



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-044010- -00000-0000

Fecha: 2013-03-05 15:11:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 76

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: COMPOSICIÓN Y MÉTODO PARA LA REPARACIÓN Y REGENERACIÓN MUSCULAR

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K 31/19

71. SOLICITANTE: THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY

DOMICILIO: Pennsylvania, Estados Unidos de América

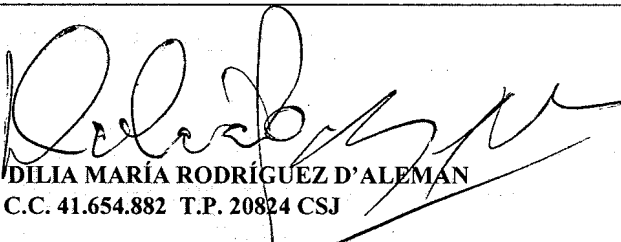
74. APODERADO DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C.

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO No. 13-044010- -00000-0000 Fecha: 2013-03-05 15:11:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 76
---	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2011/049905	Fecha 31 de Agosto de 2011
Publicación Internacional No.		WO 2012/030919 A3	Fecha 08 de Marzo de 2012
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
COMPOSICIÓN Y MÉTODO PARA LA REPARACIÓN Y REGENERACIÓN MUSCULAR			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) A61K 31/19		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY			TIPO
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN: 1020 Walnut Street Philadelphia, No. TELÉFONO:			
CIUDAD: Pennsylvania 19107, CORREO ELECTRONICO:			
PAÍS DE RESIDENCIA: Estados Unidos de América LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Estados Unidos de América			
7	INVENTOR (ES)		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1.IWAMOTO,		Masahiro	Japonés
2.PACIFICI,		Maurizio	Estadounidense
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
DIRECCIÓN		CIUDAD	ESTADO
1.613 Radnor Valley Drive		Villanova,	Pennsylvania 19085,
2. 440 South Broad Street		Philadelphia,	Pennsylvania 19146
PAÍS RESIDENCIA			
Estados Unidos de América			
Estados Unidos de América			
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
RODRIGUEZ D'ALEMAN		DILIA MARIA	C.C.41.654.882 T.P.20824 CSJ
DIRECCIÓN Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6		No. TELÉFONO	6181088
CIUDAD Bogotá, D.C.		CORREO ELECTRÓNICO	notificaciones@clarkemodet.com.co.
PAÍS Colombia			
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☐ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
Estados Unidos de América		US	(32) FECHA AAA/MM/DD
			2010/09/01

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	Nº 13-011004// 13-021377	Fecha 05/02/2013 04/03/2013
16	FIRMA DEL APODERADO :		
 DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN C.C. 41.654.882 T.P. 20824 CSJ			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción Nº de folios: 58		9. ☐ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones Nº Reivindicaciones: 69		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☒ Dibujos y/o figuras Nº folios: 5		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

COMPOSICIÓN Y MÉTODO PARA LA REPARACIÓN Y REGENERACIÓN MUSCULAR

SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de 35 U.S.C. § 119(e) para la Solicitud de Patente Provisional de E.U.A. de número de serie 61/378,996, presentada el 1 de Septiembre de 2010, cuyo contenido es incorporado a la presente mediante referencia en toda su integridad.

APOYO GUBERNAMENTAL

[0002] Esta invención fue realizada con el apoyo gubernamental en virtud de la subvención No. W81XWH-07-1-0212 otorgada por la Armada de los Estados Unidos de Norteamérica. El gobierno tiene ciertos derechos sobre esta invención.

CAMPO DE LA INVENCION

[0003] La presente invención se encuentra referida a métodos y composiciones para la reparación y regeneración muscular.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0004] Las lesiones en los músculos incluyen lesiones agudas a los músculos esqueléticos tales como contusiones (hematomas), laceraciones, isquemia, tensiones, y rupturas completas. Estas lesiones pueden causar un tremendo dolor y pueden incapacitar a la persona afectada, evitando que ellos sean capaces de trabajar o incluso de participar en las actividades normales de la vida diaria.

[0005] Los músculos esqueléticos pueden ser lesionados por una amplia variedad de razones que incluyen el exceso de uso, trauma, infecciones y la pérdida de la circulación sanguínea. En general, los músculos tienen una adecuada capacidad de reparación, particularmente en gente joven, pero este proceso de reparación puede no ser efectivo en personas de la tercera edad o después de repetidas rondas de exceso de uso, trauma severo u otros procesos. En tales casos, los músculos pierden función y fuerza de contracción y pueden ser reemplazados por tejido de cicatrización (tejido conectivo) por lo que pueden perder contractibilidad, causando pérdida de la función muscular. Las terapias actuales incluyen masaje, ultrasonido, administración de oxígeno hiperbárico, y tratamiento con fármacos tales como fenoterol y factor de crecimiento similar a la insulina-1. Estas terapias pueden proporcionar algunos resultados beneficiosos, pero están lejos de brindar un resultado ideal en términos de efectividad y eficiencia. Adicionalmente, las actuales

000002

terapias no se encuentran específicamente dirigidas a los mecanismos básicos de reparación y regeneración de las células musculares.

[0006] De acuerdo con esto, existe una necesidad por métodos y composiciones que puedan inducir la reparación y regeneración muscular de forma rápida y efectiva.

RESÚMEN DE LA INVENCION

[0007] En un aspecto, la invención proporciona un método para la regeneración y reparación muscular en un sujeto, en donde el método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista del receptor de ácido retinoico (RAR) a un sujeto, el cual es un sujeto que tiene el tejido muscular dañado. En algunas realizaciones, el Agonista de RAR es un agonista de RAR γ .

[0008] Un aspecto de la invención se refiere a un método de regeneración o reparación muscular en un sujeto, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista del receptor de ácido retinoico gama (RAR γ) a un sujeto con el tejido muscular lesionado, para de este modo reparar o regenerar el tejido muscular lesionado. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, la administración es local o sistémica. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, la administración se inicia durante un periodo de tiempo de incremento de la señalización del retinoide endógeno en el sujeto, lo cual resulta a partir del inicio de la lesión del tejido muscular. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, la administración se inicia a más tardar 3 días después de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular en el sujeto. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, la administración se inicia en aproximadamente 4 días después de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular en el sujeto. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, la administración se inicia en aproximadamente 5 días después de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular en el sujeto. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, la administración se inicia en aproximadamente 6 días después de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular en el sujeto. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, la administración se inicia a aproximadamente 7 días después de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular en el sujeto. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, la administración se inicia a aproximadamente 5 días, y se continúa a través de al menos 7 días luego de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular en el sujeto. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, la administración se continúa a través de al menos 9 días de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular en el sujeto. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, el agonista del RAR es seleccionado a partir del grupo que consiste de CD-271 (ácido 6-(4-Metoxi-3-

000003

tríciclo[3.3.1.13,7]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-Hidroxí-3-tríciclo[3.3.1.13,7]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); CD-1530 (ácido 4-(6-Hidroxí-7-tríciclo[3.3.1.13,7]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-hidroxí-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); BMS-189961 (ácido 3-Fluoro-4-[2-hidroxí-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]naftalen-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftalen-2-il)propenil]tiofen-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, el tejido muscular es lesionado como resultado de un accidente o lesión física, enfermedad, infección, exceso de uso, pérdida de circulación sanguínea, o pérdida o atrofia muscular. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, el tejido muscular lesionado es un músculo distrófico o un músculo envejecido. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, el tejido muscular es lesionado como resultado de la atrofia/pérdida muscular. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, el sujeto es un mamífero. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, el sujeto es un ratón. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, el sujeto es un humano. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, el método además comprende la administración de un agente anti-inflamatorio al sujeto.

[0009] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de regeneración o reparación muscular en un sujeto, que comprende la administración de células madre pluripotentes o multipotentes que han sido pre-tratadas con un agonista de RAR γ , a un sujeto en el sitio de la lesión muscular, para de este modo reparar o regenerar el músculo en el sitio. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, la lesión del músculo es una lesión de tejido compuesto. En una realización de los métodos descritos en el presente documento la lesión de tejido compuesto comprende una lesión a músculo y hueso. En una realización de los métodos descritos en el presente documento las células madre pre-tratadas son administradas en combinación con células madre no-tratadas. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, las células madre pre-tratadas y las células madre no-tratadas son administradas en una proporción de 1:1. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, las células madre pre-tratadas han sido pre-tratadas con el agonista de RAR γ por un periodo de alrededor 3 días. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, las células madre pluripotentes son células madre pluripotentes inducidas. En una realización de los métodos

000004

descritos en el presente documento, las células madre pluripotentes células madre mesenquimales. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, la administración es local. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, la administración se realiza mediante el trasplante de las células en un sujeto. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, las células madre administradas al sujeto son pluripotentes autólogas o heterólogas. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, las células madre pluripotentes son de mamífero. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, las células madre pluripotentes son de roedor. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, las células madre pluripotentes son de humano. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, el método además comprende la administración de un agente anti-inflamatorio al sujeto. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, el agonista de RAR γ es seleccionado a partir del grupo que consiste de CD-271 (ácido 6-(4-Metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-Hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); 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-inoxi)fenil]naftalen-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftalen-2-il)propenil]tiofen-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables del mismo, y combinaciones del mismo. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, la lesión del músculo es el resultado de un accidente o lesión física, enfermedad, infección, exceso de uso, pérdida de circulación sanguínea, o pérdida o atrofia muscular. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, el tejido muscular lesionado es un músculo distrófico o un músculo envejecido. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, la lesión muscular es el resultado de la atrofia/envejecimiento muscular.

[0010] Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la inducción o estimulación de diferenciación miogénica de células madre mesenquimales aisladas *in vitro* que comprende, contactar las células madre mesenquimales con una cantidad efectiva de un agonista del receptor de ácido retinoico γ (RAR γ). En una realización de los métodos descritos en el presente documento, el contacto se realiza por un periodo de

000005

tiempo seleccionado a partir del grupo que consiste de aproximadamente 12 horas, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, y aproximadamente 3 días.

[0011] Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la inducción o estimulación de diferenciación linaje-dirigida de una célula madre pluripotente en un linaje mesenquimal, el método comprende poner en contacto la célula madre pluripotente con una cantidad efectiva de un agonista del receptor de ácido retinoico gamma (RAR γ). En una realización de los métodos descritos en el presente documento, la célula madre pluripotente es una célula madre pluripotente inducida. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, la célula madre pluripotente es una célula madre mesenquimal. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, el linaje mesenquimal seleccionado a partir del grupo que consiste de miogénico, osteogénico, condrogénico, tendogénico, ligamentogénico, estromatogénico de la médula, adipogénico, y dermogénico. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, la célula madre pluripotente es de mamífero. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, la célula madre pluripotente es de roedor. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, la célula madre pluripotente es de humano. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, el agonista de RAR γ es seleccionado a partir del grupo que consiste de CD-271 (ácido 6-(4-Metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-Hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); 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-inoxi)fenil]naftalen-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftalen-2-il)propenil]tiofen-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables del mismo, y combinaciones del mismo.

[0012] Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende células madre mesenquimales en donde una porción de las células madre mesenquimales ha sido pre-tratada mediante contacto con un agonista de RAR γ para de este modo generar células madre mesenquimales pre-tratadas. En una realización de las composiciones descritas en el presente documento, la porción de las células madre mesenquimales pre-tratadas es seleccionada a partir del grupo que consiste de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, y 90%.

000006

[0013] Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende una población de células madre pluripotentes, en donde al menos una célula de la población fue contactada con un agonista de RAR γ para de este modo generar una célula madre pluripotente pre-tratada. En una realización de las composiciones descritas en el presente documento, la célula madre pluripotente es una célula pluripotente inducida. En una realización de las composiciones descritas en el presente documento, la célula madre pluripotente es una célula madre mesenquimal. En una realización de las composiciones descritas en el presente documento, la célula madre es una célula madre aislada. En una realización de las composiciones descritas en el presente documento, la célula madre es de mamífero. En una realización de las composiciones descritas en el presente documento, la célula madre es de murino. En una realización de las composiciones descritas en el presente documento, la célula madre es de humano. En una realización de las composiciones descritas en el presente documento, el agonista de RAR γ es seleccionado a partir del grupo que consiste de CD-271 (ácido 6-(4-Metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-Hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); 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-butilfenil)-3-oxo-propenil]-benzoico); ácido 6-[3-(adamantan-1-il)-4-(prop-2-iniloxi)fenil]naftalen-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftalen-2-il)propenil]tiofen-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables del mismo, y combinaciones del mismo.

[0014] En otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una población de células madre pluripotentes descritas en el presente documento y un transportador farmacéuticamente aceptable.

