente activo puede ser un factor de crecimiento. Los ejemplares de factores de crecimiento incluyen factores de crecimiento de fibroblasto (FGF), FGF-1, FGF-2, FGF-4, timosinas, factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de enlace de insulina (IGF), IGF-1, IGF-2, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de transformación (TGF), TGF- α , TGF- β , factores A y B que inducen el cartílago, factores de inducción de osteoide, osteogenina, proteínas morfogénicas del hueso, y otros factores de crecimiento del hueso, factores de crecimiento de colágeno, factores 1 o 2 de crecimiento de enlace de heparina, y sus derivados biológicamente activos.

El agente farmacéuticamente activo puede ser un agente antiinterferón. Sin limitación, los agentes antiinterferón incluyen anticuerpos antiinterferón o fragmentos de derivados de ellos. Los ejemplares de anticuerpos de antiinterferón incluyen aquellos descritos en Ronnblom, L. & Elkon, K.B. Cytokines as therapeutic targets in SLE. *Nat Rev Rheumatol* 6, 339-647; Yao, Y. et al. Neutralization of interferon-alpha/beta-inducible genes and downstream effect in a phase I trial of an anti-interferon-alpha monoclonal antibody in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 60, 1785-96 (2009); y Zagury, D. et al. IFNalpha kinoid vaccine-induced neutralizing antibodies prevent clinical manifestations in a lupus flare murine model. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 5294-9 (2009), aquellos descritos en los documentos U.S. Pat No. 4,902,618; No. 5,055,289; No. 7,087,726; y No. 7, 741,449, y aquellos descritos en los documentos U.S. Pat. App. Pub. No. 10/440,202; No. 11/342/020; y No. 12/517,334.

El agente farmacéuticamente activo puede ser fenoterol o factor 1 de crecimiento similar a insulina.

El agonista de RAR y el agente farmacéuticamente activo pueden ser administrados al sujeto en la misma composición farmacéutica o en diferentes composiciones farmacéuticas (al mismo tiempo o en diferentes tiempos). Cuando es administrado en diferentes tiempos, el agonista de RAR y el agente farmacéuticamente activo pueden ser administrados dentro de 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 60 minutos, 2 horas, 3 horas, 4, horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas de la administración del otro. Cuando el agonista de RAR y el agente farmacéuticamente activo son administrados en diferentes composiciones farmacéuticas, las rutas de administración pueden ser diferentes.

Dosificación

La cantidad de agonista de RAR que puede ser combinada con un material vehículo para producir una forma de dosificación individual será generalmente aquella cantidad del agonista de RAR que produce un efecto terapéutico. Generalmente fuera de uno por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente 0.01% a 99% de agonista de RAR, preferiblemente de aproximadamente 5% a aproximadamente 70%, con máxima preferencia de 10% a aproximadamente 30%.

La toxicidad y eficacia terapéutica pueden ser determinadas mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo para la determinación del LD50 (la dosificación letal para 50% de la población) y el ED50 (la dosificación terapéuticamente efectiva en 50% de la población). La relación de dosificación entre los efectos tóxico y terapéutico es el índice terapéutico, y puede ser expresada como la relación LD50/ED50. Se prefieren las composiciones que exhiben índices terapéuticos grandes.

Como se usa en esta memoria, el término ED denota dosificación efectiva y es usado en conexión con modelos animales. El término EC denota concentración efectiva y es usado en conexión con modelos *in vitro*.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios animales, pueden ser usados en la formulación de un intervalo de dosificación para uso en humanos. La dosificación de tales compuestos está preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes, que incluye la ED50 con baja o sin toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo, dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada.

La dosificación terapéuticamente efectiva puede ser estimada inicialmente a partir de los ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosificación en modelos animales, para alcanzar un intervalo de concentración circulante en plasma que incluye la IC50 (es decir la concentración del terapéutico que logra la mitad de la inhibición máxima de los síntomas), según se determina en el cultivo. Los niveles en plasma pueden ser medidos, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto desempeño. Los efectos de cualquier dosificación particular pueden ser vigilados mediante un bioensayo adecuado.

La dosificación puede ser determinada por un médico y ajustada, según sea necesario, para adaptar los efectos observados del tratamiento. Generalmente, las composiciones son administradas, de modo que el agonista de RAR es dado a una dosificación de 1 μ g/kg a 150 mg/kg, 1 μ g/kg a 100 mg/kg, 1 μ g/kg a 50 mg/kg, 1 μ g/kg a 20 mg/kg, 1 μ g/kg a 10 mg/kg, 1 μ g/kg a 1 mg/kg, 100 μ g/kg a 100 mg/kg, 100 μ g/kg a 50 mg/kg, 100 μ g/kg a 20 mg/kg, 100 μ g/kg a 10 mg/kg, 100 μ g/kg a 1 mg/kg, 1 mg/kg a 100 mg/kg, 1 mg/kg a 50 mg/kg, 1 mg/kg a 20 mg/kg, 1 mg/kg a 10 mg/kg, 10 mg/kg a 100 mg/kg, 10 mg/kg a 50 mg/kg, o 10 mg/kg a 20 mg/kg. Debe entenderse que los intervalos dados aquí

5 incluyen todos los intervalos intermedios, por ejemplo, el intervalo 1 mg/kg a 10 mg/kg incluye 1mg/kg a 2 mg/kg, 1mg/kg a 3 mg/kg, 1mg/kg a 4 mg/kg, 1 mg/kg a 5 mg/kg, 1mg/kg a 6 mg/kg, 1mg/kg a 7 mg/kg, 1mg/kg a 8 mg/kg, 1mg/kg a 9 mg/kg, 2mg/kg a 10mg/kg, 3mg/kg a 10mg/kg, 4mg/kg a 10mg/kg, 5mg/kg a 10mg/kg, 6mg/kg a 10mg/kg, 7mg/kg a 10mg/kg, 8mg/kg a 10mg/kg, 9mg/kg a 10mg/kg. Debe entenderse además que los intervalos intermedios a los dados anteriormente están también dentro del alcance de esta invención, por ejemplo, en el intervalo 1mg/kg a 10 mg/kg, intervalos de dosificación tales como 2mg/kg a 8 mg/kg, 3mg/kg a 7 mg/kg, 4mg/kg a 6mg/kg.

10 Las composiciones pueden ser administradas a una dosificación de modo que el agonista de RAR o un metabolito del mismo tenga una concentración *in vivo* menor que 500nM, menor que 400nM, menor que 300 nM, menor que 250 nM, menor que 200 nM, menor que 150 nM, menor que 100 nM, menor que 50 nM, menor que 25 nM, menor que 20, nM, menor que 10 nM, menor que 5nM, menor que 1 nM, menor que 0.5 nM, menor que 0.1nM, menor que 0.05, menor que 0.01, nM, menor que 0.005 nM, menor que 0.001 nM después de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 1.5 horas, 2 horas, 2.5 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas o más de tiempo de administración.

15 Respecto a la duración y frecuencia del tratamiento, para los médicos clínicos expertos es típico vigilar los sujetos con objeto de determinar cuando el tratamiento está suministrando beneficio terapéutico, y determinar si aumentar o disminuir la dosificación, aumentar o disminuir la frecuencia de administración, suspender el tratamiento, reanudar el tratamiento o hacer otros cambios al régimen de tratamiento. El programa de dosificación puede variar desde una vez por semana hasta diariamente, dependiendo de varios factores clínicos, tales como la sensibilidad del sujeto al agonista de RAR. La dosificación deseada puede ser administrada todos los días o cada tercero, cuarto, quinto o sexto día. La dosificación deseada puede ser administrada en una vez o dividida en subdosificaciones, por ejemplo, 2-4 subdosificaciones y administrada a lo largo de un período de tiempo, por ejemplo a intervalos apropiados a lo largo del día u otro programa apropiado. Tales subdosificaciones pueden ser administradas como formas unitarias de dosificación. La administración puede ser crónica, por ejemplo una o más dosificaciones diariamente durante un período de semanas o meses. Son ejemplos de programa de dosificación, la administración diaria, dos veces por día, tres veces por día o cuatro o más veces por día, sobre un período de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 25 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, o 6 meses o más.

La administración del agonista de RAR al sujeto puede ser hecha en una o varias veces. En una realización, una vez de administración, o una pluralidad de veces de la administración, están dentro de un periodo de tiempo de señalización detectable de retinoide endógeno incrementado, que ocurre de modo natural *in vivo* en respuesta al daño (por ejemplo un trauma o cambio fisiológico ocurrido que conduce al daño muscular) al tejido muscular (por ejemplo por el día 4 o día 5 después de la ocurrencia del daño). En una realización, la administración incluye una vez que está al comienzo del período de tiempo. En una realización, la administración incluye varias veces que están dentro del período de tiempo. En una realización, la administración está en o incluye un tiempo que es posterior a un periodo de tiempo que es mayor que 3 días después de la ocurrencia del daño. En una realización, la administración está en o incluye un tiempo que es aproximadamente 4 días después de la ocurrencia del daño. En una realización, la administración está en o incluye un tiempo que es aproximadamente 5 días después de la ocurrencia del daño. En una realización, la administración está en o incluye un tiempo que es aproximadamente 6 días después de la ocurrencia del daño. En una realización, la administración está en o incluye un tiempo que es aproximadamente 7, o aproximadamente 8 días después de la ocurrencia del daño. También se visualizan combinaciones de estos tiempos de administración. Por ejemplo, administración aproximadamente el día 4, y luego uno o más de los días 5, 6, 7, y 8. En una realización, la administración es aproximadamente el día 5 y el día 7. Puede ejecutarse también administración continuada sobre un período extendido de tiempo (por ejemplo hasta que se obtiene recuperación satisfactoria).

45 La administración puede superponerse con o abarcar el periodo de tiempo de señalización incrementada de retinoide endógeno (por ejemplo, la administración comienza antes de la señalización incrementada de retinoide endógeno, y se extiende dentro de y/o a través de este periodo). En una realización, la administración es detenida hasta la señalización aumentada de retinoide endógeno, en respuesta al daño del tejido muscular (por ejemplo, la administración comienza luego del día 3, o el día 4, 5, 6, 7, 8, o 9 o después). En una realización, la administración comienza después del día 3 (por ejemplo día 4 o 5), y continúa hasta por lo menos el día 9 (por ejemplo hasta el día 11). En una realización, la administración es cada día o cada dos días durante los periodos de tiempo de administración citados. En una realización, la administración es por lo menos los días 5, 7, y 9.

Células pretratadas de tallo

55 En esta memoria se describe una población de células de tallo, en la que la población es producida por contacto de por lo menos una célula de tallo con una cantidad efectiva de un agonista de RAR. Como se usa en esta memoria, el término "población de células de tallo" indica una o más células de tallo. Tales células de tallo pueden ser aisladas (por ejemplo por contacto *in vitro*, o *ex vivo*). Tal contacto habilita las células para regenerar tejido muscular y también para dar soporte a diferenciación miogénica de otras células (por ejemplo células en un anfitrión dentro del cual se administran las células pretratadas). El contacto puede ser con agonista de RARy, a células aisladas de tallo mesenquimal, para activar esta habilidad. El pretratamiento puede ser *in vitro* y puede ser por menos aproximadamente 3 días. Aunque periodos más cortos de pretratamiento (por ejemplo 2.5 días, 2 días, 1.5 días, 1 día, 60 12 horas) pueden producir también resultados similares. Tales células pretratadas que son así inducidas, son denominadas como "pretratadas". Todas las células pretratadas descritas en esta memoria son abarcadas por la

presente invención.

El término "hacer contacto" o "contacto", como se usa en esta memoria, en conexión con el contacto de una célula de tallo, incluye el sometimiento de la célula de tallo a un medio de cultivo apropiado que comprende un agonista de RAR. La célula de tallo puede hacer contacto con un agonista de RAR en un cultivo celular, por ejemplo *in vitro* o *ex vivo*.

5 Como se usa en esta memoria, el término "ex vivo" se refiere a células que son retiradas de un organismo vivo y son cultivadas fuera del organismo (por ejemplo en un tubo de ensayo). Las células *ex vivo* pueden ser entonces administradas con modificación al donador.

10 La célula de tallo puede ser una célula humana de tallo. La célula de tallo puede ser una célula pluripotente o multipotente de tallo. La célula de tallo puede ser una célula pluripotente inducida de tallo (iPS), o una célula reprogramada de manera estable, que es una célula intermedia pluripotente de tallo y puede ser reprogramada adicionalmente hasta una célula iPS, por ejemplo, célula pluripotente de tallo con inducción parcial (también denominadas como "células piPS"). La célula pluripotente de tallo, iPSC o piPSC puede ser una célula pluripotente modificada genéticamente de tallo. La célula de tallo puede ser una célula de tallo mesenquimal.

15 En general, para uso de los métodos, ensayos, sistemas, kits y para generar tarjetas de resultados, una célula de tallo puede ser obtenida o ser derivada de cualquier fuente disponible. De acuerdo con ello, una célula de tallo puede ser obtenida o derivada de un vertebrado o invertebrado. La célula de tallo puede ser una célula de tallo de mamífero.

La célula de tallo puede ser una célula de tallo de un primate o de un roedor.

20 La célula de tallo puede ser seleccionada de entre el grupo consistente en células de tallo de chimpancé, monos cynomologos, monos araña y macacos (por ejemplo mono Rhesus), ratón, rata, marmota, hurón, conejo, hámster, vaca, caballo, cerdo, ciervo, bisonte, búfalo, felinos (por ejemplo gato doméstico), caninos (por ejemplo perro, zorro y lobo), aves (por ejemplo pollo, emú y avestruz) y pescados (por ejemplo trucha, bagre y salmón).

Como se usa en esta memoria, el término "diferenciación" como se usa en esta memoria, se refiere al desarrollo celular de una célula desde una etapa primitiva hasta una célula más madura (es decir menos primitiva).

25 Como se usa en esta memoria, el término "célula inducida pluripotente de tallo" o "iPSC" o "célula iPS" se refiere a una célula derivada de una reversión o reprogramación *completa* del estado de diferenciación de una célula diferenciada (por ejemplo una célula somática). como se usa en esta memoria, una iPSC es completamente reprogramada y es una célula que ha soportado reprogramación epigenética completa.