[0015] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para la reparación o regeneración del músculo, que comprende al menos uno de un agonista de RAR γ , un Agonista de RAR γ y una célula madre, o una composición que comprende una célula madre, descrita en el presente documento. En una realización de los kits descritos en el presente documento, la célula madre es una célula madre pluripotente inducida. En una realización de los kits descritos en el presente documento, la célula madre es una célula madre mesenquimal. En una realización de los kits descritos en el presente documento, el agonista de RAR γ es formulado en una composición farmacéutica. En una realización de los kits descritos en el presente documento, el agonista de RAR γ es formulado para la aplicación

000007

tópica. En una realización de los kits descritos en el presente documento, la célula madre es una célula madre aislada. En una realización de los kits descritos en el presente documento, la célula madre es de mamífero. En una realización de los kits descritos en el presente documento, la célula madre es de roedor. En una realización de los kits descritos en el presente documento, la célula madre es de humano. En una realización de los kits descritos en el presente documento, el agonista de RAR γ es seleccionado a partir del grupo que consiste de CD-271 (ácido 6-(4-Metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-Hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); 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-butilfenil)-3-oxo-propenil]-benzoico); ácido 6-[3-(adamantan-1-il)-4-(prop-2-iniloxi)fenil]naftalen-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftalen-2-il)propenil]tiofen-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables del mismo, y combinaciones del mismo. En una realización de los kits descritos en el presente documento, el kit comprende además instrucciones para su uso.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0016] La **Figura 1** es un gráfico de barras de los datos obtenidos a partir del análisis histológico del tejido de músculo esquelético 4 semanas después de la lesión. Para evaluar y cuantificar los cambios en la estructura del tejido de músculo esquelético, se tomaron imágenes de secciones seriadas teñidas con tricrom y se usaron para determinar las cantidades relativas de fibras musculares, tejido adiposo y fibroso en múltiples áreas definidas mediante el programa ImagePro. Las áreas analizadas fueron grillas de 9 x 9 cada una (aproximadamente 3 x 3 mm) que incluyen el sitio lesionado original (2 x 2 mm). Note que la lesión muscular causa una disminución en las fibras musculares totales en el área y un incremento conjunto en los tejidos fibrosos y adiposos en el área. En contraste, el tratamiento con CD1530 restaura en gran parte la composición del tejido.

[0017] La **Figura 2** es una representación gráfica de los datos obtenidos a partir del análisis histomorfométrico de la composición del músculo lesionado.

[0018] La **Figura 3** indica nombres y estructuras químicas de algunos agonistas de RAR γ ejemplificados.

000008

[0019] La **Figura 4** es una serie de gráficos de barras con datos provenientes a partir de los datos experimentales que indican que la concentración local de RA disminuye primero y después se incrementa de forma pasajera luego de la lesión muscular.

[0020] La **Figura 5** es una serie de gráficos de líneas con datos provenientes a partir de los datos experimentales que indican que la concentración local de RA disminuye primero y después se incrementa de forma pasajera luego de la lesión muscular.

[0021] La **Figura 6** es un gráfico de barras de los datos obtenidos a partir del análisis histológico del tejido de músculo esquelético 4 semanas después de la lesión luego de los tiempos de tratamiento indicados con agonista de RAR γ . En el gráfico, el segmento lleno de la izquierda indica un músculo. El segmento en el lado derecho de este, el cual es mostrado como abierto (blanco) indica tejido adiposo. El segmento al lado derecho de este, relleno, indica tejido fibroso.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0022] Aspectos de la invención relacionados a las características de las células madres progenitoras pueden ser inducidos al someterse a la diferenciación muscular mediante la exposición aguda o crónica al agonista del receptor de ácido retinoico gamma (RAR γ)s. De acuerdo con esto, En un aspecto, la invención se proporciona un método para la reparación o regeneración del tejido muscular lesionado de un sujeto, en donde el método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista del receptor de ácido retinoico (RAR) a un sujeto, el cual es un sujeto que tiene el tejido muscular dañado.

[0023] Tal como se usa en el presente documento, el término “tejido muscular lesionado” se refiere a un tejido muscular, tal como un músculo esquelético o cardíaco que ha sido alterado mediante por ejemplo un accidente o lesión física, enfermedad, infección, exceso de uso, pérdida de circulación sanguínea, o mediante factores genéticos o ambientales. El tejido muscular lesionado puede ser un músculo distrófico o un músculo envejecido. Ejemplos de síntomas de daño muscular incluyen, pero no están limitados a, hinchazón, hematomas o enrojecimiento, cortes abiertos como consecuencia de una lesión, dolor en reposo, dolor cuando se usa un músculo específico o la articulación relacionada con el músculo, debilidad del músculo o los tendones, incapacidad para utilizar el músculo.

[0024] En algunas realizaciones de este u otros aspectos de la invención, el tejido muscular es lesionado como resultado de la atrofia/pérdida muscular. En algunas realizaciones de este u otros aspectos de la invención, el tejido muscular es lesionado como resultado de una lesión física.

[0025] En algunas realizaciones de este u otros aspectos de la invención, el músculo lesionado es músculo esquelético.

000009

[0026] En algunas realizaciones de este u otros aspectos de la invención, la enfermedad que resulta en el tejido muscular lesionado es una miopatía. Sin ninguna limitación, la miopatía puede ser una miopatía congénita o una miopatía adquirida. Ejemplos de miopatías incluyen, pero no están limitados a, distrofias, miotonía (neuromitonía), miopatías congénitas (por ejemplo, miopatía mesalina, miopatía multi/mininúcleo, miopatía centronuclear (o miopatía miotubular)), miopatías mitocondriales, parálisis periódica familiar, miopatías inflamatorias, miopatías metabólicas (por ejemplo, enfermedad del almacenamiento de glicógeno y desordenes del almacenamiento de lípidos), dermatomiositis, polimiositis con inclusiones de cuerpos miosíticos, miositis osificante, rhabdomiolisis y mioglobinurias.

[0027] En algunas realizaciones de este u otros aspectos de la invención, la miopatía es una distrofia seleccionada a partir del grupo que consistió en distrofia muscular, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia de los reflejos simpáticos, distrofia Retinal, distrofia de los Conos, distrofia Miotónica, distrofia de la córnea, y cualquier combinación de los mismos.

[0028] Sin que se desee hacer alguna relación con alguna teoría, los métodos descritos en el presente documento reducen y/o inhiben la formación de tejidos similares a las cicatrices en el tejido muscular lesionado. De acuerdo con esto, en algunas realizaciones, la formación de tejidos similares a las cicatrices en el tejido muscular lesionado es reducida en al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o 100% (reducción completa) con relación a un nivel de referencia.

[0029] En algunas realizaciones, la cantidad de tejido adiposo y/o tejido conectivo en el tejido muscular lesionado es reducida en al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o 100% (reducción completa) con relación a un nivel de referencia.

[0030] De nuevo, sin que se desee hacer alguna relación con alguna teoría, los métodos descritos en el presente documento llevan a un incremento en la cantidad de cadena pesada de miosina (MHC) en el tejido muscular lesionado. De acuerdo con esto, en algunas realizaciones la cantidad de cadena pesada de miosina (MHC) en el tejido muscular lesionado es incrementado en al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60 %, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90 %, al menos, 1 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, o 100 veces o más, con relación a un nivel de referencia.

[0031] De forma adicional, los métodos descritos en el presente documento incrementan el número de células MHC positivas elongadas similares a células musculares. De acuerdo

000010

con esto, en algunas realizaciones, el número de células MHC positivas elongadas similares a células musculares en el tejido muscular lesionado es incrementado en al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60 %, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90 %, al menos, 1 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, o 100 veces o más, con relación a un nivel de referencia.

[0032] Como se discute en la presente descripción, las células madre progenitoras pueden ser inducidas o estimuladas para ser sometidas a diferenciación muscular mediante la exposición aguda o crónica al agonista del receptor de ácido retinoico gamma (RAR γ). De acuerdo con esto, se observa un incremento en los factores miogénicos regulatorios. Los factores miogénicos regulatorios son factores de transcripción básico-hélice-giro-hélice (bHLH) que regulan la miogénesis. Ver por ejemplo, Perry, R. & Rudnick, M. (2000). "Molecular mechanisms regulating miogenic determination and differentiation", *Front Biosci* 5: D750–67 (2000), cuyo contenido es incorporado a la presente descripción por referencia. Ejemplos de los factores miogénicos regulatorios incluyen, pero no están limitados a, MyoD (Myf3), Myf5, miogenina, y MRF4 (Myf6). MyoD es uno de los primeros marcadores de compromiso miogénico. MyoD es expresado en células satélite activadas, pero no en células satélite quiescentes. Aunque el MyoD marca el compromiso mioblastico, el desarrollo muscular no es dramáticamente disminuido en ratones mutantes que han perdido el gen de MyoD. Esto es posible debido a la redundancia funcional de Myf5.

[0033] De acuerdo con esto, en algunas realizaciones, el nivel de al menos un factor regulatorio miogénico en el tejido muscular lesionado se incrementa en al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60 %, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90 %, al menos, 1 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, o 100 veces o más, con relación a un nivel de referencia.

[0034] En algunas realizaciones, la cantidad de al menos una laminina en el tejido muscular lesionado es incrementado en al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60 %, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90 %, al menos, 1 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, o 100 veces o más, con relación a un nivel de referencia.

Agonistas del receptor de ácido retinoico (RAR)

[0035] Tal como se usa en el presente documento, el término "Agonista de RAR" es cualquier compuesto que es capaz de transactivar cualquiera de los receptores del ácido retinoico con una ED₅₀ de menos de 1000 nM, menos de 500 nM, menos de 250 nM, menos de 200 nM, menos de 100 nM, menos de 50 nM, menos de 25 nM, menos de 20 nM, menos de 10 nM, menos de 1 nM, menos de 0.1 nM, menos de 0.01 nM, o menos de 0.001 nM.

000011

[0036] Los receptores de retinoides son clasificados en dos familias, los receptores del ácido retinoico (RARs) y los receptores del retinoide X (RXRs), donde cada uno de los cuales consiste en tres subtipos distintos α , β , y γ . Cada subtipo de la familia de genes RAR codifican un número variable de isoformas que aparecen mediante splicing diferencial de los dos principales transcritos de ARN. Todos los ácidos retinoicos trans (ATRA) y sus otros análogos retinoidales que se encuentran en la naturaleza (ácido retinoico 9-cis, todos los ácidos retinoicos trans didehidro 3-4, ácido retinoico 4-oxo y retinol) son compuestos regulatorios pleiotróficos que se enlazan con los receptores retinoides. Por ejemplo, el ATRA se enlaza con aproximadamente la misma afinidad a todos los tres subtipos de RAR, pero no se enlaza a los receptores RXR. En su lugar, para estos receptores, el ácido retinoico 9-cis es el ligando natural.

[0037] Tal como se usa en el presente documento, el término “transactivación” se refiere a la capacidad de un agonista de RAR para activar la transcripción de un gen en donde la transcripción del gen es iniciada mediante el enlace de un ligando a receptores particulares del ácido retinoico que están siendo validados, es decir, RAR α , RAR β , o RAR γ . La determinación de la capacidad de un compuesto para transactivar un receptor de ácido retinoico puede ser llevado a cabo mediante métodos conocidos para aquellas personas versadas en el arte. Ejemplos de tales métodos se encuentran 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), cuyo contenido de ambos es incorporado a la presente descripción mediante referencia..

[0038] En algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente descripción, el agonista de RAR es un agonista selectivo RAR γ . Tal como se usa en el presente documento, el término “Agonista selectivo RAR γ ” se refiere a un compuesto que es capaz de enlazarse selectivamente al receptor RAR γ y promover la activación de RAR γ . De forma general, el agonista selectivo RAR γ se enlazará al receptor RAR γ a concentraciones significativamente menores que para los receptores RAR α y RAR β . Por ejemplo, un agonista selectivo de RAR γ se enlazará al receptor 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 a los receptores RAR α y RAR β .

[0039] La selectividad como un agonista de RAR γ de un compuesto puede ser determinada mediante ensayos de rutina de unión a ligando los cuales son conocidos para una persona normalmente versada en el arte tal como se describe 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, cuyo contenido es incorporado a la presente descripción en toda su integridad.

000012

[0040] En algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente descripción, el agonista de RARes un Agonista selectivo RAR γ/β . Tal como se usa en el presente documento, el término “Agonista selectivo RAR γ/β ” se refiere a un compuesto que selectivamente se une a los receptores RAR γ y RAR β , promoviendo la activación de ambos RAR γ y RAR β y evita la activación de los receptores RAR α .