30 El término "reprogramación", como se usa en esta memoria, se refiere al proceso que altera o devuelve el estado de diferenciación de una célula diferenciada (por ejemplo una célula somática). Dicho de otra forma, la reprogramación se refiere a un proceso de conducción de la diferenciación de una célula, hacia atrás hasta un tipo de célula menos diferenciada o más primitiva. La reprogramación completa involucra la reversión completa de por lo menos algunos de los patrones heredables de modificación de ácido nucleico (por ejemplo, metilación), condensación de cromatina, cambios epigenéticos, impresión genómica, etc., que ocurren durante la diferenciación celular a medida que el cigoto se desarrolla hasta un adulto. La reprogramación es distinta del simple mantenimiento del estado no diferenciado existente de una célula que ya es pluripotente, o el mantenimiento del estado existente menos que completamente diferenciado de una célula que ya es una célula multipotente (por ejemplo, una célula hematopoyética de tallo). La reprogramación es también distinta de la promoción de la autorrenovación o proliferación de células que ya son pluripotentes o multipotentes, aunque las composiciones y métodos de la invención pueden ser también de uso para tales propósitos.

40 El término "célula reprogramada estable", como se usa en esta memoria, se refiere a una célula que es producida a partir de la reprogramación parcial o incompleta de una célula diferenciada (por ejemplo una célula somática). En esta memoria se usa de manera intercambiable una célula reprogramada estable, con "piPSC". Una célula reprogramada estable no ha soportado reprogramación completa y así no ha tenido remodelación global del epigenoma de la célula. Una célula reprogramada estable es una célula pluripotente de tallo y puede ser reprogramada de modo adicional hasta una iPSC, como se define el término en esta memoria o, de manera alternativa, puede ser diferenciada a lo largo de diferentes linajes. Una célula parcialmente reprogramada puede expresar marcadores de todas las tres capas de germen embrionario (es decir todas las tres capas de endodermo, mesodermo o ectodermo). Los marcadores de las células de endodermo incluyen Gata4, FoxA2, PDX1, Nodal, Sox7 y Sox17. Los marcadores de célula de mesodermo incluyen Brachyury, GSC, LEF1, Mox1 y Tie1. Los marcadores de las células de ectodermo incluyen cripto1, EN1, GFAP, Islet 1, LIM1 y Nestin. Una célula parcialmente reprogramada puede ser cualquier célula no diferenciada.

El término "remodelación del epigenoma" se refiere a modificaciones químicas del genoma, que no cambian la secuencia genómica o una secuencia de gen de pares de base en la célula, pero alteran la expresión.

55 El término "remodelación global del epigenoma" se refiere a donde han ocurrido modificaciones químicas del genoma, donde no hay memoria de expresión previa del gen de la célula diferenciada de la cual se derivó la célula reprogramada o iPSC.

El término "remodelación incompleta del epigenoma" se refiere a donde han ocurrido modificaciones químicas del genoma, donde hay memoria de expresión previa del gen de la célula diferenciada de la cual se derivó la célula reprogramada estable o piPSC.

5 El término "reprogramación epigenética", como se usa en esta memoria, se refiere a la alteración del patrón de expresión de gen en una célula, vía modificaciones químicas que no cambian la secuencia genómica o una secuencia de gen de pares de base en la célula.

10 El término "epigenético", como se usa en esta memoria, se refiere a modificaciones químicas de ADN "sobre el genoma", que no alteran la secuencia del gen, pero impactan la expresión del gen y pueden ser heredadas también. Las modificaciones epigenéticas, también denominadas postranscripcionales o "PTM", al ADN son importantes, por ejemplo, en impresión y reprogramación celular. Estas modificaciones incluyen, por ejemplo, metilación, ubiquitinación, fosforilación, glicosilación, sumoilación, acetilación, S-nitrosilación o nitrosilación, citrulinación o desiminación, neddilación, OClcNAc, ribosilación de ADP, hidroxilación, lipidización, ufrmilación, prenilación, miristoilación, S-palmitoilación, sulfatación de tirosina, formilación, y carboxilación de ADN .

15 El término "pluripotente", como se usa en esta memoria, se refiere a una célula con la capacidad, bajo diferentes condiciones, para diferenciar las características de tipos de células de todos los tres orígenes de capas de célula (endodermo, mesodermo y ectodermo). Las células pluripotentes se caracterizan primariamente por su habilidad para diferenciar todas las tres capas de germen usando, por ejemplo, un ensayo de formación de teratoma de ratón desnudo. La pluripotencia es evidenciada también por la expresión de marcadores de célula de tallo embrionario (ES), aunque la prueba preferida para la pluripotencia es la demostración de la capacidad de diferenciar células de cada una de las tres capas de germen . Una célula pluripotente puede ser una célula no diferenciada.

20 El término "pluripotencia" o un "estado pluripotente", como se usa en esta memoria, se refiere a una célula con la habilidad para diferenciar todas las tres capas de germen embrionario: endodermo (tejido del intestino), mesodermo (incluyendo sangre, músculo y vasos), y ectodermo (tal como piel y nervios), y tiene típicamente el potencial de dividirse *in vitro* por un largo periodo de tiempo, por ejemplo, mayor a un año o más de 30 pasos.

25 El término "multipotente", como es usado en referencia a una "célula multipotente", se refiere a una célula que es capaz de diferenciar algunas pero no todas las células derivadas de todas las tres capas de germen . Así, una célula multipotente es una célula parcialmente diferenciada. Las células multipotentes son bien conocidas en la técnica, y los ejemplos de células multipotentes incluyen células adultas de tallo, tales como por ejemplo, células hematopoyéticas de tallo y células de tallo neural. Multipotente indica una célula de tallo que puede formar muchos tipos de células en un linaje dado, pero no células de otros linajes. Por ejemplo, una célula multipotente de sangre de tallo puede formar los muchos diferentes tipos de células sanguíneas (rojas, blancas, plaquetas, etc.), pero no puede formar neuronas.

30 El término "multipotencia" se refiere a una célula con el grado de versatilidad de desarrollo que es menor que totipotente y pluripotente.

35 El término "totipotencia" se refiere a una célula con el grado de diferenciación que describe una capacidad para hacer todas las células en el cuerpo adulto, así como los tejidos extraembrionarios, incluyendo la placenta. El huevo fertilizado (cigoto) es totipotente, como son las células escindidas de manera temprana (blastómeros).

40 El término "célula diferenciada" indica cualquier célula primaria que no es, en su forma nativa, pluripotente como es definido el término en esta memoria. El término una "célula diferenciada" abarca también células que son parcialmente diferenciadas, tales como células multipotentes, o células que son células parcialmente reprogramadas estables no pluripotentes. Debería notarse que la colocación de muchas células primarias en cultivo puede conducir a alguna pérdida de las características totalmente diferenciadas. Así, el simple cultivo de tales células está incluido en el término de células diferenciadas y no da como resultado estas células no diferenciadas (por ejemplo células no diferenciadas) o células pluripotentes. La transición de una célula diferenciada a la pluripotencia requiere un estímulo de reprogramación, más allá de los estímulos que conducen a la pérdida parcial del carácter diferenciado en cultivo. Las células reprogramadas tienen también la característica de la capacidad de paso extendido sin pérdida del potencial de crecimiento, respecto a los progenitores celulares primarios, que generalmente tienen capacidad por solamente un número limitado de divisiones en cultivo. El término "célula diferenciada" puede referirse también a una célula de un tipo de célula más especializada, derivada de una célula de un tipo menos especializado de célula (por ejemplo, de una célula no diferenciada o una célula reprogramada) donde la célula ha soportado un proceso de diferenciación celular.

50 Como se usa en esta memoria, el término "célula somática" se refiere a cualquier célula diferente a una célula de germen, una célula obtenida desde un embrión antes de la implantación, o una célula que resulta de la proliferación de tal célula *in vitro*. Dicho de otra forma, una célula somática se refiere a cualquier célula que forma el cuerpo de un organismo, contrario a células de línea de germen. En mamíferos, las células de línea de germen (también conocidos como "gametos") son los espermatozoides y óvulos que se funden durante la fertilización para producir una célula llamada cigoto, del cual se desarrolla la totalidad del embrión mamífero. Cualquier otro tipo de célula en el cuerpo de los mamíferos - aparte del espermatozoide y óvulo, las células de los cuales están hechos ellos (gametocitos) y las células no diferenciadas de tallo - es una célula somática: los órganos internos, piel, huesos, sangre y tejido conectivo

están todos hechos de células somáticas. La célula somática puede ser una "célula somática no embrionaria", por la cual se entiende una célula somática que no está presente en o es obtenida de un embrión y no es el resultado de la proliferación de tal célula *in vitro*. La célula somática puede ser una "célula somática adulta", por la cual se entiende una célula que esté presente en o es obtenida de un organismo diferente a un embrión o un feto o es el resultado de la proliferación de tal célula *in vitro*. A menos que se indique de otro modo, los métodos para reprogramación de una célula diferenciada pueden ser ejecutados *in vivo* e *in vitro* (donde *in vivo* es practicado cuando una célula diferenciada está presente dentro de un sujeto, y donde *in vitro* es practicado usando células diferenciadas aisladas mantenidas en cultivo). Donde se cultivan *in vitro* una célula diferenciada o población de células diferenciadas, la célula diferenciada puede ser cultivada en un cultivo de tajadas organotópicas, tales como se describen en, por ejemplo, Meneghel-Rozzo et al., (2004), Cell Tissue Res, 316(3);295-303.

Como se usa en esta memoria, el término "célula adulta" se refiere a una célula hallada en todo el cuerpo, después del desarrollo embrionario.

En el contexto de la ontogenia celular, el término "diferenciar", o "diferenciación" es un término relativo que indica una "célula diferenciada", es una célula que ha progresado adicionalmente de modo más profundo en la ruta de desarrollo, que su célula precursora. así, una célula reprogramada, como se define este término en esta memoria, puede diferenciarse de células precursoras con restricción de linaje (tales como una célula mesodérmica de tallo), que a su vez pueden diferenciarse más de otros tipos de células precursoras en la ruta (tal como un precursor específico de tejido, por ejemplo, un precursor de cardiomiocito), y entonces hasta una célula diferenciada de estado final, que juega un papel característico en cierto tipo de tejidos, y puede o puede no retener la capacidad de proliferar adicionalmente.

El término "célula embrionaria de tallo" es usado para referirse a las células pluripotentes de tallo de la masa celular interior del blastocisto embrionario (véanse los documentos de EEUU Nos. 5,843,780, 6,200,806). Tales células pueden ser obtenidas de manera similar de la masa celular interior de blastocistos derivados de transferencia nuclear de célula somática (véase por ejemplo, documentos de EEUU Nos. 5,945,577, 5,994,619, 6,235,970). Las características distintivas de una célula embrionaria de tallo definen un fenotipo de célula embrión de tallo. De acuerdo con ello, una célula tiene el fenotipo de una célula embrionaria de tallo, si posee una o más de las características únicas de una célula embrionaria de tallo, tal que la célula puede distinguirse de otras células. Los ejemplos de características distintivas de célula embrionaria de tallo incluyen, sin limitación, perfil de expresión de gen, capacidad de proliferación, capacidad de diferenciación, cariotipo, y capacidad de respuesta a condiciones particulares del cultivo.

El término "fenotipo" se refiere a una o a varias de un total de características biológicas que definen la célula u organismo, bajo un conjunto particular de condiciones y factores ambientales, independientemente del genotipo real.

El término "célula aislada", como se usa en esta memoria, se refiere a una célula que ha sido retirada de un organismo en el cual se hallaba originalmente, o un descendiente de tal célula. Opcionalmente la célula ha sido cultivada *in vitro*, por ejemplo, en presencia de otras células. Opcionalmente, la célula es introducida posteriormente en un segundo organismo o reintroducida en el organismo del cual fue aislada (o la célula de la cual desciende).

El término "población aislada", respecto a una población aislada de células, como se usa en esta memoria, se refiere a una población de células que ha sido retirada y separada de una población mixta o heterogénea de células. Una población aislada puede ser una población sustancialmente pura de células, comparada con la población heterogénea de la cual las células fueron aisladas o enriquecidas.

El término "sustancialmente pura", respecto a una población celular particular, se refiere a una población de células que es pura en por lo menos aproximadamente 75%, preferiblemente por lo menos aproximadamente 85%, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 90%, y con máxima preferencia por lo menos aproximadamente 95%, respecto a las células que conforman el total de la población de células. Estructurado de nuevo, los términos "sustancialmente pura" o "esencialmente purificada", respecto a una población de células, se refiere a una población de células que contiene menos de aproximadamente 20%, más preferiblemente menos de aproximadamente 15%, 10%, 8%, 7%, con máxima preferencia menos de aproximadamente 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, o menos de 1%, de células que no son las células indicadas o su progenie como se define por los términos en esta memoria.

Los términos "enriqueciendo" o "enriquecido" son usados de manera intercambiable en esta memoria e indican que el rendimiento (fracción) de células de un tipo aumenta en por lo menos 10% sobre la fracción de células de aquel tipo en el cultivo o preparación de partida.

Los términos "renovación" o "autorrenovación" o "proliferación" son usados de manera intercambiable en esta memoria, y se refieren a un proceso de hechura de más copias de una célula de sí misma (por ejemplo duplicación) de la célula. Las células reprogramadas pueden ser capaces de renovarse a sí mismas por división hasta dar las mismas células no diferenciadas (por ejemplo tipos de célula pluripotente o no especializada) sobre largos periodos, y/o muchos meses a años. en algunos casos, la proliferación se refiere a la expansión de células reprogramadas, mediante la división repetida de células individuales en dos células hijas idénticas.

El término "medio de cultivo celular" (también denominado en esta memoria como un "medio de cultivo" o "medio") como es denominado en esta memoria, es un medio para el cultivo de células que contiene nutrientes que mantienen

- la viabilidad celular y soporta la proliferación. El medio de cultivo celular puede contener cualquiera de los siguientes, en una combinación apropiada: sal(es), amortiguador(es), aminoácidos, glucosa u otro(s) azúcar(es), antibióticos, suero o reemplazo de suero, y otros componentes tales como factores de crecimiento de péptido, etc. Los medios medio de cultivo celular usados ordinariamente para tipos particulares de células son conocidos por aquellos expertos en la técnica.
- El término "linajes", como se usa en esta memoria, describe una célula con un ancestro común o células con un destino común de desarrollo. Solamente a modo de ejemplo, una célula que es de origen endodérmico o es "linaje endodérmico" indica que la célula se derivó de una célula endodérmica y puede diferenciar rutas restringidas a lo largo del linaje endodérmico, tales como una o más rutas de desarrollo del linaje, lo cual da lugar a células definitivas de endodermo, que a su vez pueden diferenciarse en células del hígado, timo, páncreas, pulmón e intestino.
- Una célula de tallo (por ejemplo, una célula aislada de tallo tal como una célula embrionaria de tallo aislada de un sujeto) puede entrar en contacto con un agonista de RAR por cualquier cantidad de tiempo. Por ejemplo, una célula de tallo puede entrar en contacto con un agonista de RAR por 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana o más. En un ejemplo no limitante, se añade agonista de RARs (disuelto en etanol o DMSO) a cultivos MSC a la concentración final entre 10 nM y 3 µM, y el volumen de solución de agonista de RAR añadido al cultivo es 0.1%.
- Sin desear estar atados por una teoría, el contacto de una célula de tallo con un agonista de RAR induce o estimula diferenciación dirigida por el linaje, de la célula de tallo hasta linaje particular. Por ejemplo, el contacto de una célula de tallo con un agonista de RAR puede inducir o estimular la diferenciación hasta un linaje seleccionado de entre el grupo que consiste en linaje de mesodermo, endodermo, ectodermo, neuronal, mesenquimal, y hematopoyético.
- El linaje inducido/estimulado puede ser un linaje mesenquimal.
- El linaje mesenquimal inducido puede ser seleccionado de entre el grupo que consiste en miogénico, osteogénico, codrogénico, tendogénico, ligamentogénico, estromagénico de médula, adipogénico, y dermogénico.
- Como se usa en esta memoria, una "célula de tallo mesenquimal" es una célula mesenquimal que tiene la habilidad de reproducirse a sí misma y diferenciarse en una o más células mesenquimales. Como una célula mesodérmica, una célula de tallo mesenquimal es pluripotente, capaz de diferenciarse en osteoblastos, células de cartílago, mioblastos, células grasas, células de estroma y células de tendón. Mientras las células mesodérmicas que se reproducen a sí mismas y son pluripotentes pierden estas habilidades en el proceso de desarrollo, las células de tallo mesenquimal son conocidas por persistir por un largo tiempo en el cuerpo adulto después de que han pasado a través del desarrollo.
- Como se usa en esta memoria, son "células mesenquimales" osteoblastos, células de cartílago, mioblastos, células grasas, células de estroma, células de tendón y otras células que forman tejido mesenquimal, y células de tallo mesenquimal que pueden diferenciarse hasta estas. Las células mesenquimales que ocurren durante la embriogénesis, células mesenquimales en animales individuales, y células mesenquimales generadas por diferenciación de células pluripotentes de tallo *in vitro* o *in vivo*, están todas incluidas en el término "células mesenquimales."
- Las células de tallo pueden provenir o ser obtenidas por el profesional, de cualquier fuente disponible.
- Las células de tallo mesenquimal pueden ser obtenidas por diferentes métodos bien conocidos en la técnica. Véanse por ejemplo, los documentos de EEUU no. 5,486,358; No. 6,387,367; y No. 7,592,174, y U.S. Pat App. Pub. No. 2003/0211602. Las células mesenquimales pueden incluir células autólogas de tallo mesenquimal, es decir una célula o células tomadas de un sujeto que requiere tratamiento (es decir el donador y el receptor son el mismo individuo).
- Las células autólogas de tallo mesenquimal tienen la ventaja de evitar cualquier rechazo de las células por causa inmunológica. De modo alternativo, las células pueden ser heterólogas, por ejemplo, tomadas de un donador. El segundo sujeto puede ser de la misma o de diferente especie. Típicamente, cuando las células provienen de un donador, ellas serán de un donador que es de modo suficiente inmunológicamente compatible con el receptor, es decir, no estará sujeto a rechazo de trasplante, para disminuir o eliminar la necesidad de inmunosupresión. Las células pueden ser tomadas de una fuente xenogénea, es decir un mamífero no humano que ha sido manipulado genéticamente para que tenga suficiente compatibilidad inmunológica con el recipiente, o la especie del recipiente. Los métodos para la determinación de compatibilidad inmunológica son conocidos en la técnica, e incluyen clasificación del tejido para evaluar la compatibilidad donador-recipiente respecto a determinantes HLA y ABO. Véase, por ejemplo, Transplantation Immunology, Bach y Auchincloss, Eds. (Wiley, John & Sons, Incorporated 1994).
- La célula de tallo mesenquimal puede ser derivada de una célula somática desdiferenciada (una célula reprogramada). Por ejemplo, una célula somática desdiferenciada hasta una célula pluripotente de tallo, por ejemplo mediante reprogramación directa de una célula de origen endodérmico. Sin desear estar atados por la teoría, una célula desdiferenciada tiene una morfología que recuerda un tipo de célula más primitiva de la cual se derivó, por ejemplo, morfología mesenquimal.
- La célula de tallo mesenquimal puede ser una célula rediferenciada de tallo mesenquimal. Como se usa en esta memoria, el término "célula rediferenciada de tallo mesenquimal" se refiere a una célula de tallo mesenquimal que está diferenciada desde una célula desdiferenciada de tallo mesenquimal.

5 Las células de tallo mesenquimal pueden estar en un estado estabilizado, por ejemplo, las células fueron tomadas de un sujeto y tratadas de manera que se les permite ser almacenadas por algún periodo de tiempo. Por ejemplo, las células pueden ser congeladas, por ejemplo, usando métodos conocidos en la técnica para la congelación de células primarias, tal que las células son viables cuando se descongelan. Por ejemplo, para uso en los presentes métodos pueden adaptarse métodos conocidos en la técnica para congelar y descongelar embriones, para generar mamíferos vivos. Tales métodos pueden incluir el uso de nitrógeno líquido, por ejemplo, con uno o más crioprotectores, por ejemplo, agentes que previenen el daño celular por congelación-descongelación.

10 La población de células de tallo mesenquimal obtenidas de un sujeto o donador, puede ser sustancialmente pura. La pureza de la población puede ser determinada, y manipulada, usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse métodos que usan clasificación de células activada por fluorescencia.

Sin desear estar atado a una teoría, para métodos *in vitro* o *ex vivo* de la invención puede usarse cualquier medio de cultivo celular adecuado. Por ejemplo, pueden mantenerse MSCs en medio α -MEM que contiene 10% de suero fetal bovino.

Una célula de tallo mesenquimal puede ser una célula de tallo mesenquimal derivada de médula de hueso (BMSC).

15 Una célula de tallo mesenquimal puede ser célula de tallo mesenquimal derivada de médula de murina.

Una célula de tallo mesenquimal puede ser una célula humana de tallo mesenquimal (hMSC).

20 Se ha descubierto también que las células de tallo tratadas con agonista de RAR pueden ser usadas para la preparación o regeneración del músculo. De acuerdo con ello, en esta memoria se describe un método para la reparación o regeneración del músculo en un sujeto, en el que el método comprende la administración de una población de células de tallo a un sujeto, en la que por lo menos una célula en la población ha estado en contacto con un agonista de RAR.

El método comprende los pasos de: (i) contacto de por lo menos una célula de tallo con un agonista de RAR; y (ii) administración de dichas células de tallo a un sujeto, el cual tiene un tejido muscular dañado.

25 Después del contacto de la por lo menos una célula de tallo con el agonista de RAR por el tiempo necesario, la célula de tallo tratada puede ser administrada inmediatamente o almacenada por un periodo de tiempo antes de la administración a un sujeto. Sin limitación, el período de tiempo puede variar de minutos a días.

El número de células de tallo tratadas con agonista de RAR que van a ser administradas a un sujeto puede variar desde una célula individual hasta más de 10^6 .

30 Además, en esta memoria se describe un método para la reparación o regeneración del músculo en un sujeto, en el que el método comprende la administración de una población de células de tallo a un sujeto, en la que una porción de las células de tallo son pretratadas con un agonista de RARy, como se describe en esta memoria. La porción de células pretratadas de tallo puede ser de aproximadamente 50% (una relación 1:1). El uso de poblaciones de células pretratadas de tallo con elevadas relaciones (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, de célula pretratada de tallo:célula no tratada de tallo) y también con relaciones más bajas (1:2, 1:3, 1:4, 1:5, de célula pretratada de tallo:célula no tratada de tallo) es visto también como útil en el método. Por ejemplo, la porción de células pretratadas de tallo puede ser de aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, o 45%. La porción de células pretratadas de tallo puede ser también de aproximadamente 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95%.

40 El método de reparación o regeneración del músculo comprende la administración de la composición que incluye las células pretratadas y no tratadas de tallo, a un sujeto en un sitio de lesión muscular, para reparar o regenerar de ese modo el músculo en el sitio. La lesión puede ser una lesión de tejido compuesto. Una lesión de tejido compuesto es un sitio de daño múltiple de tejido, y puede incluir una o más lesiones de tejido de músculo, hueso, tendón, ligamento, y grasa. Se visualizan diferentes combinaciones. La lesión de tejido compuesto puede incluir músculo y hueso. La lesión de tejido compuesto puede incluir músculo y por lo menos un tejido adicional (por ejemplo, ligamentos, tendones, cartílago, hueso, piel, grasa y vasos sanguíneos). La lesión de tejido compuesto puede incluir músculo y por lo menos dos tejidos adicionales (por ejemplo, dos o más de ligamentos, tendones, cartílago, hueso, piel, grasa y vasos sanguíneos). La lesión de tejido adicional puede incluir hueso. La lesión de tejido compuesto puede incluir músculo y por lo menos tres tejidos adicionales (por ejemplo, tres o más de ligamentos, tendones, cartílago, hueso, piel, grasa y vasos sanguíneos). La lesión de tejido adicional puede incluir hueso. La lesión de tejido compuesto incluye músculo y por lo menos cuatro tejidos adicionales. La lesión de tejido adicional puede incluir hueso. Los tipos de tejido adicional diferentes a aquellos descritos en esta memoria pueden estar incluidos también en la lesión, en combinación con la lesión del músculo.

50 Como se divulgó anteriormente, se ha descubierto que las células progenitoras de tallo pueden ser inducidas para soportar la diferenciación de músculo, mediante exposición aguda o crónica a agonista de receptor gamma de ácido retinoico (RARy)s. De acuerdo con ello, en esta memoria se describe un método para la inducción o estimulación de diferenciación de una célula de tallo dirigida por el linaje, hasta un linaje individual particular, en el que el método comprende el contacto de una célula de tallo con agonista de receptor de ácido retinoico.

El linaje particular puede ser seleccionado de entre el grupo que consiste en linajes mesodérmico, endodérmico, ectodérmico, neuronal, hematopoyético, y cualesquier combinaciones de ellos.

El linaje particular puede ser un linaje mesenquimal.

5 El linaje mesenquimal puede ser seleccionado de entre el grupo que consiste en miogénico, osteogénico, codrogénico, tendonogénico, ligamentogénico, estromagénico de médula, adipogénico, y dermogénico.

Kits

10 Además, en esta memoria se describe un kit para la reparación o regeneración del músculo. El kit puede comprender un agonista de RAR. El kit puede comprender además una población de células de tallo. El agonista de RAR puede ser preformulado dentro de una formulación farmacéutica para la administración, o en el kit pueden suministrarse ingredientes para formulación dentro de una formulación farmacéutica.

El kit puede comprender un agonista de RAR, en el que el agonista es formulado para aplicación tópica.

El kit puede comprender una población de células de tallo, en el que por lo menos una célula en la población ha sido pretratada mediante contacto de las células con un agonista de RAR.

15 En adición a los componentes mencionados anteriormente, el kit puede incluir material de información. El material de información puede ser descriptivo, de instrucciones, de mercadeo u otro material que se refiera a los métodos descritos en esta memoria y/o al uso del compuesto para los métodos descritos en esta memoria. Por ejemplo, el material de información describe los métodos para la administración de la formulación a un sujeto. El kit puede incluir también un dispositivo de entrega.

20 El material de información puede incluir instrucciones para administrar la formulación de una manera adecuada, por ejemplo, en una dosificación adecuada, formas de dosificación o modo de administración (por ejemplo, una dosis, forma de dosificación o modo de administración descritos en esta memoria). El material de información puede incluir instrucciones para la identificación de un sujeto adecuado, por ejemplo, un humano, por ejemplo, un humano adulto. El material de información de los kits no está limitado a su forma. En muchos casos, el material de información, por ejemplo, instrucciones, es suministrado en forma impresa, por ejemplo, un texto impreso, dibujo y/o fotografía, por ejemplo, una etiqueta o lámina impresa. Sin embargo, el material de información puede ser suministrado también en otros formatos, tales como Braille, material que puede ser leído en ordenador, registro en video, o registro en audio. El material de información del kit puede ser un enlace o información de contacto, por ejemplo, una dirección física, dirección de correo electrónico, hipervínculo, sitio web o número telefónico, donde un usuario del kit puede obtener información sustancial sobre la formulación y/o su uso en los métodos descritos en esta memoria. Desde luego, el material de información puede ser suministrado también en cualquier combinación de formatos.

30 Los componentes individuales de la formulación pueden ser suministrados en un contenedor. De modo alternativo, puede ser deseable suministrar los componentes de la formulación, en forma separada en dos o más contenedores, por ejemplo, un contenedor para una preparación de oligonucleótido, y por lo menos otro para un compuesto vehículo. Los diferentes componentes pueden ser combinados, por ejemplo, de acuerdo con instrucciones suministradas con el kit. Los componentes pueden ser combinados de acuerdo con un método descrito en esta memoria, por ejemplo, para preparar y administrar una composición farmacéutica.

35 En adición a la formulación, la composición del kit puede incluir otros ingredientes, tales como solvente o amortiguador, un estabilizante o un conservante, y/o un segundo agente para el tratamiento de una condición o desorden descritos en esta memoria. De modo alternativo, los otros ingredientes pueden ser incluidos en el kit, pero en diferentes composiciones o contenedores a los de la formulación. En tales casos, el kit puede incluir instrucciones para la mezcla de la formulación y los otros ingredientes, o para el uso de los oligonucleótidos junto con los otros ingredientes.