[0041] En algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente descripción, el agonista de RARes un agonista de RAR que es al menos gama selectivo y es inactivo frente a RAR α . Tal como se usa en el presente documento, el término “Agonista de RAR que es al menos gama selectivo y es inactivo frente a RAR α ” se refiere a un compuesto que es selectivo para RAR γ o selectivo para RAR γ/β .

[0042] En algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente descripción, el agonista de RARes un pan agonista de RAR. Tal como se usa en el presente documento, el término “pan agonista de RAR” se refiere a un compuesto que se enlaza a los receptores RAR α , RAR β , y RAR γ s con una afinidad similar, promoviendo la activación de RAR α , RAR β , y RAR γ .

[0043] Ejemplos de agonista de RARs incluyen, pero no están limitados a, CD-271 (ácido 6-(4-Metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-Hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); 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-inoxi)fenil]naftalen-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftalen-2-il)propenil]tiofen-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

[0044] Otros agonistas de RARs comprendidos dentro de la presente invención son descritos, por ejemplo, en la patente de E.U.A 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; Solicitud de patente internacional con el número de publicación WO1997/037648, No. WO2007/068579, y No. WO2007/068580; Solicitud de patente francesa. FR2739557 publicada el 11 de abril de 1997; y la publicación de patente japonesa No. 62/053981, cuyos contenidos son incorporados a la presente descripción mediante referencia en toda su integridad. Además el agonista de RARs comprendido dentro de la presente invención incluye a 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), cuyo contenido es incorporado a la presente descripción en toda su integridad.

Sales farmacéuticamente aceptables

[0045] Tal como se usa en el presente documento, el término “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a las sales no-tóxicas convencionales o sales de amonio cuaternario de un agonista de RARs, por ejemplo, a partir de ácidos no tóxicos orgánicos o inorgánicos. Estas sales pueden ser preparadas *in situ* en el vehículo de administración, o el proceso de fabricación de la forma de dosificación, o haciendo reaccionar de forma independiente un agonista purificado de RAR en la forma de su base libre o ácida con un ácido o base orgánico o inorgánico adecuado, y aislando la sal formada de este modo mediante una subsecuente purificación. Las sales convencionales no-tóxicas incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos tales como el ácido sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico, y aquellos que son similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como el acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, palmítico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumarico, toluenosulfónico, etansulfónico, metanedisulfónico, oxálico, isotiónico, los que son similares. Ver, Por ejemplo, Berge et al., “Pharmaceutical Salts”, *J. Pharm. Sci.* 66:1-19 (1977), cuyo contenido es incorporado a la presente descripción por referencia en toda su integridad.

[0046] En algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente descripción, las sales representativas incluyen hidrobromuro, hidrocloruro, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, succinato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato, y laurilsulfonate sales y similares.

Profármacos

[0047] Tal como se usa en el presente documento, un “profármaco” se refiere a compuestos que pueden ser convertidos a través de algunos procesos químicos o fisiológicos (por ejemplo, procesos enzimáticos o hidrólisis metabólica) a un agonista de RAR. De este modo, el término “profármaco” también se refiere a un precursor de un compuesto biológicamente activo que es farmacéuticamente aceptable. Un profármaco puede ser inactivo cuando se administra a un sujeto, es decir, un éster, pero *in vivo* es convertido a un compuesto activo, por ejemplo, mediante hidrólisis a un ácido carboxílico libre o un hidroxil libre. El compuesto profármaco a menudo ofrece ventaja de solubilidad, compatibilidad con los tejidos o eliminación retardada en un organismo. El término “profármaco” es también empleado para comprender cualquier compuesto

000012

covalentemente unido a transportadores, los cuales liberan el compuesto activo *in vivo* cuando tal profármaco es administrado a un sujeto. Los profármacos de un compuesto activo pueden ser preparados mediante modificaciones funcionales de los grupos presentes en el compuesto activo de tal modo que las modificaciones son eliminadas, ya sea mediante la manipulación de rutina o *in vivo*, para dar lugar al compuesto activo parental. Los profármacos incluyen compuestos en donde un grupo hidroxilo, amino o mercapto está enlazado a cualquier grupo que, cuando el profármaco del compuesto activo es administrado a un sujeto, se libera para formar el hidroxilo libre, amino libre o mercapto libre, respectivamente. Ejemplos de profármacos incluyen, pero no están limitados a, acetato, formato y derivados de benzoato de un alcohol o acetamida, formamida y derivados benzamida de un grupo amina funcional en el compuesto activo y los similares. See Harper, "Drug Latentiation" in Jucker, ed. *Progress in Drug Research* 4:221-294 (1962); Morozowich et al., "Application of Physical Organic Principles a Prodrugs Design" in E. B. Roche ed. *Design of Biopharmaceutical Properties through Prodrugs and Analogs*, APHA Acad. Pharm. Sci. 40 (1977); *Bioreversible Transportadores in Drug in Drug Design, Theory y Application*, E. B. Roche, ed., APHA Acad. Pharm. Sci. (1987); *Design of Prodrugs*, H. Bundgaard, Elsevier (1985); Wang et al. "Prodrugs approaches a the improved delivery of peptide drug" in *Curr. Pharm. Design*. 5(4):265-287 (1999); Pauletti et al. (1997) Improvement in peptide bioavailability: Peptidomimetics y Prodrugs 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.* 11:345-365; Gagnault et al. (1996) "Designing Prodrugs y Bioprecursors I. Transportador Prodrugs," *Pract. Med. Chem.* 671-696; Asgharnejad, "Improving Oral Drug Transport", in *Transport Processes in Pharmaceutical Systems*, G. L. Amidon, P. I. Lee y E. M. Topp, Eds., Marcel Dekker, p. 185-218 (2000); Balant et al., "Prodrugs for the improvement of drug absorption via different rutas de administración", *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 y applicability a improve the therapeutic effect 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 significa a 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", *Métodos Enzymol.* 112 (Drug Enzyme Targeting, Pt. A): 360-

000015

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 y Bioactivation of Di(4-acetoxy-benzyl) Metilphosphonate with Carboxyesterase," *Chem. Soc., Chem. Commun.*, 875-877 (1991); Friis y Bundgaard, "Profármacos of fosfatos y fosfonates: Novel lipophilic alfa aciloxialquiloderivados ester fosfato- o fosfonate containing drugs masking the negative charges of these groups", *Eur. J. Pharm. Sci.* 4: 49-59 (1996); Gangwar et al., "Pro-drug, molecular structure y percutaneous delivery", *Des. Biopharm. Prop. Prodrugs Analogs, [Symp.] Meeting Date 1976*, 409-21. (1977); Nathwani y Wood, "Penicillins: a current review of their clinical pharmacology y 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 y optimization of anti-HIV nucleoside analogs and Prodrugs: A review of their cellular pharmacology, structure-activity relationships y 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 Borchardt, "Prodrugs strategies a 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 infección", *Adv. Drug Delivery Rev.*: 39(1-3):63-80 (1999); Waller et al., "Prodrugs", *Br. J. Clin. Pharmac.* 28: 497-507 (1989), cuyo contenido es incorporado a la presente descripción en toda su integridad.

Composiciones Farmacéuticas

[0048] Para la administración a un sujeto, el agonista de RARs puede ser proporcionado in composiciones farmacéuticamente aceptables. Estas composiciones farmacéuticamente aceptables comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más de los agonistas de RARs, formulado junto con uno o más transportadores farmacéuticamente aceptables (aditivos) y/o diluyentes. Como se describe en detalle más adelante, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser especialmente formuladas para la administración en forma sólida o líquida, incluyendo aquellas adaptadas para lo siguiente: (1) administración oral, por ejemplo, brebajes (soluciones acuosas o no acuosas suspensiones), sondas, pastillas, grageas, capsulas, píldoras, comprimidos (por ejemplo, aquellos con un objetivo de absorción bucal, sublingual, y sistémica), bolos, polvos, gránulos, pastas para ser aplicadas en la lengua; (2) administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural, por ejemplo, una solución estéril suspensión, o formulación de liberación sostenida; (3)

000016

aplicación tópica, por ejemplo, como una crema, ungüento, o un parche de liberación controlada aplicada sobre la piel; (4) intravaginalmente o intrarectalmente, Por ejemplo, como un supositorio, crema o espuma; (5) sublingualmente; (6) ocularmente; (7) transdermalmente; (8) transmucosalmente; o (9) nasalmente. De forma adicional, los compuestos pueden ser implantados dentro de un paciente o inyectados usando un sistema de aplicación del fármaco. Ver, Por ejemplo, Urquhart, et al., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24: 199-236 (1984); Lewis, ed. "Controlled Release of Pesticides y Pharmaceuticals" (Plenum Press, New York, 1981); Patente de E.U.A No. 3,773,919; y Patente de E.U.A No. 3,270,960, cuyo contenido es incorporado a la presente descripción en toda su integridad.

[0049] Tal como se usa aquí, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación las cuales son, dentro del ámbito del juicio médico, adecuadas para ser usadas en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin una excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, evaluado con una tasa de beneficio/riesgo apropiado.

[0050] Tal como se usa aquí, el término "transportador farmacéuticamente aceptable" significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente, ayuda de fabricación (por ejemplo, lubricante, talco de magnesio, estearato de calcio o zinc, o ácido estérico), o material de encapsulación de solventes, involucrado en portar o transportar el compuesto desde un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano, o porción del cuerpo. Cada transportador debe ser "aceptable" en el sentido de que es compatible con otros ingredientes de la formulación y no son dañinos para el paciente. Algunos ejemplos de materiales, los cuales pueden servir como transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sucrosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de papa; (3) celulosa, y sus derivados, tales como carboximetil celulosa de sodio, metilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina y acetato de celulosa; (4) 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 mantequilla de cocoa y supositorios de cera; (9) aceites, tales como aceite de nuez, aceite de semilla de algodón, aceites florales, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soya; (10) glicoles, tales como el propileno glicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietileno glicol (PEG); (12) ésteres, tales como etil oleato y etil laurato; (13) agar; (14) agentes de tampón, 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) alcohol etílico; (20) soluciones de tamponamiento del pH; (21) poliésteres, policarbonates

000017

y/opolianhidruros; (22) agentes de relleno, tales como polipeptidos y amino ácidos (23) componentes del suero, tales como albúmina sérica, HDL y LDL; (22) alcoholes C₂-C₁₂, tales como etanol; y (23) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas. También pueden estar presentes en la formulación agentes humectantes, agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de cobertura, agentes endulzantes, agentes aromatizantes, agentes de perfume, preservantes y antioxidantes. Los términos tales como “excipiente”, “transportador”, “transportador farmacéuticamente aceptable” o los similares son usados de forma intercambiable en el presente documento.

[0051] La frase “cantidad efectiva” tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de un principio activo (por ejemplo, un Agonista de RAR γ) en una cantidad suficiente para producir el cambio o efecto deseado (por ejemplo, cebación de la célula madre mesenquimal a través de la diferenciación miogénica *in vitro*).

[0052] La frase “cantidad terapéuticamente efectiva” tal como se usa en el presente documento significa que la cantidad de un compuesto, material, o composición que comprende un agonista de RAR, el cual es efectivo para producir alguno de los efectos terapéuticos deseados en al menos una sub-población de células en un animal en una proporción riesgo/beneficio razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Por ejemplo, una cantidad de un agonista RAR γ administrado a un sujeto que es suficiente para producir una reparación o regeneración muscular estadísticamente significativa.

[0053] Tal como se usa en el presente documento, el término “reparar” se refiere a un proceso por el cual los daños de un tejido muscular son aliviados o completamente eliminados. En algunas realizaciones, al menos un síntoma del daño al tejido muscular es aliviado en al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, o al menos 50%. Los síntomas del daño muscular son descritos, por ejemplo, en “Skeletal Muscular and Repair” Tiidus, P.M., ed., Human Kinetics (2008), cuyo contenido es incorporado a la presente descripción por referencia.

[0054] La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva se encuentra dentro de las habilidades de aquellas personas versadas en el arte. De forma general, una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar con la historia del sujeto, edad, condición, sexo, así como también la severidad y tipo de la condición médica en el sujeto, y la administración de otros principios activos farmacéuticamente aceptables.

[0055] Tal como se usa en el presente documento, el término “administrar” se refiere a la colocación de una composición en un sujeto mediante un método o ruta la cual resulta en al menos la localización parcial de la composición en un sitio deseado de tal modo que se produce el efecto deseado. Las rutas de administración adecuadas para los métodos de la invención incluyen tanto la administración local como sistémica. De forma general, administración local conlleva a más Agonista de RAR (o células tratadas con agonistas de RAR)

siendo aplicadas a un lugar en específico en lugar que a todo el cuerpo del sujeto, mientras que la administración sistémica, resulta en una aplicación de un agonista de RAR (o células tratadas agonistas de RAR) para esencialmente el cuerpo entero del sujeto. Un método de administración locales mediante inyección intramuscular.