40 Los agonistas de RAR pueden ser suministrados en cualquier forma, por ejemplo, forma líquida, seca o liofilizada. Se prefiere que la formulación sea sustancialmente pura y/o estéril. Cuando la formulación es suministrada en una solución líquida, preferiblemente la solución líquida es una solución acuosa, siendo preferida una solución acuosa estéril. Cuando la formulación es suministrada como una forma seca, generalmente la reconstitución es hecha mediante la adición de un solvente adecuado. El solvente, por ejemplo, agua o amortiguador estériles, pueden ser suministrados opcionalmente en el kit.

45 El kit puede contemplar contenedores, divisores o compartimientos separados, para la formulación y el material de información. Por ejemplo, la formulación puede estar contenida en una botella, vial, o jeringa, y el material de información puede estar contenido en una manga o paquete plástico. De modo alternativo, los elementos separados del kit están contenidos dentro de un contenedor individual no dividido. Por ejemplo, la formulación está contenida en una botella, vial o jeringa que tiene unido a la misma, el material de información en la forma de una etiqueta.

50 El kit puede incluir una pluralidad, por ejemplo, un paquete, de contenedores individuales, en los que cada uno contiene una o más formas unitarias de dosificación de la formulación. Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de jeringas, ampollas, paquetes de lámina o paquetes de ampollas, en los que cada uno contiene una dosificación unitaria

55

individual de la formulación. Los contenedores de los kits pueden ser herméticos al aire y/o impermeables al agua.

Definiciones

5 A menos que se indique de otra forma, o sea implícito a partir del contexto, los siguientes términos y frases incluyen los significados suministrados abajo. A menos que se indique explícitamente de otro modo, o sea aparente a partir del contexto, los términos y frases de abajo no excluyen el significado que el término o frase ha adquirido en la técnica a la cual pertenece. Las definiciones son suministradas para ayudar en la descripción de realizaciones particulares de los aspectos descritos en esta memoria, y no se pretende que limiten la invención reivindicada, porque el alcance de la invención está limitado sólo por las reivindicaciones. Además, a menos que sea requerido de otro modo por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular.

10 Como se usa en esta memoria, el término "que comprende" o "comprende" es usado en referencia a composiciones, métodos y respectivo(s) componente(s) de los mismos, que son esenciales para la invención, además abiertos a la inclusión de elementos no especificados, sean esenciales o no.

15 Como se usa en esta memoria, el término "que consiste esencialmente en" se refiere a aquellos elementos requeridos para una realización dada. El término permite la presencia de elementos adicionales que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s) o funcional(es) de aquella realización de la invención.

El término "que consiste en" se refiere a composiciones, métodos y respectivos componentes de los mismos, como están descritos en esta memoria, que son exclusivos de cualquier elemento no citado en aquella descripción de la realización.

20 Los términos singulares "un", "uno" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. De modo similar, se pretende que la palabra "o" incluya "y", a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo.

25 Aunque en la práctica o prueba de esta divulgación pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en esta memoria, abajo se describen métodos y materiales adecuados. El término "comprende" significa "incluye". La abreviación, "por ejemplo" es derivada del latín *exempli gratia*, y es usada en esta memoria para indicar un ejemplo no limitante. Así la abreviación "por ejemplo" es sinónimo del término "por ejemplo".

30 Los términos "decrecimiento", "reducido", "reducción", "decrece" o "inhibe" son usados en esta memoria en general para indicar un descenso en una cantidad estadísticamente significativa. Sin embargo, para evitar dudas, "reduce", "reducción" o "decrece" o "inhibe" indica un decrecimiento de por lo menos 10%, comparado con un nivel de referencia, por ejemplo a un decrecimiento de por lo menos aproximadamente 20%, o por lo menos aproximadamente 30%, o por lo menos aproximadamente 40%, o por lo menos aproximadamente 50%, o por lo menos aproximadamente 60%, o por lo menos aproximadamente 70%, o por lo menos aproximadamente 80%, o por lo menos aproximadamente 90% o un decrecimiento de hasta e incluyendo 100% (por ejemplo nivel ausente comparado con una muestra de referencia), o cualquier decrecimiento de entre 10-100%, comparado con un nivel de referencia.

35 Los términos "incrementado", "incrementa" o "mejora" o "activa" son usados todos en esta memoria para indicar generalmente un incremento en una cantidad estadísticamente significativa; para evitar cualquier duda, los términos "incrementado", "incrementa" o "mejora" o "activa" indican un incremento de por lo menos 10% comparado con un nivel de referencia, por ejemplo un incremento de por lo menos aproximadamente 20%, o por lo menos aproximadamente 30%, o por lo menos aproximadamente 40%, o por lo menos aproximadamente 50%, o por lo menos aproximadamente 60%, o por lo menos aproximadamente 70%, o por lo menos aproximadamente 80%, o por lo menos aproximadamente 90% o un incremento de hasta e incluyendo 100% o cualquier incremento entre 10-100% comparado con un nivel de referencia, o por lo menos aproximadamente un incremento de 2 veces, o por lo menos aproximadamente 3 veces, o por lo menos aproximadamente 4 veces, o por lo menos aproximadamente 5 veces o por lo menos aproximadamente 10 veces, o cualquier incremento entre 2 veces y 10 veces o mayor, comparado con un nivel de referencia.

45 El término "elevado" indica un incremento en una cantidad estadísticamente significativa; para evitar cualquier duda, el término "elevado" indica un incremento de por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos una vez, por lo menos 1.5 veces, por lo menos 2 veces, por lo menos 3 veces, por lo menos 4 veces, por lo menos 5 veces, o por lo menos 10 veces o mayor, comparado con un nivel de referencia.

55 El término "estadísticamente significativo" o "significativamente" se refiere a la significancia estadística e indica generalmente dos desviaciones estándar (2SD) por encima o por debajo de un nivel de referencia. El término se refiere a evidencia estadística de que hay una diferencia. Está definida como la probabilidad de tomar una decisión de rechazar la hipótesis nula, cuando la hipótesis nula es realmente verdadera. Usualmente la decisión es tomada usando el valor p.

Como se usa en esta memoria, el término "ex vivo" se refiere a células de son retiradas de un organismo viviente y

cultivadas fuera del organismo (por ejemplo, en un tubo de ensayo).

A menos que se indique de otro modo en esta memoria, los términos científicos y técnicos dados en conexión con el presente documento tendrán los significados que son entendidos comúnmente por aquellos de destreza ordinaria en la técnica. Además, a menos que sea requerido de otro modo por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular.

La terminología usada en esa memoria está para el propósito de descripción de realizaciones particulares únicamente, y no se pretende que limite el alcance de la presente invención, el cual está definido únicamente por las reivindicaciones.

Aparte de los ejemplos operativos, o donde se indique de otro modo, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción usados en esta memoria deberían ser entendidos como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente." Cuando es usado para describir la presente invención, el término "aproximadamente", en conexión con porcentajes, indica $\pm 1\%$.

En un aspecto, la presente invención se refiere a las composiciones, métodos y respectivos componentes de ellos descritos en esta memoria, según sea esencial para la invención, además abierto a la inclusión de elementos no especificados, esenciales o no ("que comprende"). En algunas realizaciones, otros elementos que deben incluirse en la descripción de la composición, método o respectivos componentes de los mismos, están limitados a aquellos que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s) de la invención ("que consiste esencialmente en"). Esto aplica igualmente para los pasos dentro de un método descrito, así como composiciones y componentes del mismo. En otras realizaciones, se pretende que las invenciones, composiciones, métodos y respectivos componentes de los mismos, descritos en esta memoria sean exclusivos de cualquier elemento no estimado como elemento esencial del componente, composición o método ("el consiste en").

En la extensión no indicada ya, aquellos de destreza ordinaria en la técnica entenderán que una cualquiera de las diferentes realizaciones descritas e ilustradas en esta memoria, puede ser modificada adicionalmente para incorporar rasgos mostrados en cualquiera de las otras realizaciones divulgadas en esta memoria.

Todas las patentes, solicitudes de patente y publicaciones identificadas, son suministradas únicamente por su divulgación previa a la fecha de registro del presente documento. Nada a este respecto debería ser interpretado como una aceptación de que los inventores no están autorizados para anteceder tal divulgación en virtud de invención previa o por cualquier otra razón. Todas las declaraciones sobre la fecha o representación sobre el contenido de estos documentos, se basa en la información disponible para los solicitantes y no constituye ninguna aceptación sobre la exactitud de las fechas o contenidos de estos documentos.

También se divulgan, pero no definen la presente invención, los siguientes párrafos numerados.

1. Un método para la reparación o regeneración del músculo en un sujeto, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de receptor gamma de ácido retinoico (RAR γ) a un sujeto con tejido muscular dañado, para regenerar o reparar de ese modo el tejido muscular dañado.

2. El método del párrafo 1, en el que dicha administraciones local o sistémica.

3. El método de uno cualquiera de los párrafos 1-2, en el que la administración comienza durante un periodo de tiempo de señalización retinoide endógena incrementada en el sujeto, resultante del compromiso del tejido muscular dañado.

4. El método de uno cualquiera de los párrafos 1-3, en el que la administración comienza posteriormente a 3 días después del compromiso del tejido muscular dañado por el sujeto.

5. El método del párrafo 4, en el que la administración comienza aproximadamente 4 días después del compromiso del tejido muscular dañado por el sujeto.

6. El método del párrafo 4, en el que la administración comienza aproximadamente 5 días después del compromiso del tejido muscular dañado por el sujeto.

7. El método del párrafo 4, en el que la administración comienza aproximadamente 6 días después del compromiso del tejido muscular dañado por el sujeto.

8. El método del párrafo 4, en el que la administración comienza aproximadamente 7 días después del compromiso del tejido muscular dañado por el sujeto.

9. El método del párrafo 4, en el que la administración comienza aproximadamente 5 días, y continúa hasta por lo menos el día 7, después del compromiso del tejido muscular dañado por el sujeto.

10. El método del párrafo 9, en el que la administración continúa hasta por lo menos el día 9 después del compromiso del tejido muscular dañado por el sujeto.

- 5 11. El método de uno cualquiera de los párrafos 1-10, en el que al agonista de RARy es seleccionado de entre el grupo que consiste en CD-271 (ácido 6-(4-metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-1530 (ácido 4-(6-hidroxi-7-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il-2-naftale nil)benzoico); CD-2247; palovaroteno (ácido 4-[(1E)-2-[5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-3-(1H-pirazol-1-ilmetil)-2-naftalenil]-etenil]-benzoico); BMS-270394 (ácido 3-fluoro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); BMS-189961 (ácido 3-fluoro-4-[2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); CH-55 (ácido 4-[(E)-3-(3,5-di-tert-butil-fenil)-3-oxo-propenil]-benzoico); ácido 6-[3-(adamantan-1-il)-4-(prop-2-iniloxi)fenil]naftaleno-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftaleno-2-il)propenil]tiofeno-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 10 12. El método de uno cualquiera de los párrafos 1-11, en el que el tejido muscular dañado es el resultado de una lesión física o accidente, enfermedad, infección, uso excesivo, pérdida de circulación sanguínea o atrofia o desgaste muscular.
- 15 13. El método de uno cualquiera de los párrafos 1-11, en el que el tejido muscular dañado es músculo distrófico o un músculo envejecido.
14. El método de uno cualquiera de los párrafos 1-11, en el que el tejido muscular dañado es el resultado de la atrofia/desgaste del músculo.
15. El método de uno cualquiera de los párrafos 1-14, en el que el sujeto es un mamífero .
16. El método de uno cualquiera de los párrafos 1-15, en el que el sujeto es un ratón.
- 20 17. El método de uno cualquiera de los párrafos 1-15, en el que el sujeto es humano.
18. El método de uno cualquiera de los párrafos 1-17, que comprende además la administración de un agente antiinflamatorio al sujeto.
- 25 19. Un método para la reparación o regeneración del músculo en un sujeto, que comprende la administración de células pluripotentes o multipotentes de tallo, que han sido pretratadas con un agonista de RARy, a un sujeto en un sitio de lesión muscular, para reparar o regenerar de ese modo el músculo en el sitio.
20. El método del párrafo 19, en el que la lesión muscular es una lesión de tejido compuesto.
21. El método del párrafo 20, en el que la lesión de tejido compuesto comprende una lesión a músculo y hueso.
22. El método de uno cualquiera de los párrafos 19-21, en el que las células pretratadas de tallo son administradas en combinación con células no tratadas de tallo.
- 30 23. El método del párrafo 22, en el que las células pretratadas de tallo y células no tratadas de tallo son administradas en una relación de 1:1.
24. El método de uno cualquiera de los párrafos 19-23, en el que las células pretratadas de tallo han sido pretratadas con el agonista de RARy por un periodo de aproximadamente 3 días.
25. El método del párrafo 19, en el que las células pluripotentes de tallo son células pluripotentes inducidas de tallo.
- 35 26. El método de uno cualquiera de los párrafos 19-25, en el que las células pluripotentes de tallo son células de tallo mesenquimal.
27. El método de uno cualquiera de los párrafos 19-26, en el que la administración es local.
28. El método de uno cualquiera de los párrafos 19-27, en el que la administración es por trasplante de las células dentro del sujeto.
- 40 29. El método de uno cualquiera de los párrafos 19-28, en el que las células pluripotentes de tallo son autólogas o heterólogas para el sujeto.
30. El método de uno cualquiera de los párrafos 19-29, en el que las células pluripotentes de tallo son de mamífero.
31. El método de uno cualquiera de los párrafos 19-30, en el que las células pluripotentes de tallo son de roedor.
32. El método de uno cualquiera de los párrafos 19-30, en el que las células pluripotentes de tallo son de humano.
- 45 33. El método de uno cualquiera de los párrafos 19-32, que comprende además la administración de un agente antiinflamatorio al sujeto.
34. El método de uno cualquiera de los párrafos 19-33, en el que el agonista de RARy es seleccionado de entre el