[0056] En el contexto de la administración de una célula tratada con un agonista de RAR, el término “administración” también incluye el trasplante de tal célula en un sujeto. Tal como se usa en el presente documento, el término “trasplante” se refiere al proceso de implantación o transferencia de al menos una célula en un sujeto. El término “trasplante” incluye, por ejemplo, autotrasplante (remoción y transferencia de célula(s) desde un lugar en un paciente al mismo u otro lugar en el mismo paciente), alotrasplante (trasplante entre miembros de la misma especie), y xenotrasplante (trasplante entre miembros de diferentes especies). Las personas normalmente versadas en la materia reconocerán que los métodos para la implantación o trasplante de células madre mesenquimales para la reparación y regeneración muscular, se encuentran comprendidos dentro de la presente invención. Ver por ejemplo, Patente de E.U.A No. 7,592,174 y Publicación de patente de E.U.A. 2005/0249731, cuyo contenido de ambos es incorporado a la presente descripción mediante referencia.

[0057] Además el agonista de RAR puede ser formulado en la forma de ungüentos, cremas, polvos, u otras formulaciones adecuadas para formulaciones tópicas. Debido al peso molecular del agonista de RARs, que es de forma general menos de 500 daltons, estas formulaciones pueden ser aplicadas desde la piel o tejido muscular profundo. De acuerdo con esto, tales formulaciones pueden comprender uno o más agentes que potencian la penetración del ingrediente activo a través de la piel. Para la aplicación tópica, el agonista de RAR puede ser incluido en los apósitos de las heridas y/o composiciones que recubren la piel.

[0058] Un compuesto o composición tal como se ha descrito en el presente documento puede ser administrado mediante cualquier ruta apropiada conocida en el arte incluyendo, pero no limitándose a, las rutas oral o parenteral, incluyendo la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, transversal, en las vías aéreas (aerosol), pulmonar, nasal, rectal, y tópica (incluyendo bucal y sublingual).

[0059] Ejemplos de modos de administración incluyen, pero no están limitados a, inyección, infusión, instilación, inhalación, o ingestión. “Inyección” incluye, sin ninguna limitación la inyección e infusión, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intra-tecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradermal, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, sub capsular, subaracnoidea, intraspinal, intracerebro-espinal, y intrasternal. En realizaciones preferidas de los aspectos

000019

descritos en la presente descripción, las composiciones son administradas mediante infusión o inyección intravenosa.

[0060] Tal como se usa en el presente documento, a “sujeto” significa un humano o animal. Usualmente el animal es un vertebrado tal como un primate, roedor, animal doméstico o un animal de deportes. Los primates incluyendo a los chimpancés, monos cynomologous, monos araña, y macacos, por ejemplo, Rhesus. Los roedores incluyen ratones, ratas, marmotas, hurones, conejos y hámster. Los animales domésticos y de deportes incluyen vacas, caballos, cerdos, alces, bisontes, búfalos, especies de felino, por ejemplo, gato doméstico, especies de caninos, por ejemplo, perro, zorro, lobo; especies de aves, por ejemplo, pollo, emú, avestruz, y peces, por ejemplo, trucha, bagre y salmón. El paciente o sujeto incluye cualquier subconjunto de los anteriores, por ejemplo, todos los anteriores, pero excluyendo a uno o más grupos o especies tales como humanos, primates o roedores. En ciertas realizaciones de los aspectos descritos en la presente descripción, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un primate, por ejemplo, un humano. Los términos, “paciente” y “sujeto” son usados en el presente documento de forma intercambiable. Un sujeto puede ser hombre o mujer.

[0061] Preferiblemente el sujeto es un mamífero. El mamífero puede ser un humano, un primate no-humano, ratón, rata, perro, gato, caballo, o vaca, pero no están limitados a estos ejemplos. Los mamíferos diferentes a los humanos pueden ser usados de forma ventajosa como sujetos que representan modelos animales de desórdenes asociados con una enfermedad autoinmune inflamación. Adicionalmente, los métodos y composiciones descritos en el presente documento pueden ser usados para tratar animales domésticos y/o mascotas.

[0062] Un sujeto puede ser uno quien previamente ha sido diagnosticado con o identificado con un padecimiento desde o teniendo o tener un desorden caracterizado por daños muscular o atrofia/perdida muscular.

[0063] Un sujeto puede ser uno quien en la actualidad no está siendo tratado con un Agonista de RAR.

[0064] A sujeto puede ser uno quien ha sido previamente diagnosticado con una enfermedad que está siendo tratada con un régimen terapéutico que comprende un agonista de RAR, en donde la enfermedad no es una enfermedad caracterizada con un daño muscular o atrofia/perdida muscular.

[0065] De acuerdo con esto, en algunas realizaciones, el método de tratamiento comprende ajustar el régimen terapéutico del sujeto de tal modo que al menos un síntoma del daño muscular es reducido. Sin ninguna limitación, un régimen terapéutico puede ser ajustado mediante la modulación de la frecuencia de administración del RAR y/o mediante la alteración del sitio o modo de administración.

000020

[0066] En algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente descripción, el método además comprende diagnosticar a un sujeto en cuanto al daño muscular o atrofia/perdida muscular antes de tratar al sujeto para la regeneración o reparación muscular.

[0067] En algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente descripción, el método además comprende seleccionar sujeto con daño muscular o atrofia/perdida muscular antes de tratar al sujeto para la regeneración o reparación muscular.

Terapia de combinación

[0068] En algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente descripción, el agonista de RAR es administrado al sujeto junto con una terapia seleccionada a partir de masaje, ultrasonido, administración de oxígeno hiperbárico. Adicionalmente, y/o alternativamente, el agonista de RAR puede ser administrado a un sujeto en combinación con un principio activo farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de compuestos activos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitados a, aquellos indicados en *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 13th Edition, Eds. T.R. Harrison *et al.* McGraw-Hill N.Y., NY; Physicians Desk Reference, 50th Edition, 1997, Oradell New Jersey, Medical Economics Co.; Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th Edition, Goodman y Gilman, 1990; Farmacopea de Estados Unidos, El listado Nacional de Formulaciones, USP XII NF XVII, 1990; la actual edición de Goodman y Oilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*; la actual edición de *The Merck Index*, cuyo contenido completo es incorporado al presente documento en toda su integridad.

[0069] En algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente descripción, el principio activo farmacéuticamente aceptable incluye aquellos agentes conocidos en el arte para el tratamiento de la inflamación o de los trastornos asociados a la inflamación, o infecciones. Ejemplos de agentes anti-inflamatorios incluyen, pero no están limitados a, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs - tales como aspirina, ibuprofeno, o naproxeno, corticosteroides (tales como prednisona), medicamentos anti-maláricos (tales como hidrocloroquina), metotrexato, sulfasalazina, leflunomida, medicamentos anti-TNF, ciclofosfamida y micofenolato.

[0070] En algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente descripción, el principio activo farmacéuticamente aceptable es un factor de crecimiento. Ejemplos de factores de crecimiento incluyen, pero no están limitados a, factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), FGF-1, FGF-2, FGF-4, timosinas, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de unión a insulina (IGF), IGF-1, IGF-2, factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento de transformación (TGF), TGF- α ., TGF- β ., factores inductores de cartílago -A y -B, factores inductores osteoideos, osteogénina, proteínas morfogénicas de hueso, y otros factores de crecimiento de hueso,

000021

factores de crecimiento de colágeno, factores de crecimiento de unión a heparina -1 o -2, y sus derivados biológicamente activos.

[0071] En algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente descripción, el principio activo farmacéuticamente aceptable es un agente anti interferón. Sin ninguna limitación, los agentes anti-interferón incluyen anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos anti-interferón. Ejemplos de anticuerpos anti-interferón incluyen, pero no están limitados a, 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 interferón-alpha/beta-inducible genes y downstream effect in a phase I trial of an anti-interferón-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 U S A* 106, 5294-9 (2009), aquellos descritos en las Patentes de E.U.A. No 4,902,618; No. 5,055,289; No. 7,087,726; y No. 7, 741,449, y aquellos descritos en las Publicaciones de Patente de E.U.A. No. 10/440,202; No. 11/342/020; y No. 12/517,334, cuyo contenido es incorporado a la presente descripción en toda su integridad.

[0072] En algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente descripción, el principio activo farmacéuticamente aceptable es fenoterol o factor de crecimiento similar a la insulina-1.

[0073] El agonista de RAR y el principio activo farmacéuticamente aceptable puede ser administrado al sujeto en la misma composición farmacéutica o en diferentes composiciones farmacéuticas (al mismo tiempo o en tiempos diferentes). Cuando se administra en tiempos diferentes, el agonista de RAR y el principio activo farmacéuticamente aceptable 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 administración del otro. Cuando el agonista de RAR y el principio activo farmacéuticamente aceptable son administrados en diferentes composiciones farmacéuticas, las rutas de administración pueden ser diferentes.

Dosis

[0074] La cantidad de agonista de RAR que puede ser combinado con un material transportador para producir una sola forma de dosificación será forma general aquella cantidad de agonista de RAR que produce un efecto terapéutico. De forma general será expresada en porcentaje, esta cantidad será aproximadamente de 0.01% a 99% de agonista de RAR, preferiblemente desde aproximadamente 5% a aproximadamente 70%, más preferiblemente desde 10% a aproximadamente 30%.

[0075] La toxicidad y la eficacia terapéutica puede ser determinada mediante procedimientos terapéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, la determinación de la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la

000022

DE50 (la dosis terapéutica efectiva en el 50% de la población). La proporción de dosis entre la que produce toxicidad y la que produce efecto terapéuticos es el índice terapéutico y este puede ser expresado como el cociente de LD50/ED50. Se prefieren las composiciones que muestran grandes índices terapéuticos.

[0076] Tal como se usa en el presente documento, el término DE indica la dosis efectiva y es usada en relación con modelos animales. El término EC indica la concentración efectiva y es usada en relación con modelos *in vitro*.

[0077] Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivo celular y animales de estudio pueden ser usados en la formulación de un rango de dosificación para uso en humanos. La dosis de tales compuestos preferiblemente se encuentra dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluye el DE50 con poca o sin toxicidad. La dosis puede ser ajustada dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada.

[0078] La dosis terapéuticamente efectiva puede ser estimada inicialmente a partir de los ensayos de cultivo celular. Una dosis puede ser formulada en modelos animales para alcanzar un rango de concentración circulante en plasma que incluye el IC50 (es decir, la concentración de agente terapéutico la cual alcanza la mitad de la máxima inhibición de los síntomas) tal como se determina en los ensayos de cultivo celular. Los niveles plasmáticos pueden ser medidos, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta performance. Los efectos de cualquier dosis en particular pueden ser monitoreados mediante un bioensayo adecuado.

[0079] La dosis puede ser determinada por un médico y puede ser ajustada, tanto como sea necesario, para adaptarse a los efectos observados del tratamiento. De forma general, las composiciones son administradas de tal modo que el agonista de RAR γ es dado a la dosis que va desde 1 $\mu\text{g/kg}$ a 150 mg/kg, 1 $\mu\text{g/kg}$ a 100 mg/kg, 1 $\mu\text{g/kg}$ a 50 mg/kg, 1 $\mu\text{g/kg}$ a 20 mg/kg, 1 $\mu\text{g/kg}$ a 10 mg/kg, 1 $\mu\text{g/kg}$ a 1 mg/kg, 100 $\mu\text{g/kg}$ a 100 mg/kg, 100 $\mu\text{g/kg}$ a 50 mg/kg, 100 $\mu\text{g/kg}$ a 20 mg/kg, 100 $\mu\text{g/kg}$ a 10 mg/kg, 100 $\mu\text{g/kg}$ 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. Se entiende que los rangos dados en el presente documento incluyen a todos los rangos intermedios, por ejemplo, el rango 1 mg/kg a 10 mg/kg incluye 1 mg/kg a 2 mg/kg, 1 mg/kg a 3 mg/kg, 1 mg/kg a 4 mg/kg, 1 mg/kg a 5 mg/kg, 1 mg/kg a 6 mg/kg, 1 mg/kg a 7 mg/kg, 1 mg/kg a 8 mg/kg, 1 mg/kg a 9 mg/kg, 2 mg/kg a 10 mg/kg, 3 mg/kg a 10 mg/kg, 4 mg/kg a 10 mg/kg, 5 mg/kg a 10 mg/kg, 6 mg/kg a 10 mg/kg, 7 mg/kg a 10 mg/kg, 8 mg/kg a 10 mg/kg, 9 mg/kg a 10 mg/kg, y los similares. Se entiende además que los rangos intermedios dados anteriormente también se encuentran dentro del ámbito de esta invención. Por ejemplo, en el rango de 1 mg/kg a 10

000023

mg/kg, se encuentran comprendidos los rangos de dosis tales como 2mg/kg a 8 mg/kg, 3mg/kg a 7 mg/kg, 4mg/kg a 6mg/kg, y los similares.

[0080] En algunas realizaciones, las composiciones son administradas a una dosis tal que el agonista de RAR o un metabolito del mismo tiene una concentración *in vivo* de menos de 500nM, menos de 400nM, menos de 300 nM, menos de 250 nM, menos de 200 nM, menos de 150 nM, menos de 100 nM, menos de 50 nM, menos de 25 nM, menos de 20, nM, menos de 10 nM, menos de 5nM, menos de 1 nM, menos de 0.5 nM, menos de 0.1nM, menos de 0.05, menos de 0.01, nM, menos de 0.005 nM, menos de 0.001 nM luego de 15 mins, 30 mins, 1 hr, 1.5 hrs, 2 hrs, 2.5 hrs, 3 hrs, 4 hrs, 5 hrs, 6 hrs, 7 hrs, 8 hrs, 9 hrs, 10 hrs, 11 hrs, 12 hrs o más de tiempo de administración.

[0081] Con respecto a la duración y frecuencia del tratamiento, es típico que los médicos clínicos versados en el campo monitoreen a los sujetos con el fin de determinar cuando el tratamiento está proporcionando beneficio terapéutico, y para determinar si se efectúa un incremento o disminución de dosis, incremento o disminución de la frecuencia de administración, interrupción del tratamiento, reanudación del tratamiento u otros cambios al régimen de tratamiento. El esquema de dosificación puede ser variado desde una vez a la semana a diariamente dependiendo de un número de factores clínicos, tales como la sensibilidad del sujeto al agonista de RAR. La dosis deseada puede ser administrada todos los días o cada tres, cuatro, cinco, o seis días. La dosis deseada puede ser administrada en un solo momento o puede ser dividida en sub-dosis, por ejemplo, 2-4 subdosis y se administran a través de un periodo de tiempo, por ejemplo, a intervalos apropiados a través del día u otro esquema apropiado. Tales subdosis pueden ser administradas como formas unitarias de dosificación. En algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente descripción, la administración crónica, por ejemplo, uno o más dosis diarias a través de un periodo de semanas o meses. Ejemplos de esquemas de dosificación son la administración diaria, dos veces al día, tres veces al día o cuatro o más veces al día a través de un periodo de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, o 6 meses o más.

[0082] En una realización, la administración del agonista de RAR al sujeto, de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento es de una o más veces. En una realización, una administración por una sola vez, o una administración por un conjunto de veces, se dan dentro de un periodo de tiempo de un incremento detectable de la señalización del retinoide endógeno, lo cual ocurre de forma natural *in vivo* en respuesta al daño (por ejemplo, la ocurrencia de un trauma o cambio fisiológico que conlleve a un daño muscular) a un tejido muscular (por ejemplo, luego de 4 días o 5 días luego de la ocurrencia del daño). En una realización, la administración incluye una sola vez que es al inicio del periodo de tiempo. En una realización, la administración incluye varias veces que están dentro

000024

del periodo de tiempo. En una realización, la administración al o incluye el tiempo que está después del periodo de tiempo que es mayor que 3 días después de la ocurrencia del daño. En una realización, la administración al o incluye el tiempo que es aproximadamente 4 días después de la ocurrencia del daño. En una realización, la administración al o incluye el tiempo que es aproximadamente 5 días después de la ocurrencia del daño. En una realización, la administración al o incluye el tiempo que es aproximadamente 6 días después de la ocurrencia del daño. En una realización, la administración al o incluye el tiempo que es aproximadamente 7, o aproximadamente 8 días después de la ocurrencia del daño. Combinaciones de estos tiempos de administración son también previstos. Por ejemplo, la administración a aproximadamente 4 días, y luego a uno o más de 5, 6, 7, y 8 días. En una realización, la administración es a aproximadamente 5 días y 7 días. Administración continua se puede realizar a través de un periodo extendido de tiempo (por ejemplo, hasta que se obtenga una recuperación satisfactoria).

[0083] En una realización, la administración se superpone con o abarca el periodo de tiempo de incremento de la señalización del retinoide endógeno (por ejemplo, la administración comienza antes del incremento de la señalización del retinoide endógeno, y se extiende dentro/oa través de este periodo). En una realización, la administración es mantenida hasta el incremento de la señalización del retinoide endógeno en respuesta al daño sobre el tejido muscular (por ejemplo la administración comienza luego del día 3, o al día 4, 5, 6, 7, 8, o 9 o posterior). En una realización, la administración comienza luego del día 3 (por ejemplo, día 4 o 5), y se continúa a través de al menos 9 (por ejemplo, hasta el día 11). En una realización, administraciones cada día o en días intercalados durante los periodos indicados de tiempo de administración. En una realización, administraciones al menos en el día 5, 7, y 9.

Célula madres Pre-tratadas

[0084] En otro aspecto, la invención proporciona una población de células madres, en donde la población es producida mediante el contacto de al menos una célula madre con una cantidad efectiva de un agonista de RAR. Tal como se usa en el presente documento, el término "población de células madres" significa una o más células madres. Tales células madres pueden ser aisladas, (por ejemplo, por contacto *in vitro*, o *ex vivo*). Tales contactos le permiten a las células regenerar tejido muscular y también a la diferenciación miogénica de otras células (por ejemplo, células en un hospedero dentro del cual las células pre-tratadas son administradas). En una realización para poder alcanzar su capacidad, el contacto es con un agonista de RAR γ , una célula madre mesenquimal aislada. En una realización, el pre-tratamiento es *in vitro* y es por al menos aproximadamente 3 días.

000025

Aunque periodos más cortos de pre-tratamiento (por ejemplo, 2.5 días, 2 días, 1.5 días, 1 día, 12 horas) pueden también producir capacidades similares. Tales células pre-tratadas las cuales son inducidas de esta manera, son denominadas aquí como “pre-tratadas”. Todas las células pre-tratadas descritas en el presente documento se encuentran comprendidas dentro de la presente invención.

[0085] El término “puesta en contacto” o “contacto” tal como se usa en el presente documento en relación con la puesta en contacto de una célula madre incluye someter a la célula madre a medio de cultivo apropiado el cual comprende un agonista de RAR. La célula madre puede ser contactada con un agonista de RAR en el cultivo celular, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*. Tal como se usa en el presente documento, el término “*ex vivo*” se refiere a células que son extraídas de un organismo viviente y que luego son cultivadas fuera del organismo (por ejemplo, en un tubo de ensayo). Las células *ex vivo* pueden luego ser administradas luego de una modificación sobre el material donado.

[0086] En algunas realizaciones de los aspectos de la invención, la célula madre es una célula madre humana. En algunas realizaciones, la célula madre es una célula madre pluripotente o multipotente. En algunas realizaciones, la célula madre es una célula madre (iPS) inducida pluripotente, o una célula reprogramada de forma estable la cual es una célula madre pluripotente intermediaria y puede ser además reprogramada en una célula iPS, por ejemplo, células madres pluripotentes parcialmente inducidas (también denominadas como “células piPS”). En algunas realizaciones, la célula madre pluripotente, iPSC o piPSC es una célula madre pluripotente genéticamente modificada. En algunas realizaciones, la célula madre es una célula madre mesenquimal.

[0087] De forma general, una célula madre para ser usada en los métodos, ensayos, sistemas, kits y un cuadro de mandos generados puede ser obtenido o derivado a partir de cualquier fuente disponible. De acuerdo con esto, una célula madre puede ser obtenida o derivada a partir de un vertebrado o invertebrado. En algunas realizaciones de este u otros aspectos de la invención, la célula madre es una célula madre de mamífero.

[0088] En algunas realizaciones de este u otros aspectos de la invención, la célula madre es una célula madre de primate o roedor.

[0089] En algunas realizaciones de los aspectos de la invención, la célula madre es seleccionada a partir del grupo que consiste en células madre de chimpancé, mono cynomolgous, mono araña, macacos (por ejemplo mono Rhesus), ratón, rata, marmota, hurón, conejo, hámster, vaca, caballo, cerdo, alce, visón, búfalo, felino (por ejemplo, gato doméstico), canino (por ejemplo perro, zorro y lobo), ave (por ejemplo pollo, emú, y avestruz), y peces (por ejemplo, trucha, bagre y salmón).

000026

[0090] Tal como se usa en el presente documento, el término “diferenciación” tal como se usa en el presente documento se refiere al desarrollo celular de una célula a partir de un estado primitivo hacia una célula más madura (es decir, menos primitiva).

[0091] Como se usa aquí, el término “célula madre pluripotente inducida” o “iPSC” o “célula iPS” se refiere a una célula derivada a partir de una reversión *completa* de la reprogramación del estado de diferenciación de una célula diferenciada (por ejemplo a célula somática). Tal como se usa en el presente documento, una iPSC es totalmente reprogramada y es una célula la cual ha sido sometida a una reprogramación epigenética completa.

[0092] El término “reprogramación” tal como se usa en el presente documento se refiere a un proceso que altera o revierte el estado de diferenciación de una célula diferenciada (por ejemplo una célula somática). Dicho de otro modo, la reprogramación se refiere a un proceso para dirigir la diferenciación de una célula hacia atrás a un estado indiferenciado o un tipo de célula más primitivo. La reprogramación completa involucra la reversión de al menos alguno de los patrones hereditarios de modificaciones de ácido nucleico (por ejemplo, metilación), condensación de la cromatina, cambios epigenéticos, imprinting genómico, etc., que ocurre durante la diferenciación celular como en el desarrollo de un cigoto a un adulto. La reprogramación es distinta de simplemente mantener el estado existente indiferenciado de una célula que es ya pluripotente o del mantenimiento del estado existente menos totalmente indiferenciado de una célula que es ya una célula multipotente (por ejemplo, una célula madre hematopoyética). La reprogramación es también distinta de promover la autorrenovación o proliferación de células que son ya pluripotentes o multipotentes, aunque las composiciones y métodos de la invención pueden también ser usados para tales propósitos.

[0093] El término “célula reprogramada de forma estable” tal como se usa en el presente documento se refiere a una célula la cual es producida a partir de la reprogramación *parcial* o incompleta de una célula diferenciada (por ejemplo una célula somática). Una célula reprogramada de forma estable es usada de forma intercambiable en esta invención con “piPSC”. Una célula reprogramada de forma estable no ha sido sometida a una reprogramación completa y de este modo no tiene una renovación global de la epigenoma de la célula. A célula reprogramada de forma estable es una célula madre pluripotente y puede ser además reprogramada a una célula iPSC, tal como el término ha sido definido en el presente documento, o alternativamente puede ser diferenciada a diferentes linajes. En algunas realizaciones, una célula parcialmente reprogramada expresa marcadores de todas las tres capas germinales embrionarias (es decir, todas las tres capas del endodermo, mesodermo o ectodermo). Los marcadores de las células del endodermo incluyen, Gata4, FoxA2, PDX1, Nodal, Sox7 y Sox17. Los

marcadores de las células del mesodermoincluyen, Brachyury, GSC, LEF1, Mox1 y Tiel. Los marcadores de las células del ectodermo cripto1, EN1, GFAP, Islet 1, LIM1 y Nestin. En algunas realizaciones, a célula parcialmente reprogramadaes una célula no diferenciada.

[0094] El término “remodelación del epigenoma” se refiere a modificaciones químicas del genomas las cuales no cambianla secuenciagenómicao la secuencia de las pares de bases de un gen en la célula, pero alteran la expresión.

[0095] El término “remodelación global del epigenoma” se refiere alas modificaciones químicas del genomaque han ocurrido en sitios que no son memorizadosen la expresión previa del gen en la célula no diferenciada,a partir de la cual la célula reprogramada o iPSC fue derivada.

[0096] El término “remodelación incompleta del epigenoma” se refiere a las modificaciones químicasdel genomaque han ocurrido en donde no hay memoriade la expresión génica previade la célula diferenciada a partir de la cuallacélula reprogramada de forma estable o piPSC fue derivada.