- grupo que consiste en CD-271 (ácido 6-(4-metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-1530 (ácido 4-(6-hidroxi-7-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il-2-naftalenil)benzoico); CD-2247; palovaroteno (ácido 4-[(1E)-2-[5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-3-(1H-pirazol-1-ilmetil)-2-naftalenil]-etenil]-benzoico); BMS-270394 (ácido 3-fluoro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); BMS-189961 (3-fluoro-4-[2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); CH-55 (ácido 4-[(E)-3-(3,5-di-tert-butil-fenil)-3-oxo-propenil]-benzoico); ácido 6-[3-(adamantan-1-il)-4-(prop-2-iniloxi)fenil]naftaleno-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftaleno-2-il)propenil]tiofeno-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 5 35. El método de uno cualquiera de los párrafos 19-34 en el que el músculo lesionado es el resultado de lesión física o accidente, enfermedad, infección, uso excesivo, pérdida de circulación sanguínea o atrofia o desgaste muscular.
36. El método de uno cualquiera de los párrafos 19-34, en el que el tejido muscular lesionado es músculo distrófico o un músculo envejecido.
- 15 37. El método de uno cualquiera de los párrafos 19-34, en el que el músculo lesionado es el resultado de atrofia/desgaste del músculo.
38. Un método para la inducción o estimulación de diferenciación miogénica de células aisladas de tallo mesenquimal, *in vitro* que comprende el contacto de las células de tallo mesenquimal con una cantidad efectiva de un agonista de receptor gamma de ácido retinoico (RAR γ).
- 20 39. El método del párrafo 38, en el que el contacto es por un periodo de tiempo seleccionado de entre el grupo que consiste en aproximadamente 12 horas, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, y aproximadamente 3 días.
40. Un método para la inducción o estimulación de diferenciación dirigida por el linaje, de una célula pluripotente de tallo hasta un linaje mesenquimal, en el que el método comprende el contacto de la célula pluripotente de tallo con una cantidad efectiva de un agonista de receptor gamma de ácido retinoico (RAR γ).
- 25 41. El método del párrafo 40, en el que la célula pluripotente de tallo es una célula pluripotente inducida de tallo.
42. El método de uno cualquiera de los párrafos 40-41, en el que la célula pluripotente de tallo es a célula de tallo mesenquimal.
43. El método de uno cualquiera de los párrafos 40-42, en el que el linaje mesenquimal es seleccionado de entre el grupo que consiste en miogénico, osteogénico, codrogénico, tendonogénico, ligamentogénico, estromagénico de médula, adipogénico, y dermogénico.
- 30 44. El método de uno cualquiera de los párrafos 40-43, en el que la célula pluripotente de tallo es de mamífero.
45. El método de uno cualquiera de los párrafos 40-44, en el que la célula pluripotente de tallo es de roedor.
46. El método de uno cualquiera de los párrafos 40-45, en el que la célula pluripotente de tallo es de humano.
- 35 47. El método de uno cualquiera de los párrafos 40-46, en el que el agonista de RAR γ es seleccionado de entre el grupo que consiste en CD-271 (ácido 6-(4-metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-1530 (ácido 4-(6-hidroxi-7-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il-2-naftalenil)benzoico); CD-2247; palovaroteno (ácido 4-[(1E)-2-[5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-3-(1H-pirazol-1-ilmetil)-2-naftalenil]-etenil]-benzoico); BMS-270394 (ácido 3-fluoro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); BMS-189961 (ácido 3-fluoro-4-[2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); CH-55 (ácido 4-[(E)-3-(3,5-di-tert-butil-fenil)-3-oxo-propenil]-benzoico); ácido 6-[3-(adamantan-1-il)-4-(prop-2-iniloxi)fenil]naftaleno-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftaleno-2-il)propenil]tiofeno-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 40 48. Una composición que comprende células de tallo mesenquimal, en la que una porción de las células de tallo mesenquimal ha sido pretratada mediante contacto con un agonista de RAR γ para generar de ese modo células pretratadas de tallo mesenquimal.
49. La composición del párrafo 43, en la que la porción de células pretratadas de tallo mesenquimal es seleccionada de entre el grupo que consiste en 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, y 90%.
- 50 50. Una composición que comprende una población de células pluripotentes de tallo, en la que por lo menos una célula de la población tuvo contacto con un agonista de RAR γ para generar de ese modo una célula pretratada pluripotente de tallo.
51. La composición del párrafo 50, en la que la célula pluripotente de tallo es una célula pluripotente inducida.

52. La composición de uno cualquiera de los párrafos 50-51, en el que la célula pluripotente de tallo es una célula de tallo mesenquimal.
53. La composición de uno cualquiera de los párrafos 50-52, en el que la célula de tallo es una célula de tallo aislada.
54. La composición de uno cualquiera de los párrafos 50-53, en el que la célula de tallo es de mamífero.
- 5 55. La composición de uno cualquiera de los párrafos 50-54, en el que la célula de tallo es murina.
56. La composición de uno cualquiera de los párrafos 50-54, en el que la célula de tallo es de humano.
57. La composición de uno cualquiera de los párrafos 50-56, en la que el agonista de RAR γ es seleccionado de entre el grupo que consiste en CD-271 (ácido 6-(4-metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-1530 (ácido 4-(6-hidroxi-7-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il-2-naftalenil)benzoico); CD-2247; palovaroteno (ácido 4-[(1E)-2-[5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-3-(1H-pirazol-1-ilmetil)-2-naftalenil]-etenil]-benzoico); BMS-270394 (ácido 3-fluoro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); BMS-189961 (ácido 3-fluoro-4-[2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); CH-55 (ácido 4-[(E)-3-(3,5-di-tert-butil-fenil)-3-oxo-propenil]-benzoico); ácido 6-[3-(adamantan-1-il)-4-(prop-2-iniloxi)fenil]naftaleno-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftaleno-2-il)propenil]tiofeno-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 10
- 15
58. una composición farmacéutica que comprende una composición de uno cualquiera de los párrafos 50-57 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
59. Un kit para la reparación o regeneración muscular, que comprende por lo menos uno de
- 20 (i) un agonista de RAR γ ;
- (ii) un agonista de RAR γ y una célula de tallo; o
- (iii) una composición de uno cualquiera de los párrafos 48-58.
60. El kit del párrafo 59, en el que la célula de tallo es una célula pluripotente inducida de tallo.
61. El kit de uno cualquiera de los párrafos 59-60, en el que la célula de tallo es una célula de tallo mesenquimal.
- 25 62. El kit de uno cualquiera de los párrafos 59-61, en el que el agonista de RAR γ es formulado en una composición farmacéutica.
63. El kit de uno cualquiera de los párrafos 59-62, en el que el agonista de RAR γ es formulado para aplicación tópica.
64. El kit de uno cualquiera de los párrafos 59-63, en el que la célula de tallo es una célula de tallo aislada.
- 30 65. El kit de uno cualquiera de los párrafos 59-64, en el que la célula de tallo es de mamífero.
66. El kit de uno cualquiera de los párrafos 59-65, en el que la célula de tallo es de roedor.
67. El kit de uno cualquiera de los párrafos 59-65, en el que la célula de tallo es de humano.
68. El kit de uno cualquiera de los párrafos 59-67, en el que el agonista de RAR γ es seleccionado de entre el grupo que consiste en CD-271 (ácido 6-(4-metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-1530 (ácido 4-(6-hidroxi-7-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il-2-naftalenil)benzoico); CD-2247; palovaroteno (ácido 4-[(1E)-2-[5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-3-(1H-pirazol-1-ilmetil)-2-naftalenil]-etenil]-benzoico); BMS-270394 (ácido 3-fluoro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); BMS-189961 (ácido 3-fluoro-4-[2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); CH-55 (ácido 4-[(E)-3-(3,5-di-tert-butil-fenil)-3-oxo-propenil]-benzoico); ácido 6-[3-(adamantan-1-il)-4-(prop-2-iniloxi)fenil]naftaleno-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftaleno-2-il)propenil]tiofeno-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 35
- 40
69. El kit de uno cualquiera de los párrafos 59-68, que comprende además instrucciones para el uso.
- 45 La presente invención es ilustrada adicionalmente por los siguientes ejemplos. estos ejemplos son suministrados para ayudar al entendimiento de la invención y no deben interpretarse como una limitación de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1

Métodos

Aislamiento y cultivo de células de tallo mesenquimal (MSCs) derivadas de médula de hueso. Se aislaron MSCs como se describió previamente (ref) con modificaciones menores. Brevemente, se extrajeron células de médula de hueso de ratón ($1-2 \times 10^7$) de huesos largos de ratones con 4-6 semanas de edad, se inocularon sobre placas de cultivo de 100 mm, se incubaron por 3 horas a 37°C para permitir la unión de células adherentes, y luego se enjuagó dos veces con PBS para retirar las células no adherentes. Las MSCs derivadas de médula de hueso formaron colonias adherentes después de 12-15 días de cultivo. Se pasaron cultivos primarios para dispersar las células formadoras de colonia (paso 1). Luego se subcultivaron nuevamente las células, cuando alcanzaron confluencia de 70%. Las células fueron mantenidas en α -MEM (Gibco BRL; Invitrogen Corp.) que contenía 20% de suero fetal bovino (FBS; Equitech-Bio Inc.), 2 mM de L-glutamina, una combinación de 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin (Biofluids Inc.), y 55 μ M de 2-mercaptoetanol (Gibco BRL; Invitrogen Corp.), antes del primer paso. Después del primer paso, se mantuvieron las células en α -MEM con 10%FBS, a menos que se indique de otro modo.

Se aislaron DsRED que expresan MSCs de ratón B6.Cg-Tg(CAG-DsRed*MST)1Nagy/J (ratón Jax). Se obtuvo GFP que expresa MSCs de ratón transgénico que porta H2K-GFP (Dominici et al. *Genesis* 42:17-22(2005)).

Trasplante de células. Se suspendieron MSCs (1×10^5) con o sin pretratamiento con agonista de RAR en 10 μ l en DMEM libre de suero y se colocaron sobre el defecto del músculo creado como se describió en esta memoria.

Procedimientos histológicos. Para inspeccionar la estructura de tejido muscular, se fijaron muestras en PFA 4% y se incrustaron en parafina. Se tiñeron secciones en serie de cinco μ m por H&E (http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/HE_Mayer.htm) o solución de tinción de tricromo de Masson (http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/masson_trichrome.htm). Para detectar tejido adiposo, las muestras fijas en PFA 4% fueron llevadas al equilibrio en sacarosa al 20 % en PBS, se incrustaron en compuesto de OCT y luego se dividieron en secciones mediante el criostato. Se seccionaron criosecciones de diez μ m, se rehidrataron y luego se tiñeron con aceite-rojo O (http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/oil_red_o.htm).

Inmunofluorescencia. Para la detección de diferentes antígenos en secciones de tejido, se retiró la parafina a secciones de parafina de 5 μ m, se las rehidrató y luego se las trató con pepsina al 0.1 % en HCl 0.02 N por 15 min a 37°C. Se lavaron tres veces las secciones en PBS-T y se bloquearon en suero normal de cabra 10% con 0.3% de BSA. Se incubaron las secciones con el primer anticuerpo, se lavó tres veces con PBS-T y luego se incubaron con el segundo anticuerpo. Abajo se muestra la lista de antígenos, anticuerpos y sus diluciones.

MioD: Anti-MioD; sc-760 (Santa Cruz, 1:100), anticonejo Alexa Flour 488 (Invitrogen, 1:500)
 Myf5: Anti-Myf5; sc-302 (Santa Cruz, 1:100), anticonejo Alexa Flour 488 (Invitrogen, 1:500)
 Anti-Laminina2; ALX-804-190 (Enzo Life Science, 1: 250), antirrata Alexa Flour 594 (Invitrogen, 1:500)
 Cadena pesada de miosina (MHC): Anti-MHC; MF-20 (Developmental Studies Hybridoma Bank, 1: 25), antirrata Alexa Flour 588 (Invitrogen, 1:500)
 Osteocalcina (OC): Anti-OC; M173 (Takara, 1:500), anticonejo Alexa Flour 594 (Invitrogen, 1:500)
 Proteína fluorescente verde (GFP): Biotina conjugada anti-GFP; NB100-1678 (Novus, 1: 250), estreptavidina Alexa Flour 488 (Invitrogen, 1:500)

Administración local y sistémica de agonista de RAR. La administración sistémica de agonista de RAR fue llevada a cabo mediante sonda como se describió previamente (Shimono et al. *J. Orthop. Res.* 28:271-277, 2010). La entrega local de agonista de RAR fue realizada mediante inyección de agonista de RAR (disuelto en DMSO) usando jeringa Hamilton 87943 con aguja 26G.

Resultados

Se investigaron los efectos diferenciales de agonistas retinoides sobre la diferenciación miogénica en cultivos de célula de tallo mesenquimal (BMSC) derivada de médula de hueso de ratón. Se prepararon BMSCs de fémures y tibias de ratones con 6 semanas de edad, mediante métodos estándar y se mantuvieron en DMEM 5% FBS por 7 días en presencia de DMSO 0.1 % (vehículo: control), 1 μ M de ácido retinoico (RA) todo trans (disponible comercialmente de Sigma), 1 μ M de agonista alpha de RAR (obtenido de NuRx Pharmaceuticals) o 30 nM de agonista gamma de RAR (CD1530, disponible comercialmente). Se formaron muchas células de músculo elongadas con varios núcleos, solamente en cultivos tratados con agonista gamma de RAR.

Se cultivaron células de una línea de célula de tallo mesenquimal por 10 días en presencia o ausencia de agonista gamma de RAR (CD1530, 100 nM). Se procesaron los cultivos por inmunotinción con anticuerpos MioD o Myf5 o se tiñeron con pigmento nuclear DAPI. Las células de control no tratadas contenían cantidades no detectables de MioD y Myf5, pero ambas proteínas estuvieron claramente presentes en cultivos tratados con agonista gamma. Los resultados indicaron un incremento en niveles de MioD y Myf5 por el agonista gamma de RAR en cultivos de célula de tallo mesenquimal (MSC).

Se usó un modelo de músculo del ratón con defecto, para investigar el estímulo de reparación muscular por administración de agonistas gamma de RAR. Se creó un defecto con forma redonda con un catalizador eléctrico en músculos de pantorrilla o tibia anterior en ratones con 8 semanas de edad dando como resultado un defecto de 2.0

mm x 2.0 mm x 2.0 mm.