[0097] El término “reprogramación epigenética” tal como se usa en el presente documentose refiere a la alteración delpatrón de expresión génicaen una célula mediantemodificaciones químicasque no cambian lasecuencia genómica o las pares de bases dela secuencia del genen la célula.

[0098] El término “epigenetico” tal como se usa en el presente documentose refiere amodificaciones químicas “sobre el genoma” o ADNque no alteranla secuencia del gen, pero que tienen impactosobre la expresión génica y tambiénpueden serheredadas. Se denomina también epigenetico, a las modificaciones postraslacionales o “PTM”sobre elADN, Por ejemplo, en el imprinting y la reprogramación celular. Estas modificaciones incluyen,por ejemplo, metilación delADN, ubiquitinación, fosforilación, glicosilación, sumoilación, acetilación, S-nitrosilación o nitrosilación, citrulinación o deiminación, nedilación, OClcNAc, ADP-ribosilación, hidroxilación, lipidificación, ufmilación, prenilación, miristoilación, S-palmitoilación, tirosino sulfación, formilación, y carboxilación.

[0099] El término “pluripotente” tal como se usa en el presente documentose refiere auna célula con la capacidad, bajo diferentes condiciones,dediferenciarseentipos celulares característicos de todas las trescapas de célula germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo). Las células pluripotentesestáncharacterizadas principalmente por su capacidad de diferenciarseen células delas tres capas germinales, usando, Por ejemplo, en un ensayo de formación de teratoma en un ratón “nude”. La pluripotencia es también evidenciada mediante la expresiónmarcadores de células madre embrionaria (ES), aunque la prueba preferida para la pluripotencia esla demostración de la capacidaddediferenciaren células

000028

de cada una de las tres capas de células germinales. En algunas realizaciones, una célula pluripotente es una célula no diferenciada.

[00100] El término “pluripotencia” o un “estado pluripotente” tal como se usa en el presente documento se refiere a una célula con la capacidad de diferenciarse en células de las tres capas germinales del embrión: endodermo (tejido intestinal), mesodermo (incluyendo sangre, músculo, y vasos), y ectodermo (tales como la piel y nervio), y típicamente tiene el potencial de dividirse *in vitro* por un largo periodo de tiempo, por ejemplo, mayor que un año o más de 30 pasajes.

[00101] El término “multipotente” cuando es usado en referencia a una “célula multipotente” se refiere a una célula que es capaz de diferenciarse en algunos pero no en todas las células derivadas de las tres capas germinales. De este modo, una célula multipotente es una célula parcialmente diferenciada. Las células multipotentes son bien conocidas en el arte, y ejemplos de células multipotentes incluyen células madres de adulto, tales como por ejemplo, células madres hematopoyéticas y células madres neurales. Multipotente significa que una célula madre puede formar varios tipos de células de una determinada línea, pero no células de otras líneas. Por ejemplo, una célula madre multipotente sanguínea puede formar los varios diferentes tipos de células sanguíneas (glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas, etc...), pero estas no pueden formar neuronas.

[00102] El término “multipotencia” se refiere a una célula con un grado de versatilidad del desarrollo que es menor que las totipotentes y pluripotentes.

[00103] El término “totipotencia” se refiere a una célula con el grado de diferenciación que describe la capacidad de hacer todas las células en el cuerpo adulto así como también los tejidos extra-embionarios que incluyen a la placenta. El huevo fertilizado (cigoto) es totipotente así como las células de los primeros clivajes (blastómeros).

[00104] El término “célula diferenciada” se entiende que representa a cualquier célula primaria que no está, en su forma nativa, pluripotente tal como se ha definido el término en el presente documento. El término una “célula diferenciada” también comprende células que están parcialmente diferenciadas, tales como las células multipotentes, o células que no son pluripotentes que están parcialmente reprogramadas. Debe de notarse que el hecho de colocar varias células primarias en cultivo puede conllevar a alguna pérdida de las características totalmente diferenciadas. De este modo, el simple cultivo de tales células está incluido en el término células diferenciadas y no hace que estas células sean no diferenciadas (por ejemplo, células no diferenciadas) o las células pluripotentes. La transición de células diferenciadas a pluripotentes requiere de un estímulo de reprogramación que va más allá del estímulo que conlleva a la pérdida parcial del carácter diferenciado en cultivo. Las células reprogramadas también tienen la característica de tener la capacidad de extenderse a través de los pasajes sin perder su potencial de crecimiento con

000029

relación a las células primarias parentales, las cuales de forma general tienen una capacidad para sólo un número limitado de divisiones en cultivo. En algunas realizaciones, el término “célula diferenciada” también se refiere a una célula de un tipo celular más especializado derivada a partir de una célula de un tipo celular menos especializado (*por ejemplo*, a partir de una célula no diferenciada o una célula reprogramada) en donde la célula ha sido sometida a un proceso de diferenciación celular.

[00105] Tal como se usa en el presente documento, el término “célula somática” se refiere a cualquier célula diferente de las células germinales, a una célula presente obtenida a partir de un embrión pre-implantacional, o una célula que proviene de la proliferación de tal célula *in vitro*. Dicho de otro modo, una célula somática se refiere a cualquier célula que forma el cuerpo de un organismo, en oposición a las células germinales. En mamíferos, la línea de células germinales (también conocida como “gametos”) son los espermatozoides y óvulos, los cuales se fusionan durante la fertilización para producir una célula denominada cigoto, a partir del cual se desarrolla el cuerpo entero del embrión del mamífero. Cada uno de los otros tipos celulares en el cuerpo del mamífero —aparte de los espermatozoides y óvulos, células a partir de las cuales son hechos (gametocitos) y células madres no diferenciadas— es una célula somática: órganos internos, piel, huesos, sangre, y tejido conectivo son todos hechos de células somáticas. En algunas realizaciones la célula somática es una “célula somática no embrionaria”, lo cual significa que es una célula somática que no está presente en ni es obtenida a partir de un embrión y no es el resultado de la proliferación de tal célula *in vitro*. En algunas realizaciones la célula somática es una “célula somática adulta”, lo cual significa que es una célula que está presente en o es obtenida a partir de un organismo diferente de un embrión o un feto o resulta a partir de la proliferación de tal célula *in vitro*. A menos que se indique de otro modo los métodos para la reprogramación de una célula diferenciada pueden ser llevados a cabo tanto *in vivo* como *in vitro* (en donde *in vivo* es realizado cuando una célula diferenciada está presente dentro de un sujeto, y donde *in vitro* es realizado usando una célula diferenciada aislada mantenida en cultivo). En algunas realizaciones, en donde se cultivan células diferenciadas o una población de células diferenciadas *in vitro*, la célula diferenciada puede ser cultivada en un sistema de cultivo de rodajas organotípicas, tales como las que se describen en, *por ejemplo*, Meneghel-Rozzo *et al.*, (2004), *Cell Tissue Res*, 316(3);295-303, el cual es incorporado al presente documento en toda su integridad mediante referencia.

[00106] Tal como se usa en el presente documento, el término “célula adulta” se refiere a una célula que se encuentra en el cuerpo luego del desarrollo embrionario.

[00107] En el contexto de la ontogenia celular, el término “diferenciado”, o “diferenciación” es un término relativo que significa una “célula diferenciada”, la cual es

000030

una célula que ha progresado desde más abajo en la vía de desarrollo desde su precursor celular. De este modo en algunas realizaciones, una célula reprogramada, tal como este término es definido en el presente documento, puede diferenciar a un precursor celular de un linaje restringido (tal como una célula madre mesodermal), la cual a su vez puede diferenciar en otros tipos de precursores celulares más abajo en la vía de desarrollo (tales como un precursor específico de tejido, Por ejemplo, un precursor de un cardiomiocito), y luego a un estado final de célula diferenciada, el cual juega un rol característico en ciertos tipos de tejidos, y puede o puede no retener la capacidad de una proliferación adicional.

[00108] El término “célula madre embrionaria” es usado para referirse a las células madre pluripotentes de la masa celular interna del blastocisto embrionario (ver las Patentes de E.U.A Nos. 5,843,780, 6,200,806, las cuales son incorporadas al presente documento mediante referencia). Tales células puede ser obtenidas de forma similar a partir de la masa celular interna del blastocisto derivado a partir de transferencia nuclear de la célula somática (ver, Por ejemplo, las Patentes de E.U.A. Nos. 5,945,577, 5,994,619, 6,235,970, los cuales son incorporados al presente documento por referencia). Las características distintivas de una célula madre embrionaria definen el fenotipo de una célula madre embrionaria. De acuerdo con esto, una célula tiene el fenotipo de una célula madre embrionaria si esta tiene una o más de las características únicas de una célula madre embrionaria tal como que la célula puede ser distinguida de otras células. Ejemplos de características distintivas de una célula madre embrionaria incluyen, sin ninguna limitación, perfil de expresión genética, capacidad de proliferación, capacidad de diferenciación, cariotipo, capacidad de respuesta a condiciones particulares de cultivo, y similares.

[00109] El término “fenotipo” se refiere a uno o un número de características biológicas totales que definen a la célula u organismo bajo un conjunto particular de condiciones medioambientales y factores, independientemente del genotipo actual.

[00110] El término “célula aislada” tal como se usa en el presente documento se refiere a una célula que ha sido obtenida a partir de un organismo en el cual se encontraba originalmente o un descendiente de tal tipo celular. Opcionalmente la célula ha sido cultivada *in vitro*, por ejemplo, en presencia de otras células. Opcionalmente la célula es luego introducida en un segundo organismo o re-introducida dentro del organismo a partir del cual está (o la célula a partir del cual está descendiendo) fue aislada.

[00111] El término “población aislada” con relación a una población aislada de células, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una población de células que ha sido extraída y separada a partir de una mezcla o una población heterogénea de células. En algunas realizaciones, una población aislada es una población sustancialmente pura de células en comparación con una población heterogénea a partir de la cual las células fueron aisladas o enriquecidas.

000031

[00112] El término “sustancialmente puro”, con relación a una población particular de células, se refiere a una población de células que es al menos aproximadamente 75%, preferiblemente al menos aproximadamente 85%, más preferiblemente al menos aproximadamente 90%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 95% pura, con relación a las células de población total. Redefiniendo, los términos “sustancialmente puro” o “esencialmente purificado”, con 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%, más preferiblemente menos de aproximadamente 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, o menos de 1%, de células que no son las células o su progenie indicada tal como es definido mediante los términos del presente documento.

[00113] Los términos “enriquecimiento” o “enriquecido” son usados de forma intercambiable en el presente documento y significan que el rendimiento (fracción) de células de un tipo es incrementado en al menos 10% sobre la fracción de células del tipo del cultivo o preparación inicial.

[00114] Los términos “renovación” o “auto-renovación” o “proliferación” son usados de forma intercambiable en el presente documento, y se refieren a un proceso mediante el cual una célula hace más copias de sí misma (por ejemplo duplicación). En algunas realizaciones, las células reprogramadas son capaces de renovarse a sí mismas mediante la división en la misma célula no diferenciada (*por ejemplo* tipos celulares pluripotentes o no-especializados) a través de largos periodos, y/o varios meses a años. En algunos casos, la proliferación se refiere a la expansión de las células reprogramadas mediante división repetida de una sola célula en dos células hijas idénticas.

[00115] El término “medio de cultivo celular” (también referido aquí como un “medio de cultivo” o “medio”) tal como es definido en el presente documento es un medio para el cultivo de células que contienen nutrientes que mantienen la viabilidad de la célula y dan sustento a la proliferación. El medio de cultivo celular puede contener cualquiera de los siguientes elementos en combinaciones apropiadas: sal(es), tampón(es), amino ácidos, glucosa u otro(s) azúcar(es), antibióticos, suero o reemplazos para el suero, y otros componentes tales como factor de crecimiento peptídico, etc. el medio de cultivo celular usado de forma ordinaria para tipos celulares particulares es conocido por aquellas personas versadas en el arte.

[00116] El término “linajes” tal como se usa en el presente documento describe una célula con un ancestro común o células con un destino de desarrollo común. A manera únicamente de ejemplo, que una célula sea de origen endodérmico o de “linaje endodermo” significa que la célula fue derivada a partir de una célula endodérmica que puede ser diferenciada a lo largo de las vías de desarrollo restringidas al linaje endodermal, tales

000032

comouna o más vías de desarrollo de linajes las cuales dan lugar a células endodermales definitivas, las cuales a su vez pueden diferenciar en células de hígado, timo, páncreas, pulmón e intestinos.

[00117] Una célula madre (por ejemplo, una célula madre aislada tal como una célula madre embrionaria aislada a partir de un sujeto) puede ser contactada con un agonista de RAR por alguna cantidad de tiempo. Por ejemplo, una célula madre puede ser contactada 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 que no implica ninguna limitación, el agonista de RARs (disuelto en etanol o DMSO) es agregado a cultivos MSC a la concentración final entre 10 nM y 3 μ M, y el volumen de la solución del agonista de RAR agregado al cultivo es de 0.1%.

[00118] Sin que se desee hacer alguna relación con alguna teoría, el poner en contacto una célula madre con un agonista de RAR induce o estimula la diferenciación linaje-dirigida de la célula madre en linajes particulares. Por ejemplo, el poner en contacto una célula madre con un agonista de RAR puede inducir o estimular la diferenciación en un linaje seleccionado a partir del grupo que consiste del linaje del mesodermo, endodermo, ectodermo, neuronal, mesenquimal, y hematopoyético.

[00119] En algunas realizaciones de este u otros aspectos de la invención, el inducido/estimulado es un linaje mesenquimal.

[00120] En algunas realizaciones, el linaje mesenquimal inducido es seleccionado a partir del grupo que consiste de miogénico, osteogénico, condrogénico, tendogénico, ligamentogénico, estromatogénico de la médula, adipogénico, y dermogénico.

[00121] Tal como se usa en el presente documento, una “célula madre mesenquimal” es una célula mesenquimal que tiene la capacidad de auto reproducirse y diferenciarse en uno o más células mesenquimales. Como una célula mesodermal, una célula madre mesenquimal pluripotente, capaz de diferenciarse en osteoblastos, células de cartílago, mioblastos, células de grasa, células del estroma, células del tendón, y similares. Mientras se auto reproducen, las células mesodermales pluripotentes pierden sus capacidades en el proceso de desarrollo, las células madre mesenquimales son conocidas porque pueden persistir por un largo periodo de tiempo en el cuerpo del adulto luego que ha pasado por el desarrollo.

[00122] Tal como se usa en el presente documento, las “células mesenquimales” son osteoblastos, células de cartílago, mioblastos, células de grasa, células de estroma, células de tendón y otras células que forman los tejidos mesenquimales, y células madre mesenquimales las cuales pueden diferenciar en estas. Las células mesenquimales aparecen durante la embriogénesis, células mesenquimales de individuos adultos y las células mesenquimales generadas por diferenciación a partir de células madres pluripotentes *in vitro* o *in vivo* son incluidas en el término “células mesenquimales.”

000033

[00123] La célula madre pueden convertirse o ser obtenidas a partir de cualquier fuente disponible para el médico.

[00124] Las células madre mesenquimales pueden ser obtenidas mediante varios métodos bien conocidos en el arte. Ver por ejemplo, Patentes de E.U.A No. 5,486,358; No. 6,387,367; y No. 7,592,174, y U.S. Pat App. Pub. No. 2003/0211602, cuyo contenido es incorporado a la presente descripción en toda su integridad. Las células mesenquimales pueden incluir células madre mesenquimales autólogas, es decir, una célula o células tomadas a partir de un sujeto que está en necesidad de tratamiento (es decir, el donante y el receptor son el mismo individuo). Las células madre mesenquimales autólogas tienen la ventaja de evitar cualquier rechazo de las células que este mediado por el sistema inmune. Alternativamente, las células pueden ser heterólogas, por ejemplo, tomadas a partir de un donante. El segundo sujeto puede ser de la misma especie o de una diferente. Típicamente, cuando las células provienen de un donador, ellas provienen de un donante quien es lo suficientemente inmunocompatible con el receptor, es decir, es decir no serán sometidas al rechazo del trasplante, lo cual disminuye o incluso evita la necesidad de inmunosupresión. En algunas realizaciones, las células son tomadas a partir de una fuente xenogénica, es decir, un mamífero no humano que ha sido genéticamente diseñado para ser inmunológicamente compatible, en el grado suficiente, con el receptor o la especie receptora. Métodos para la determinación de la compatibilidad inmunológica son conocidos en el arte, e incluyen la tipificación de tejido para evaluar la compatibilidad donante-receptor para los determinantes HLA y ABO. Ver, por ejemplo, *Transplante Immunology*, Bach y Auchincloss, Eds. (Wiley, John & Sons, Incorporated 1994).

[00125] En algunas realizaciones, la célula madre mesenquimal derivada a partir de una célula somática des-diferenciada (una célula reprogramada). Por ejemplo, una célula somática des-diferenciada a una célula madre pluripotente, por ejemplo mediante reprogramación directa de una célula de origen endodermal. Sin que se desee hacer vínculo con ninguna teoría, una célula des-diferenciada tiene una morfología que se asemeja a los tipos celulares más primitivos a partir de los cuales esta fue derivada, por ejemplo, morfología mesenquimal.

[00126] En algunas realizaciones, la célula madre mesenquimal es una célula madre mesenquimal re-diferenciada. Tal como se usa en el presente documento, el término "célula madre mesenquimal re-diferenciada" se refiere a una célula madre mesenquimal que es diferenciada desde una célula madre mesenquimal des-diferenciada.

[00127] En algunas realizaciones, la célula madre mesenquimal se encuentra en un estado estable, por ejemplo, cuando las células fueron tomadas a partir de un sujeto y tratadas de tal modo que permite que ellas puedan ser almacenadas por un periodo de tiempo. Por ejemplo, las células pueden ser congeladas, por ejemplo, usando métodos conocidos en el arte para el

congelamiento de células primarias, de tal modo que las células son viables cuando se descongelen. Por ejemplo, los métodos conocidos en el arte para el congelamiento y descongelamiento de embriones en mamíferos vivos pueden ser adaptados para ser usados con los actuales métodos. Tales métodos pueden incluir el uso de nitrógeno líquido, por ejemplo, con uno o más crioprotectores, por ejemplo, agentes que evitan el daño por congelamiento y descongelamiento en las células.

[00128] La población de células madre mesenquimales obtenida a partir de un sujeto o donante puede ser sustancialmente pura. La pureza de la población puede ser determinada, y manipulada, usando métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, se pueden usar métodos para la selección de células usando la activación de fluorescencia.

[00129] Sin que se desee hacer alguna relación con alguna teoría, cualquier medio adecuado de cultivo celular puede ser usado para los métodos *in vitro* o *ex vivo* de la invención. Por ejemplo, MSCs pueden ser mantenidas en medio α -MEM conteniendo 10% suero bovino fetal.

[00130] En algunas realizaciones de este u otros aspectos de la invención, la célula madre mesenquimal es una célula madre mesenquimal derivada de médula ósea (BMSC).

[00131] En algunas realizaciones de este u otros aspectos de la invención, la célula madre mesenquimal es una célula madre mesenquimal murina derivada de médula.

[00132] En algunas realizaciones de este u otros aspectos de la invención, célula madre mesenquimal es una célula madre mesenquimal humana (hMSC).

[00133] Los inventores también han descubierto que las células madre tratadas con el Agonista de RAR pueden ser usadas para la reparación o regeneración del músculo. De acuerdo con esto, en otro aspecto, la invención se proporciona un método para la regeneración y reparación muscular en un sujeto, en donde el método comprende la administración de una población de células madre a un sujeto, en donde al menos una célula en la población ha sido contactada con un agonista de RAR.

[00134] En algunas realizaciones, el método comprende los pasos de: (i) contactar al menos una célula madre con un agonista de RAR; y (ii) administrar dicha célula madre a un sujeto, el cual es un sujeto que tiene el tejido muscular dañado.

[00135] Luego de contactar al menos 1 célula madre con el agonista de RAR por el tiempo necesario, la célula madre tratada puede ser administrada de inmediato o puede ser almacenada por un periodo de tiempo antes de la administración a un sujeto. Sin que represente ninguna limitación, el periodo de tiempo puede estar en el rango de minutos a días.

[00136] El número de células madre tratadas con el agonista de RAR a ser administradas a un sujeto puede estar en el rango de una sola célula a más de 10^6 .

[00137] Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la regeneración y reparación muscular en un sujeto, en donde el método comprende la administración de

000135

una población de células madre a un sujeto, en donde una porción de las células madre está pre-tratada con un agonista de RAR γ , tal como se ha descrito en el presente documento. En una realización, la porción de las células madre pre-tratadas es de aproximadamente 50% (para proporción 1:1). Se ha observado también que el uso de poblaciones pre-tratadas de células madre con altas proporciones (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, células madre pre-tratadas: células madre no tratadas) y también con bajas proporciones (1:2, 1:3, 1:4, 1:5, células madre pre-tratadas: células madre no tratadas) es útil para el método. Por ejemplo, la porción de las células madre pre-tratadas puede ser aproximadamente de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, o 45%. La porción de las células madre pre-tratadas puede también ser de aproximadamente 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95%.

[00138] El método de regeneración o reparación muscular que comprende administrar la composición que comprende las células madre pre-tratadas y no-tratadas, a un sujeto en el sitio de la lesión muscular, para de este modo reparar o regenerar el músculo en el sitio. En una realización, la lesión es una lesión tisular compuesta. Una lesión tisular compuesta es una lesión en la cual se han dañado múltiples tejidos, y pueden incluir una lesión en uno o más de músculo, hueso, tendón, ligamento, y tejido graso. Se prevén varias combinaciones. En una realización, la lesión de tejido compuesto incluye músculo y hueso. En una realización, la lesión de tejido compuesto incluye músculo y al menos un tejido adicional (por ejemplo, ligamentos, tendones, cartílago, hueso, piel, grasa y vasos sanguíneos). En una realización, la lesión de tejido compuesto incluye músculo y al menos dos tejidos adicionales (por ejemplo, dos o más de ligamentos, tendones, cartílago, hueso, piel, grasa y vasos sanguíneos). En una realización, el tejido adicional lesionado incluye al hueso. En una realización, la lesión de tejido compuesto incluye músculo y al menos tres tejidos adicionales (por ejemplo, tres o más de ligamentos, tendones, cartílago, hueso, piel, grasa y vasos sanguíneos). En una realización, el tejido adicional lesionado incluye al hueso. En una realización, la lesión de tejido compuesto incluye músculo y al menos cuatro tejidos adicionales. En una realización, el tejido adicional lesionado incluye al hueso. Tipos adicionales de tejidos diferentes a aquellos descritos aquí también pueden ser incluidos en la lesión, en combinación con la lesión de músculo.

[00139] Como se ha discutido anteriormente, los inventores han descubierto que las células madre progenitoras pueden ser inducidas y sometidas a diferenciación muscular mediante la exposición aguda o crónica a un agonista del receptor de ácido retinoico gamma (RAR γ). De acuerdo con esto, En un aspecto, la invención se proporciona un método para la inducción o estimulación de la diferenciación linaje-dirigida de una célula madre a un solo linaje particular, el método comprende poner en contacto a una célula madre con un agonista del receptor de ácido retinoico.

000036

[00140] En algunas realizaciones, de este u otros aspectos de la invención, el linaje particulares seleccionado a partir del grupo que consiste de los linajes del mesodermo, endodermo, ectodermo, neuronal, hematopoyético, cualquier combinación de los mismos.

[00141] En algunas realizaciones de este u otros aspectos de la invención, el linaje particular es un linaje mesenquimal.

[00142] En algunas realizaciones de este u otros aspectos de la invención, el linaje mesenquimales seleccionado a partir del grupo que consiste de miogénico, osteogénico, condrogénico, tendogénico, ligamentogénico, estromatogénico de la médula, adipogénico, y dermogénico.

Kits

[00143] En otro aspecto, la invención proporciona un kit para la regeneración o reparación muscular. En algunas realizaciones, el kit comprende un agonista de RAR. En algunas realizaciones, el kit además comprende una población de células madre. El agonista de RAR puede ser pre-formulado dentro de una formulación farmacéutica para la administración o puede ser un ingrediente para la preparación dentro de una formulación farmacéutica que puede ser proporcionada en el kit.

[00144] En algunas realizaciones, el kit comprende un agonista de RAR, en donde el agonista es formulado para la aplicación tópica.

[00145] En algunas realizaciones, el kit comprende una población de células madre, en donde al menos una célula en la población ha sido pre-tratada mediante el contacto de las células con un agonista de RAR.

[00146] Adicionalmente a los componentes antes mencionados, el kit pueden incluir material informativo. El material informativo puede ser descriptivo, de instrucciones, de publicidad u otro material que describe los métodos descritos en el presente documento y/o el uso del compuesto para los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, el material informativo describe métodos para administrar la formulación a un sujeto. El kit también incluir un dispositivo de aplicación.