Se crearon defectos con forma redonda en tejido muscular de pantorrilla de ratón con 8 semanas de edad como anteriormente (un defecto muscular/ratón). Los ratones recibieron aceite de maíz (vehículo) o 300 µg de agonista gamma de RAR (CD1530)/día por sonda los días 8, 10 y 12 después de la lesión. Se recolectó tejido para análisis histológico el día 14. Los defectos de músculo en los ratones de control fueron llenados principalmente con tejido conectivo y fibroso de tipo cicatriz para el día 14. Estos tejidos de tipo cicatriz fueron totalmente negativos para cadena pesada de miosina (MHC), según se detectó mediante inmunotinción. En contraste, los sitios de defecto de músculo en ratones tratados con agonista gamma de RAR fueron llenados con muchas células elongadas de tipo músculo y muchas de estas células fueron positivas para MHC. Los resultados indican estímulo de la reparación de músculo por administración sistémica de agonista gamma de RAR.

A continuación de la creación de defectos de 2x2x2 mm en el centro del músculo tibial anterior como anteriormente (un defecto muscular/ratón), los ratones recibieron aceite de maíz (vehículo) o 300 µg de agonista gamma de RAR/día mediante sonda los días 8, 10 y 12 después de la lesión. Se colectaron tejidos para análisis histológicos a las 2 y 4 semanas. Se tomaron macrofotografías de tejido muscular lesionado recolectado de ratones de control y ratones tratados con agonista gamma de RAR (CD1530), a 4 semanas después de la lesión. En los controles, el defecto era claramente visible como una mancha blanca. En contraste, casi no hubo signo visible del defecto original en los ratones tratados con agonista gamma de RAR. El análisis histológico reveló que los defectos de tejido muscular en los ratones de control fueron ocupados por mezclas de tejidos adiposo y fibroso a 2 y 4 semanas. Se notó también la deposición de tejido fibroso entre las fibras de músculo. Sin embargo, en los ratones tratados con agonista gamma de RAR, los defectos de músculo fueron llenados con fibras de músculo alineadas a lo largo del eje longitudinal mayor del músculo tibial anterior. Los resultados indicaron completa reparación de los defectos de músculo, por administración sistémica de agonista gamma de RAR durante el tiempo.

El análisis histológico del tejido muscular del esqueleto fue ejecutado 4 semanas después de la lesión. Se tiñeron secciones transversales en serie de especímenes de tejido muscular colectadas 4 semanas después de la lesión (las mismas muestras discutidas directamente arriba), con tricromo de Masson o se procesaron por inmunotinción con anticuerpos para laminina (una proteína extracelular abundante alrededor de las células del músculo). En los controles, el sitio de la lesión inicial fue reparado de manera precaria y ocupado de manera importante por tejido adiposo y tejido conectivo fibroso que no fue teñido con anticuerpos antilaminina. En contraste, la lesión del músculo fue casi completamente reparada en animales tratados con agonista gamma; el tejido reparado fue teñido fuertemente con anticuerpos antilaminina. Para evaluar y cuantificar los cambios de estructura de tejido muscular del esqueleto, se tomaron imágenes de series de secciones teñidas con tricromo y se determinaron las cantidades relativas de tejidos de fibra de músculo, adiposo y fibroso en áreas múltiples definidas mediante software ImagePro. Las áreas analizadas tenían 9 x 9 cuadros cada una (aproximadamente 3 x 3 mm) que incluían el sitio original lesionado (2 x 2 mm). La lesión muscular causó una disminución en el área total de fibra de músculo y un simultáneo incremento en el área de tejidos fibroso y adiposo. En contraste, el tratamiento con CD1530 restauró de manera importante la composición del tejido. En la figura 1 se muestra gráficamente la cantidad relativa de músculo, según se determinó.

Para verificar que el gamma de RAR es requerido para la reparación y regeneración del músculo, se crearon lesiones del músculo en ratones de tipo silvestre (WT) y nulos en gamma de RAR, como arriba. Los animales fueron luego tratados con agonista gamma o vehículo (aceite de maíz). Se colectaron muestras de tejido 4 semanas después de la lesión, se seccionaron y tiñeron con solución de tinción de tricromo de Masson. De acuerdo con los resultados discutidos anteriormente, el tratamiento con agonista gamma indujo efectiva reparación muscular en ratones WT. Sin embargo, tuvo mínimos efectos en ratones nulos en gamma de RAR, en los cuales el sitio del defecto muscular fue llenado con células de tejido adiposo y algunas de tejido conectivo y revestido con células fibrosas. Estos hallazgos indican que: (1) los efectos de reparación muscular por los agonistas gamma son mediados por gamma de RAR; y (2) el gamma de RAR es requerido para reparar tejido muscular del esqueleto.

Se examinaron los efectos de diferentes agonistas retinoides sobre la reparación de músculo del esqueleto. Se tomaron macrofotografías de sitios de lesión del músculo en el tiempo de la semana 4. El análisis histomorfométrico de la composición de músculos lesionados es mostrado en la figura 2. Los defectos de lesión muscular fueron creados en ratones con 8 semanas de edad, como se describió anteriormente. Los ratones recibieron aceite de maíz (control), 300 µg de panagonista de ácido retinoico (RA), 900 µg NRX195183 (agonista alpha de RAR) o 300 µg CD1530 (agonista gamma de RAR) los días 8, 10 y 12, por sonda. Cuatro semanas después de la lesión, se colectaron muestras de tejido, se procesaron para análisis histológico y sometieron a cuantificación histomorfométrica. En los animales de control y animales tratados con agonista alfa de RAR o RA, los sitios de lesión fueron todavía claramente visibles como grandes manchas blancuzcas, debidas al reemplazo de músculo con tejido adiposo. Sin embargo, en los animales tratados con gamma de RAR, los sitios de lesión fueron esencialmente invisible a 4 semanas, dado que habían sido llenados con reparación de tejido muscular. Para cuantificar las respuestas, se tiñeron secciones en serie de tejidos en el sitio de reparación, con tricromo y se analizaron para cuantificar cantidades relativas de tejidos de músculo, adiposo y fibroso en áreas definidas por software ImagePro, como se describió anteriormente. Las áreas analizadas tenían 9 x 9 cuadros cada una (aproximadamente 3 x 3 mm) que contenían el sitio original de la lesión (2 x 2 mm). En la figura 2 se muestran los resultados. La gráfica muestra los promedios de nueve secciones de tres ratones. "Normal" se derivó de una composición de tejido muscular de músculo normal no lesionado. Como era de esperarse, los músculos en animales de control estaban compuestos por 90% de tejido muscular, 7% de tejido fibroso

y cantidades traza de tejido graso. La lesión muscular causó un dramático descenso en el área de fibra de músculo, de 90% a 33%, y hubo correspondientes incrementos en áreas de tejido adiposo y fibroso. El tratamiento con RA mejoró moderadamente el área de fibra de músculo, de 33% (control) a 54%, pero hubo un incremento significativo del área de tejido fibroso. El agonista NRX195183 alpha de RAR no mejoró la composición del tejido. En contraste, la composición de tejidos reparados en animales tratados con CD1530 fue casi normal.

Se investigaron los efectos de los agonistas gamma de RAR con diferente estructura del armazón, sobre la reparación del músculo. En los experimentos discutidos anteriormente, se mostró que el agonista gamma CD1530 acelera dramáticamente la reparación del músculo y que la expresión de gamma de RAR es requerida para tal efecto. Para validar adicionalmente estos hallazgos e identificar posibles agonistas gamma más potentes, se probaron en la reparación del músculo otros tres agonistas gamma de RAR selectivos estructuralmente diferentes (BMS270394, palovaroteno, y CD437). Se crearon lesiones en el músculo de la pierna, como anteriormente. Cada grupo de ratones recibió uno de los diferentes agonistas (100 ug/sonda/día) o vehículo en los días 8, 10 y 12 desde la lesión. Se colectaron tejidos 4 semanas después de la cirugía y se examinaron como anteriormente. En los controles, los sitios de lesión del músculo eran claramente visibles como manchas blancuzcas y hubo mínima reparación del músculo; adicionalmente, dentro del músculo lesionado estuvo presente tejido de cicatriz fibroso. En contraste, cada agonista gamma indujo efectiva reparación del músculo; entre los tres agonistas probados, el más efectivo fue BMS270394 y restauró completamente hasta una estructura normal del músculo. Los resultados indican que los agonistas gamma son extremadamente efectivos en desencadenar la reparación del músculo.

Se examinaron los efectos de la administración local de agonista gamma de RAR sobre la reparación del músculo. Aunque en los experimentos de reparación del músculo no se han observado mayores efectos laterales de la administración sistémica de agonistas gamma, en ciertas situaciones clínicas podría ser necesario entregarlos localmente. Para probar la efectividad de estos fármacos cuando son entregados localmente, se crearon lesiones musculares como anteriormente y se inyectaron de manera subcutánea 3 µg de CD1530, alrededor del sitio de la lesión, los días 8 y 10 después de la operación. Se inyectó un vehículo en los controles, y se colectaron tejidos a las 4 semanas y se examinaron como anteriormente. En los controles, los sitios de lesión eran claramente visibles y fueron ocupados de manera importante por tejido adiposo. Sin embargo, en el grupo tratado con CD1530, los defectos del músculo fueron casi completamente reparados. El peso molecular de los agonistas gamma es en general menor que 500 y por ello los fármacos pudieron ser entregados desde la piel a los tejidos musculares más profundos, en la forma de ungüentos u otras formulaciones (adicionalmente a la inyección local).

Se trataron células de tallo mesenquimal de ratón que expresan GFP con vehículo (control) o CD1530 100 nM por tres días en cultivo, mezclado con Matrigel y 1 µg de rhBMP2, y luego de trasplantaron a ratones desnudos. Dos semanas después del implante, se colectaron tejidos ectópicos, para análisis. En los controles se observó formación masiva de hueso endocondral; la inmunotinción con anti-GFP y anti-OC (osteocalcina) reveló que las MSCs trasplantadas habían contribuido a la formación de hueso. Sin embargo, no se había formado hueso ectópico endocondral en ratones trasplantados con MSCs pretratadas con agonista gamma; estas células estaban presentes, como lo indica la tinción positiva con GFP pero fueron negativas para tinción con OC y frecuentemente estaban alineadas. Algunas células estaban fusionadas o en el proceso de fusión. Así, el tratamiento con agonista gamma ceba de manera efectiva las MSCs para emprender una ruta de diferenciación miogénica. Estos resultados indican que el agonista gamma de RAR es un factor cebador para la diferenciación miogénica de células de tallo mesenquimal (MSC).

Para examinar adicionalmente la habilidad de los agonistas gamma para cebar MSCs hacia el linaje miogénico, se crearon defectos de lesión muscular en ratones desnudos como se discutió anteriormente y se trasplantaron allí MSCs que expresan DsRed pretratadas con agonista gamma por tres días (o que se dejaron sin tratar). Dos semanas después del trasplante, se colectaron los tejidos presentes en los sitios de lesión y se inspeccionaron bajo estereomicroscopio fluorescente. Se procesaron entonces los tejidos para análisis histológico. La estereomicroscopía fluorescente reveló fuerte señal de fluorescencia roja presente en los sitios de lesión del músculo, donde se implantaron MSCs pretratadas con agonista gamma, pero se observó poca o no se observó fluorescencia en sitios implantados MSCs de control no tratadas (A, paneles izquierdos). La tinción con Solvente Rojo 27 reveló la presencia de abundante tejido adiposo en los sitios de lesión implantados con MSCs de control (B, izquierda), pero ausencia de estas células en los sitios implantados con MSCs pretratadas con agonista gamma (B, derecha). El análisis por inmunofluorescencia reveló que las MSCs positivas para DsRed y pretratadas con agonista gamma contribuyeron a la formación de tejido de reparación muscular que expresa MHC (C, derecha), pero su ausencia en el control (DsRed, color rojo; MHC, verde; DAPI, púrpura). En experimentos descritos anteriormente, la administración sistémica de agonistas gamma indujo la reparación de defectos de lesión muscular en 4 semanas. Es notable que se repararon defectos similares casi completamente dentro de 2 semanas después del trasplante de MSCs cebadas con agonista gamma. Por ello, el uso de MSCs pretratadas con agonista gamma pudo representar un procedimiento muy efectivo para reparar rápidamente lesiones musculares. Estos resultados indican la reparación de lesión muscular mediante MSCs cebadas con esta gamma.

Ejemplo 2

Métodos

A menos que se indique de otro modo, todos los métodos fueron ejecutados como se describió en el Ejemplo 1, o

mediante procedimientos estándar conocidos en la técnica.

La inmunodetección de células humanas y cadena pesada de miosina fue ejecutada incubando secciones con antihumano TRA-1-85 biotinilado (dilución 1:250, R&D cat #BAM3195) y antilaminina (1:250, Enzy, ALX-804-190), se lavó y luego se incubó con estreptavidina Alexa Fluor 488 y antirrata IgG Alexa Fluor 594.

5 Resultados

Reparación de lesión muscular mediante célula de tallo mesenquimal derivada del tejido adiposo humano pretratado con agonista gamma.

10 La experiencia descrita abajo indica que las células de tallo pretratadas con agonista de RAR γ no sólo regeneran tejido muscular en sí mismo, sino que también dan soporte a diferenciación miogénica de células anfitrión. Como tal, estas células son ahora denominadas como "pretratadas" más que células "cebadas" de tallo mesenquimal, para ser consistente con la definición aceptada del término "cebar", como es usado en la técnica para indicar el comprometer células para soportar miogénesis.

15 Para probar los efectos del pretratamiento de una célula humana de tallo mesenquimal con agonista gamma de RAR, se creó un defecto de forma redonda en el músculo tibial anterior de ratones NOD (NOD.Cg-Rag1tm1Mom Prf1tm1Sdz/Sz) como se describió anteriormente. Se trasplantaron al sitio células de tallo mesenquimal (5,000 células por sitio) derivadas de adiposo humano tratadas con RAR γ o no tratadas. Se recolectó tejido 2 semanas después de la operación y se sometieron a análisis histológico mediante tinción de Masson con tricromo, secciones del músculo trasplantado de MSC pretratado con RAR γ y músculo trasplantado de MSC de control, y también mediante detección de inmunofluorescencia de cadena pesada de miosina (MHC), antígeno de célula derivado de antihumano, y núcleo (DAPI) de músculo trasplantado de MSC pretratado con RAR γ y músculo trasplantado de MSC de control.

20 Las MSC humano pretratado con RAR γ facilitaron claramente la reparación del tejido muscular dañado. Mientras las MSCs humanas pretratadas con RAR γ contribuyeron a la regeneración de tejido muscular, las MSCs que no fueron pretratadas fueron mayormente excluidas del tejido muscular.

25 Para probar si el pretratamiento con agonista gamma de RAR es efectivo sobre diferentes tipos de células de tallo mesenquimal, se trataron células de tallo mesenquimal (Zenbio, Cat # ASC-F) derivadas del tejido adiposo humano, con CD15301 μ M o vehículo por 3 días *in vitro*, y luego se trasplantaron a un sistema de modelo de daño muscular. Se creó un defecto con forma redonda en el músculo tibial anterior de ratones NSG de 6 semana de edad (ratón gamma scid NOD, ratones Jax #005557) como se describió anteriormente (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wj/SzJ}). Se trasplantaron al sitio células de tallo mesenquimal (10,000 células por sitio) derivadas de adiposo humano tratadas con RAR γ o no tratadas. Se recolectó tejido 2 semanas después de la operación y se sometieron a análisis histológico (tinción de Masson con tricromo, secciones del músculo trasplantado de MSC cebado con RAR γ y músculo trasplantado de MSC de control, y también mediante detección de inmunofluorescencia de laminina, antígeno de célula derivado de humano, y núcleo (DAPI) de músculo trasplantado de MSC pretratado con agonista de RAR γ y músculo trasplantado de MSC de control.

35 Las MSC humanas pretratadas con RAR γ facilitaron claramente la reparación del tejido muscular dañado. Mientras se observó que las MSCs humanas pretratadas con RAR γ estaban distribuidas principalmente alrededor de las fibras del músculo, las células no tratadas fueron mayormente excluidas del tejido muscular. Estos resultados indican que el uso de células de tallo pretratadas con agonista de RAR γ tales como MSC es una terapia efectiva para la reparación del músculo y también que para esta terapia pueden usarse las células de tallo (por ejemplo MSC) de diferentes fuentes.

40 Reparación de lesión de tejido complejo (músculo + hueso) con MSCs cebadas (tratadas con agonista de RAR γ) o no cebadas

45 La lesión severa del músculo frecuentemente acompaña daños de otros tejidos tales como hueso, tendón y nervios. Usando un modelo simplificado de lesión compuesta, se examinaron MSCs tratadas con agonista de RAR γ , respecto a la focalización preferencial en tejido muscular lesionado.

50 Se creó lesión del tejido compuesto (hueso y músculo) en ratones de 2 meses de edad, cortando el peroné y tejido muscular circundante. A continuación de esto, cerca al sitio de la lesión se trasplantó una mezcla 1:1 de MSC pretratada con agonista de RAR γ y MSCs no pretratadas de control. Las MSC fueron preparadas a partir de medula del hueso de ratones que expresa GFP (pretratada) o DsRED (no tratada). Se colectaron los tejidos lesionados 1 semana después de la cirugía, se seccionaron y examinaron respecto a la distribución de MSCs pretratadas y no pretratadas, usando anticuerpos anti-GFP y anti-DsRed, respectivamente. El análisis histológico con tinción HE reveló que los tejidos de hueso y musculares lesionados estaban todavía bajo proceso de reparación. De manera llamativa, mientras la mayoría de MSCs cebadas fueron detectadas en tejido muscular, la mayoría de las células cebadas estuvieron siempre asociadas con tejido de hueso. Se observó que algunas de las MSCs pretratadas con agonista de RAR γ que expresan DsRed formaban células típicas del músculo del esqueleto con varios núcleos.

55 Se observó que las MSCs pretratadas con agonista de RAR γ y no tratadas se enfocaban en diferentes sitios de lesión

del tejido. Los resultados indican que las MSCs pretratadas con agonista de RAR γ se enfocan de manera selectiva en el tejido muscular lesionado. Las MSCs pretratadas con agonista de RAR γ serán útiles para reparar tejido muscular dañado cuando otros tejidos están dañados también. Previamente se ha reportado que la administración sistémica de agonista de RAR γ no sólo inhibe la osificación heterotópica, sino que retarda la curación de la fractura (Shimono et al., Nature Medicine 17, 454-460 (2011)). Adicionalmente, estos resultados sugieren fuertemente que el trasplante combinado de MSCs pretratadas y no tratadas, en una relación apropiada, es una terapia efectiva para lesión de tejido compuesto.

Requerimiento de señalización de RAR γ en reparación del músculo

Los resultados anteriores indican que el defecto de tejido muscular es reparado de manera deficiente en ratones nulos en RAR γ . Para confirmar adicionalmente este hallazgo, se usó otro modelo de degeneración muscular ampliamente usado. Se inyectó 1 μ g de cardiotoxina dentro de tejido muscular tibial anterior de ratones tipo silvestre y nulos en RAR γ . Dos semanas después de la inyección de cardiotoxina se colectó tejido muscular, se seccionó y examinó mediante la tinción de tricromo de Masson. Se vio que el tejido muscular inyectado con cardiotoxina era restaurado principalmente con fibras inmaduras de músculo por 2 semanas en los ratones de control de tipo silvestre. En contraste, se vio que el tejido muscular nulo en RAR γ era reparado de manera deficiente.

Aumento de regulación de señalización local de retinoide después de la lesión muscular

Se cortó o realizó cirugía placebo a músculo tibial anterior de los ratones (ratones RARE-LacZ) que reporta señalización de ácido retinoico. El tejido muscular fue colectado en los días 1, 4 o 7 y tenido con X-gal. Se observó que la actividad de reporte aumentaba 4 días después de la lesión, sugiriendo el involucramiento de esta ruta de señalización en la reparación de tejido muscular.

Se colectó ARN total de tejido muscular, a 8 horas, 2 días y 4 días, y se sometió a RT-PCR para análisis de expresión de gen relacionada con la señalización de RAR. Se vio que la expresión de ALDH2, la última enzima limitante que produce RA a partir de su precursor, tenía aumento de regulación 4 días después de la lesión, retornando a los niveles normales de expresión el día 11. En contraste, se vio que Cyp26b1 (Cyp26B), la enzima que degrada RA tenía un aumento transitorio de regulación el día 2 después de la lesión. En las figuras 4 y 5 se muestran los resultados, e indican que la concentración local de RA disminuye primero y luego aumenta de manera transitoria después de la lesión del músculo.

Efecto de los tiempos de tratamiento sobre la reparación de tejido muscular

Se crearon defectos de músculo, como se describió anteriormente. Los ratones fueron tratados con agonista de RAR γ (CD1530) los días 1-3 o días 5-7. Los cuadros muestran la tinción con HE de los tejidos musculares de 4 semanas después de la lesión. Los defectos del músculo en controles no tratados fueron reemplazados de manera importante con tejido graso y fibroso. El tratamiento del día 1-3 con agonista de RAR γ disminuyó la formación de tejido adiposo y fibroso de cicatriz, pero dejó un defecto parcial. En contraste, los defectos del músculo fueron llenados completamente con fibras de músculo generadas de nuevo en el grupo de tratamiento del día 5-7. Así, los tiempos de tratamiento son muy importantes para la mejor y más rápida reparación del tejido muscular. La señalización de RAR γ debería mejorar cuando aumenta la señal de retinoide endógeno. El régimen de tratamiento sugerido es administración local o sistémica de agonista de RAR γ el día 5 y 7 después de la lesión del músculo. Puede lograrse mejora adicional de los tiempos de tratamiento exacto, midiendo la concentración local de ácido retinoico mediante LS/MS/MS.

Se crearon defectos de músculo como se describió anteriormente. A los ratones se suministraron 100 ng de agonista de RAR γ (CD1530) cada dos días durante el periodo de días 1-5, días 5-9, y días 1-9. El grupo de ratones del día 1-5 recibió CD1530 los días 1, 3 y 5. El grupo del día 5-9 recibió CD1530 los días 5, 7 y 9. El grupo del día 1-9 recibió CD1530 los días 1, 3, 5, 7 y 9. Luego se compararon los músculos con tejido de músculo lesionado tratado con vehículo así como tejido de músculo intacto (músculo no lesionado). Se examinó la tinción HE del tejido del músculo a 4 semanas después de la lesión. Se observó que los defectos del músculo en el control no tratado fueron reemplazados de manera importante con tejido graso y fibroso (vehículo). El tratamiento con agonista de RAR γ del día 1-5 o 1-9 disminuyó la formación de tejido adiposo y fibroso de cicatriz, pero dejó una gran hendidura. La calidad y cantidad de tejido muscular formado de nuevo fueron mejores en el grupo de tratamiento de día 5-9, que tuvo una hendidura muy reducida.

Análisis histomorfométrico del tejido muscular lesionado

Se tiñeron con tricromo de Masson secciones de tejido en serie en el sitio de reparación, y se analizaron para cuantificar las cantidades relativas de tejidos de músculo, adiposo y fibroso en áreas definidas por el software ImagePro, como se describió. En la figura 6 se muestran los resultados. El análisis de imagen confirmó que, entre todos los grupos lesionados, el grupo de tejido muscular tratado del día 5-9 contiene la mínima cantidad de tejido adiposo y fibroso. Esto indica que los tiempos de tratamiento son muy importantes para la más rápida y mejor reparación de tejido muscular y que se obtienen los estados más benéficos cuando la señalización de RAR γ es mejorada terapéuticamente (por ejemplo, mediante administración de un agonista de RAR γ) en el momento de señalización retinoide endógena incrementada, y no antes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agonista de receptor gamma de ácido retinoico (RAR γ) para uso en la reparación o regeneración del músculo en un sujeto, en el que el uso comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva del agonista de receptor gamma de ácido retinoico (RAR γ) a un sujeto con tejido muscular dañado, para reparar o regenerar de ese modo el tejido muscular dañado.
2. El agonista de RAR γ para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha administración es local o sistémica.
3. El agonista de RAR γ para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la administración:
- comienza durante un periodo de tiempo de señalización retinoide endógena incrementada en el sujeto, resultante del compromiso del tejido muscular dañado;
 - 10 - comienza con posterioridad a 3 días después del compromiso del tejido muscular dañado por el sujeto;
 - comienza aproximadamente 4 días después del compromiso del tejido muscular dañado por el sujeto;
 - comienza aproximadamente 5 días después del compromiso del tejido muscular dañado por el sujeto;
 - comienza aproximadamente 6 días después del compromiso del tejido muscular dañado por el sujeto;
 - 15 - comienza aproximadamente 7 días después del compromiso del tejido muscular dañado por el sujeto;
 - comienza aproximadamente 5 días, y continúa hasta por lo menos el día 7 después del compromiso del tejido muscular dañado por el sujeto; y/o
 - continúa hasta por lo menos el día 9 después del compromiso del tejido muscular dañado por el sujeto.
4. El agonista de RAR γ para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el tejido muscular dañado es un resultado de una miopatía.
- 20 5. El agonista de RAR γ para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la miopatía es una miopatía inflamatoria.
6. El agonista de RAR γ para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la miopatía es miositis ossificans.
7. El agonista de RAR γ para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la miopatía es distrofia muscular.
8. El agonista de RAR γ para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el sujeto tiene un daño en un músculo del esqueleto.
- 25 9. Un agonista de receptor gamma de ácido retinoico (RAR γ) para uso en la reducción de daño de tejido muscular en un sujeto con una miopatía por daño muscular, en el que el uso comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva del agonista de RAR γ a dicho sujeto, para reducir de ese modo dicho daño de tejido muscular.
- 30 10. El agonista de RAR γ para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el sujeto tiene daño de músculo del esqueleto.
11. El agonista de RAR γ para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la miopatía por daño muscular es una miopatía inflamatoria.
12. El agonista de RAR γ para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la miopatía por daño muscular es miositis ossificans.
- 35 13. El agonista de RAR γ para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la miopatía por daño muscular es una distrofia muscular.
14. El agonista de RAR γ para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que comprende además la administración de un agente antiinflamatorio al sujeto.
- 40 15. El agonista de RAR γ para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que (i) el agonista de RAR γ es un agonista selectivo de RAR γ ; (ii) el agonista de RAR γ es un agonista selectivo de RAR γ/β ; (iii) el agonista de RAR γ tiene por lo menos 5 veces más afinidad de enlace por el receptor de RAR γ respecto al receptor de RAR α ; o (iv) el agonista de RAR γ tiene por lo menos a 10 veces mayor afinidad de enlace por receptores de RAR γ , respecto a los receptores de RAR α .
- 45 16. El agonista de RAR γ para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el músculo lesionado es el resultado de lesión física o accidente, enfermedad, infección, uso excesivo, pérdida de circulación sanguínea o atrofia o desgaste muscular y/o en el que el tejido muscular lesionado es músculo distrófico o un músculo envejecido.
17. El agonista de RAR γ para uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el sujeto tiene miositis ossificans.
- 50 18. El agonista de RAR γ para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que el agonista de RAR γ es seleccionado de entre el grupo que consiste en CD-271 (ácido 6-(4-metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-

- ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1³.7]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico); CD-1530 (ácido 4-(6-hidroxi-7-triciclo[3.3.1.1³.7]dec-1-il-2-naftalenil)benzoico); CD-2247; palovaroteno (ácido 4-[(1E)-2-[5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetrametil-3-(1H-pirazol-1-ilmetil)-2-naftalenil]-etenil]benzoico); BMS-270394 (ácido 3-fluoro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahydro-naftalen-2-il)-acetilamino]benzoico); BMS-189961 (ácido 3-fluoro-4-[2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahydro-naftalen-2-il)-acetilamino]benzoico); CH-55 (ácido 4-[(E)-3-(3,5-di-tert-butil-fenil)-3-oxo-propenil]benzoico); ácido 6-[3-(adamantan-1-il)-4-(prop-2-iniloxi)fenil]naftaleno-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftaleno-2-il)propenil]tiofeno-2-carboxílico; y enantiómeros, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 5
19. El agonista de RAR γ para uso de la reivindicación 18, en el que el agonista de RAR γ es ácido 4-[(1E)-2-[5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetrametil-3-(1H-pirazol-1-ilmetil)-2-naftalenil]-etenil]benzoico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 10

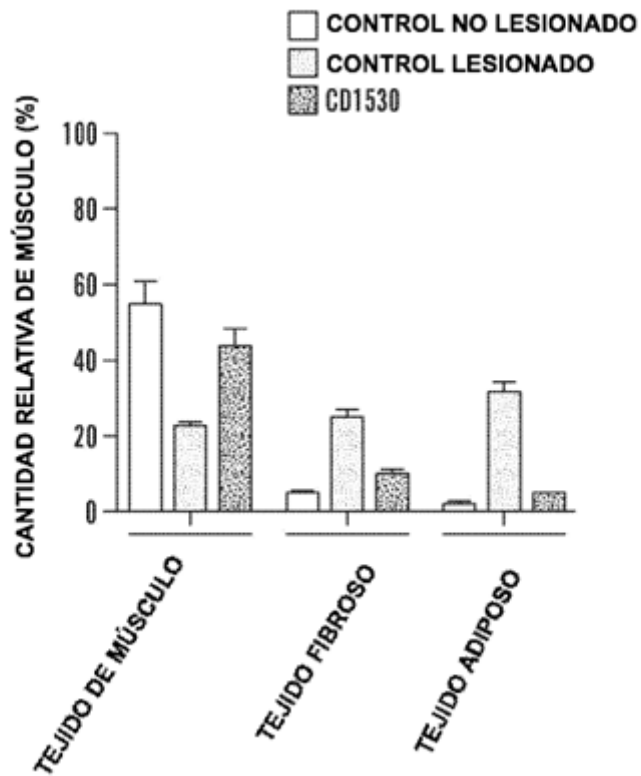


FIG. 1

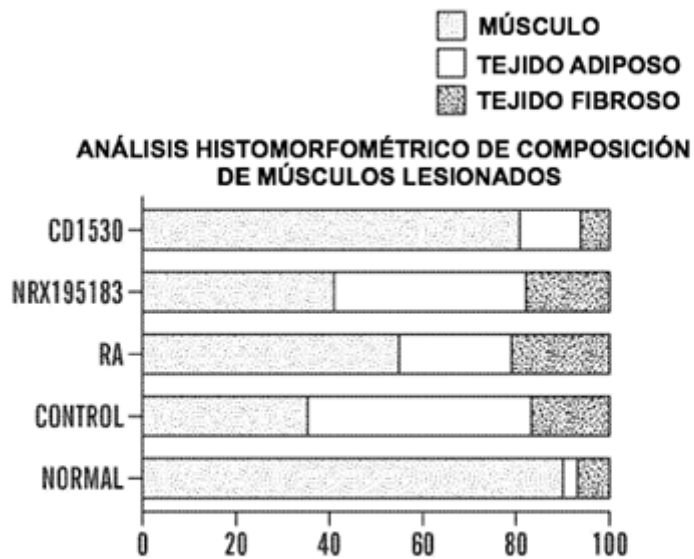
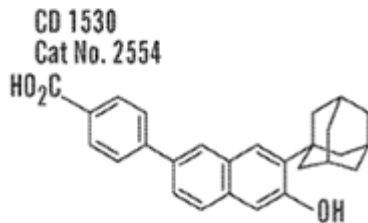
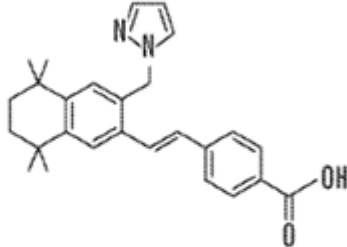


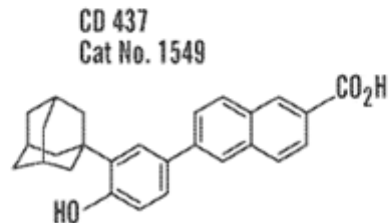
FIG. 2

PALOVAROTENO

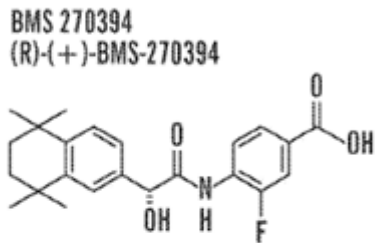
NOMBRE QUÍMICO: Ácido 4-[(1E)-2-[5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-3-(1Hpirazol-1-ilmetil)-2-naftalenil]-etenil]-benzoico



NOMBRE QUÍMICO: Ácido 4-(6-hidroxi-7-triciclo[3.3.1.13,7]dec-1-il-2-naftalenil)benzoico



NOMBRE ALTERNATIVO: AHPN
NOMBRE QUÍMICO: Ácido 6-(4-hidroxi-3-triciclo[3.3.1.13,7]dec-1-ilfenil)-2-naftalenocarboxílico



CAS 262433-54-5
C23H26FN04 MW 399.47

**BMS270394 FUE COMPRADO DE AXON.
CD437 Y CD1530 FUERON COMPRADOS DE TOCRIS EEUU
PALOVAROTENO (R667) FUE COMPRADO DE QUÍMICOS ATOMAX CO., LTD.**

FIG. 3

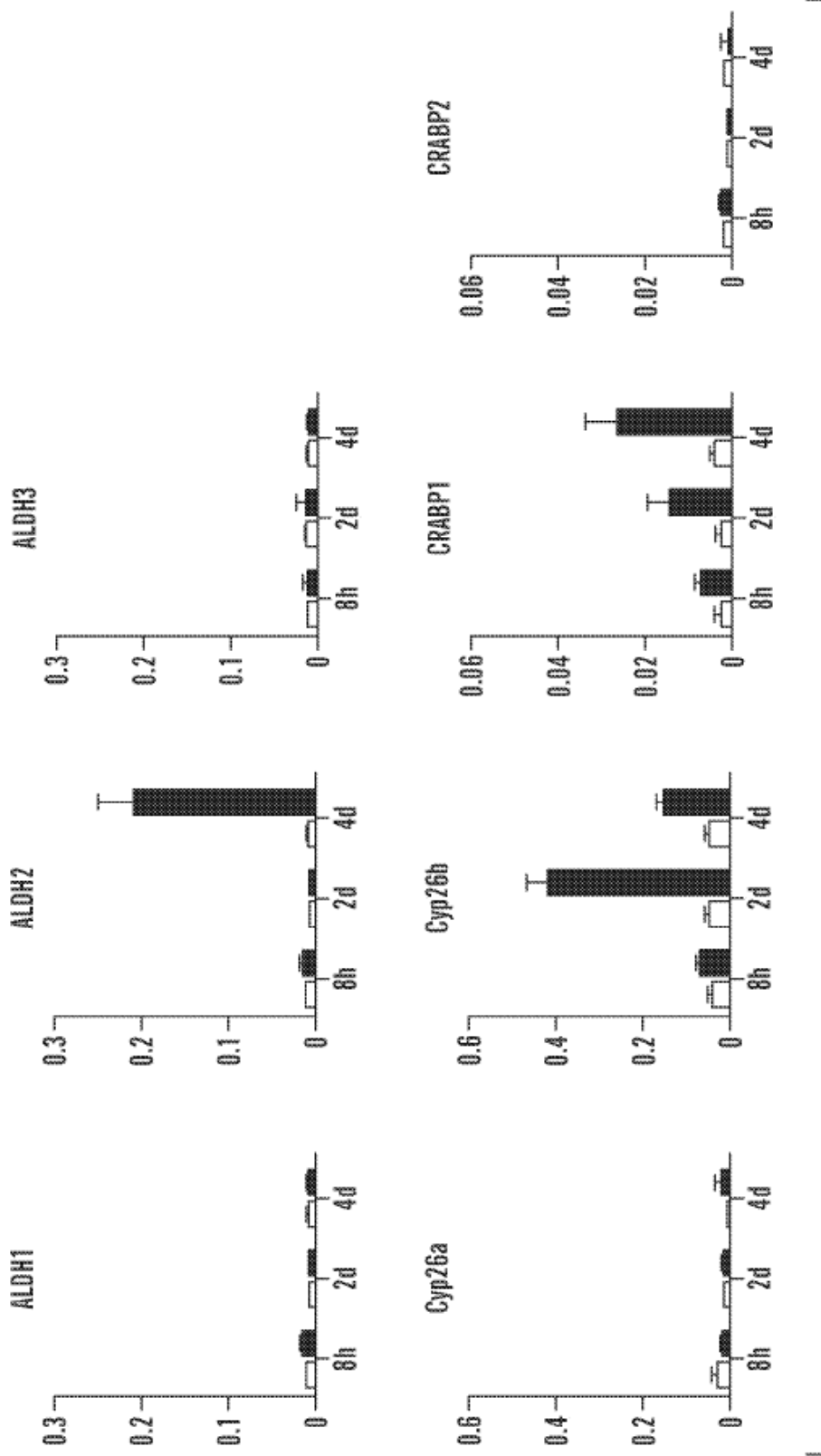


FIG. 4

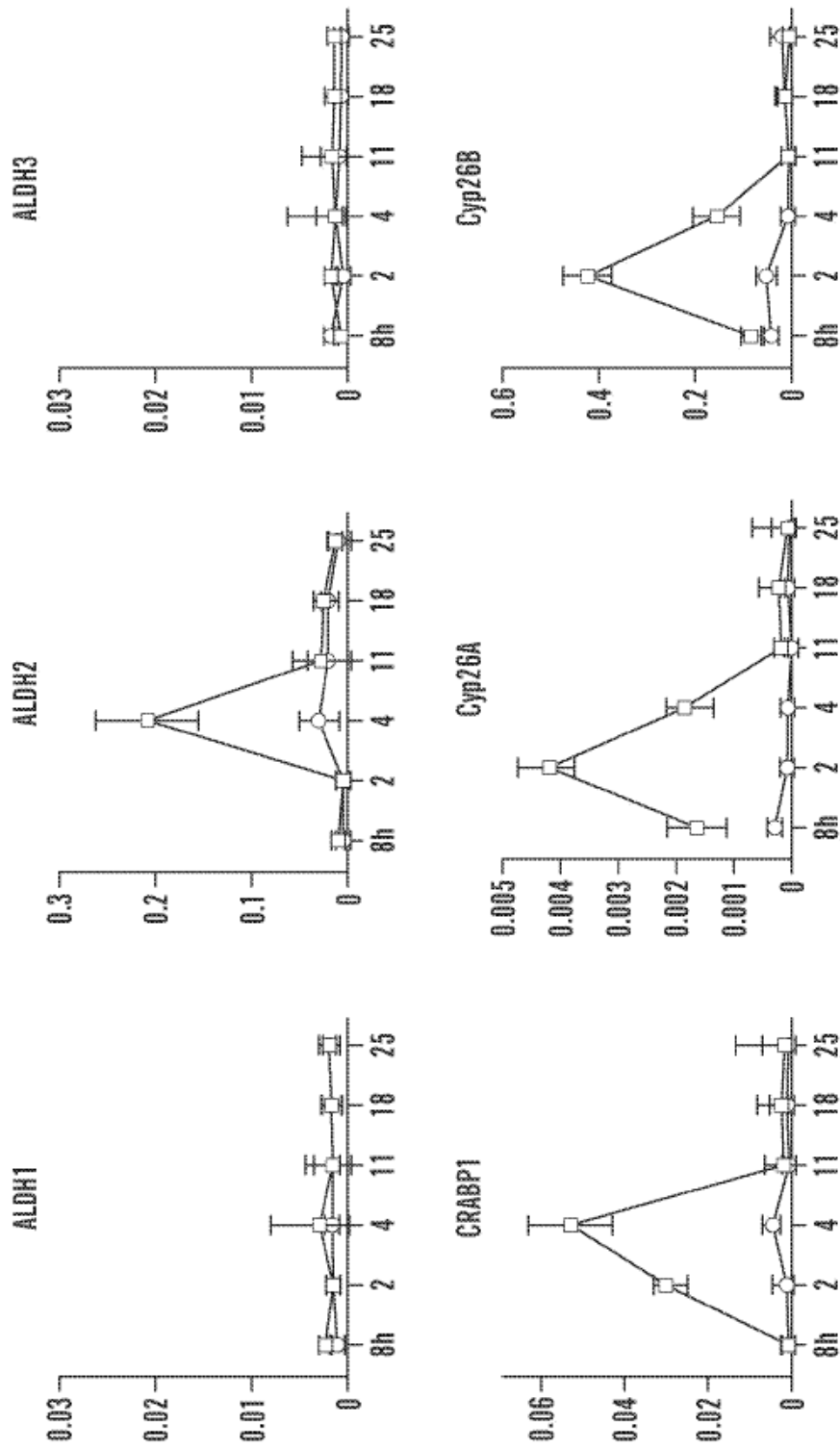


FIG. 5

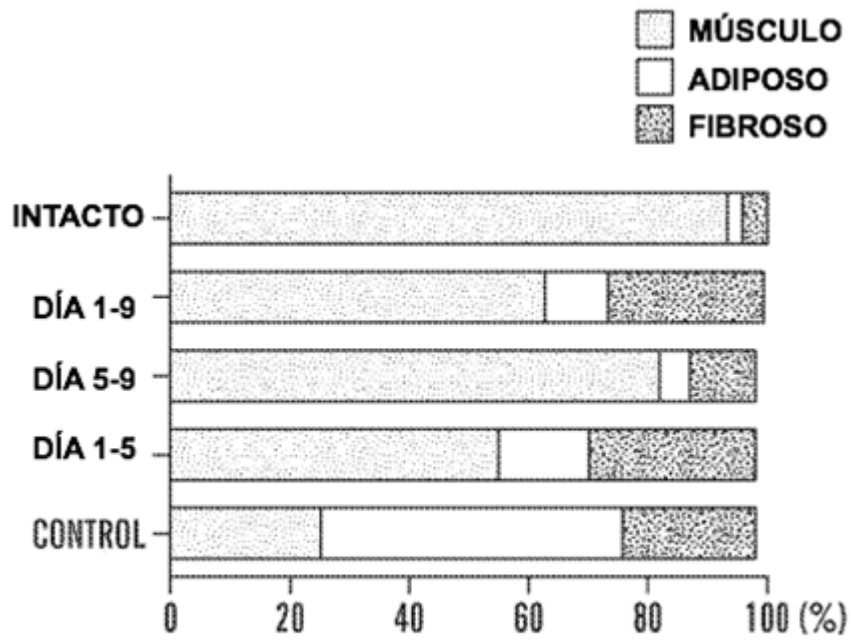


FIG. 6