[00147] En una realización, el material informativo pueden incluir instrucciones para administrar la formulación de una forma adecuada, por ejemplo, en una dosis adecuada, forma de dosificación, o modo de administración (por ejemplo, una dosis, forma de dosificación, o modo de administración descrito en el presente documento). En otra realización, el material informativo pueden incluir instrucciones para identificar un sujeto adecuado, por ejemplo, un humano, por ejemplo, un humano adulto. El material informativo del kit no se encuentra limitado en su forma. En varios casos, el material informativo, por ejemplo, instrucciones, son proporcionadas de forma impresa, por ejemplo, un texto impreso, dibujos, y/o fotografías, por ejemplo, una etiqueta o una hoja impresa. Sin embargo, el material informativo puede también ser proporcionado en otros

000037

formatos, tales como Braille, material legible por computadora, grabaciones de video, o grabaciones de audio. En otra realización, el material informativo del kit es un link o información de contacto, por ejemplo, una dirección física, correo electrónica, hipervínculo, sitio web, o número de teléfono, en donde el usuario del kit podrá obtener información relevante acerca de la formulación y/o su uso en los métodos descritos en el presente documento. Por supuesto, el material informativo puede también ser proporcionado en cualquier combinación de los formatos.

[00148] En algunas realizaciones los componentes individuales de la formulación pueden ser proporcionados en un envase. Alternativamente, puede ser deseable proporcionar los componentes de la formulación de forma separada en dos o más envases, *por ejemplo*, un envase para la preparación de oligonucleótidos, y al menos otro para un transportador del compuesto. Los diferentes componentes pueden ser combinados, *por ejemplo*, de acuerdo con las instrucciones proporcionadas con el kit. Los componentes pueden ser combinados de acuerdo al método descrito en el presente documento, *por ejemplo*, para preparar y administrar una composición farmacéutica.

[00149] Adicionalmente a la formulación, la composición del kit pueden incluir otros ingredientes, tales como un solvente o tampón, un estabilizador o un preservante, y/o un segundo agente para el tratamiento de una condición o desorden descrito en el presente documento. Alternativamente, los otros ingredientes pueden ser incluidos en el kit, pero en diferentes composiciones o envases que la formulación. En tales realizaciones, el kit puede incluir instrucciones para mezclar la formulación y los otros ingredientes, o para usar el oligonucleótido junto con los otros ingredientes.

[00150] El agonista de RARs puede ser proporcionado en cualquier forma, por ejemplo, forma líquida, seca o liofilizada. Se prefiere que la formulación esté sustancialmente pura y/o estéril. Cuando la formulación es proporcionada en una solución líquida, la solución líquida es preferiblemente una solución acuosa, siendo una solución estéril acuosa la preferida. Cuando la formulación es proporcionada en forma seca, en general la reconstitución es hecha mediante la adición de un solvente adecuado. El solvente, por ejemplo, agua estéril o tampón, puede opcionalmente ser proporcionada en el kit.

[00151] En algunas realizaciones, el kit comprende envases separados, divisores o compartimentos para la formulación y material de información. Por ejemplo, la formulación puede estar contenida en una botella, vial, o jeringa, y el material informativo puede estar contenido en una bolsa o sachet de plástico. En otras realizaciones, los elementos separados del kit están contenidos dentro de un solo envase no dividido. Por ejemplo, la formulación es contenida en una botella, vial o jeringa que se encuentra junto al material informativo.

000038

[00152] En algunas realizaciones, el kit incluye un conjunto, de por ejemplo, un pack, de envases individuales, cada uno conteniendo uno o más formas unitarias de dosificación de la formulación. Por ejemplo, el kit incluye un conjunto de jeringas, ampollas, bolsas de papel, o blísteres, cada uno conteniendo solo una unidad de dosificación de la formulación. Los envases de los kits pueden ser sellados de tal forma que sean impermeables al aire y/o agua.

Definiciones

[00153] A menos que se establezca de otra manera, o sea implícito a partir del contexto, los siguientes términos y frases incluyen los significados proporcionados a continuación. A menos que específicamente se establezca de otro modo, o sea evidente a partir del contexto, los términos y frases que se indican a continuación no excluyen el significado del término o frase que ha adquirido en el arteal cual la invención pertenece. Las definiciones son proporcionadas para ayudar a la descripción de las realizaciones particulares de los aspectos descritos en la presente descripción, y no tienen la intención de limitar la invención reivindicada, debido a que el ámbito de la invención se encuentra limitada únicamente por las reivindicaciones. Asimismo, a menos que se requiera de otro modo a partir del contexto, los términos en singular incluyen el significado en plural y los términos en plural incluyen el significado en singular.

[00154] Tal como se usa en el presente documento el término “comprende” o “abarca” es usado en referencia a las composiciones, métodos, y los componentes respectivos del mismo, que son esenciales para la invención, y deja abierta la posibilidad de incluir elemento que no se han especificado, ya sea que estos sean esenciales o no.

[00155] Tal como se usa en el presente documento el término “consiste esencialmente de” se refiere a aquellos elementos requeridos para una realización determinada. El término permite la presencia de elementos adicionales que materialmente no afectan las características básicas y novedosas o funcionales de la realización de la invención.

[00156] El término “consiste de” se refiere a composiciones, métodos, y los respectivos componentes del mismo tal como se ha descrito en el presente documento, que son exclusivos de cualquier elemento no indicado en la descripción de la realización.

[00157] Los términos singulares “un,” “una,” y “el” incluyen también sus equivalentes en plural a menos que el contexto indique claramente de otro modo. De forma similar, se entiende que la palabra “o” comprende también a la palabra “y” a menos que el contexto indique claramente de otro modo.

[00158] Aunque métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento pueden ser usados en la práctica o evaluación de esta descripción, los métodos y materiales adecuados son descritos a continuación. El término “comprende”

000039

significa “incluye”. La expresión “por ejemplo” es usada en el presente documento como un indicativo de un ejemplo no limitativo.

[00159] Los términos “disminuye”, “reduce”, “reducción”, “decremento” o “inhibe” son usados en el presente documento de forma general para indicar una disminución en una cantidad estadísticamente significativa. Sin embargo, para evitar cualquier duda, “reducido”, “reducción” o “disminución” o “inhibe” significan una disminución en al menos 10% en comparación con un nivel de referencia, Por ejemplo una disminución en al menos aproximadamente 20%, o al menos aproximadamente 30%, o al menos aproximadamente 40%, o al menos aproximadamente 50%, o al menos aproximadamente 60%, o al menos aproximadamente 70%, o al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 90% o hasta e incluyendo una disminución del 100% (*por ejemplo* nivel ausente en comparación con una sustancia de referencia), o cualquier disminución entre 10-100% cuando se le compara con un nivel de referencia.

[00160] Los términos “incrementado”, “incremento” o “aumento” o “activación” son todos usados aquí de forma general indicando un incremento en una cantidad; con el fin de evitar cualquier duda, los términos “incrementado”, “incremento” o “aumento” o “activación” significa un incremento de al menos 10% cuando se le compara con un nivel de referencia, Por ejemplo un incremento de al menos aproximadamente 20%, o al menos aproximadamente 30%, o al menos aproximadamente 40%, o al menos aproximadamente 50%, o al menos aproximadamente 60%, o al menos aproximadamente 70%, o al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 90% o hasta e incluyendo un aumento de 100% o cualquier incremento entre 10-100% cuando se le compara con un nivel de referencia, o al menos un incremento aproximadamente 2 veces, o al menos aproximadamente 3 veces, o al menos aproximadamente 4 veces, o al menos aproximadamente 5 veces o al menos aproximadamente 10 veces, o cualquier incremento entre 2 veces y 10 veces o más cuando se le compara con un nivel de referencia.

[00161] El término “elevado,” significa un incremento en una cantidad estadísticamente significativa; con el fin de evitar la duda, el término “elevado” significa un incremento of al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 1 veces, al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, o al menos 10 veces o más cuando se le compara con un nivel de referencia.

[00162] El término “estadísticamente significativo” o “significativamente” se refiere a un nivel de significancia estadística y que de forma general significa dos desviaciones

000040

estándares (2SD) por encima o por debajo del nivel de referencia. El término se refiere a una evidencia estadística que es una diferencia. Esta es definida como la probabilidad de tomar una decisión de rechazar la hipótesis nula cuando actualmente la hipótesis nula es verdad. Las decisiones a menudo hechas usando el valor de p.

[00163] Tal como se usa en el presente documento, el término “*ex vivo*” se refiere a células las cuales han sido obtenidas a partir de un organismo vivo y cultivadas fuera del organismo (por ejemplo, en un tubo de ensayo).

[00164] A menos que en el presente documento se defina de otra manera, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente solicitud tendrán los significados que son comúnmente entendidos por aquellas personas normalmente versadas en la materia. Además, a menos que el contexto lo requiera de otra manera, los términos en singular incluyen el significado en plural y los términos en plural incluyen el significado de los términos en singular.

[00165] Se debe entender que esta invención no se encuentra limitada a la metodología, protocolos, y reactivos, etc. en particular, que se han descrito en el presente documento de tal modo que estos pueden variar. La terminología usada en el presente documento está destinada únicamente a describir realizaciones en particular, y no tiene la intención de limitar el ámbito de la presente invención, el cual es únicamente definido por las reivindicaciones.

[00166] Salvo en los ejemplos operativos, o donde se indique de otra manera, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción usados en el presente documento deben ser entendidos como afectados en todas las instancias por el término “aproximadamente.” El término “aproximadamente” cuando es usado para describir la presente invención, en relación con porcentajes significa $\pm 1\%$.

[00167] En un sentido, la presente invención describe composiciones, métodos, y los respectivos componente(s) de los mismos, como esenciales para la invención, dejando abierta la posibilidad de incluir elementos no especificados, esenciales o no (“comprende”). En algunas realizaciones, otros elementos pueden ser incluidos en la descripción de la composición, método o componentes respectivos de los mismos los cuales se encuentran limitados a aquellos que materialmente no afectan las características básicas y novedosas de la invención (“consisten esencialmente de”). Esto aplica por igual a los pasos dentro del método descrito así como también a las composiciones y componentes comprendidos. En otras realizaciones, las invenciones, composiciones, métodos, y componentes respectivos de los mismos, descritos en el presente documento están destinados a ser exclusivos de cualquier elemento no considerado como un elemento esencial para el componente, composición o método (“consiste de”).

000741

[00168] En la medida que no ha sido indicado, será entendido por aquellas personas normalmente versadas en la materia que cualquiera de las varias realizaciones descritas e ilustradas en el presente documento puede ser modificada de forma adicional para incorporar características mostradas en cualquier de las otras realizaciones mostradas en el presente documento.

[00169] Todas las patentes, solicitudes de patente, y publicaciones identificadas son expresamente incorporadas al presente documento mediante referencia para el propósito de describir y revelar, por ejemplo, las metodologías descritas en tales publicaciones que pueden ser usadas en conexión con la presente invención. Estas publicaciones son proporcionadas únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este sentido debe ser interpretado como una admisión de que los inventores no tienen derecho a tal divulgación previa en virtud de la invención previa o por cualquier otra razón. Todas las declaraciones como la fecha o la representación así como los contenidos de estos documentos se encuentran basados en la información disponible a los solicitantes y no constituye ninguna admisión como la exactitud de las fechas o contenidos de estos documentos.

[00170] La presente invención puede ser tal como se define en cualquiera de los siguientes párrafos numerados.

1. Un método de regeneración o reparación muscular en un sujeto, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista del receptor de ácido retinoico gama (RAR γ) a un sujeto con el tejido muscular lesionado, para de este modo reparar o regenerar el tejido muscular lesionado.
2. El método del párrafo 1, en donde dicha administración es local o sistémica.
3. El método de cualquiera de los párrafos 1-2, en donde la administración se inicia durante un periodo de tiempo de incremento de la señalización del retinoide endógeno en el sujeto que resulta a partir de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular.
4. El método de cualquiera de los párrafos 1-3, en donde la administración se inicia a más tardar 3 días después de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular en el sujeto.
5. El método del párrafo 4, en donde la administración se inicia a aproximadamente 4 días después de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular en el sujeto.
6. El método del párrafo 4, en donde la administración se inicia a aproximadamente 5 días después de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular en el sujeto.
7. El método del párrafo 4, en donde la administración se inicia a aproximadamente 6 días después de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular en el sujeto.

000042

8. El método del párrafo 4, en donde la administración se inicia a aproximadamente 7 días después de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular en el sujeto.
9. El método del párrafo 4, en donde la administración se inicia a aproximadamente 5 días, y se continúa a través de al menos 7 días luego de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular en el sujeto.
10. El método del párrafo 9, en donde la administración se continúa a través de al menos 9 días luego de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular en el sujeto.
11. El método de cualquiera de los párrafos 1-10, en donde el agonista de RAR es seleccionado a partir del grupo que consiste de CD-271 (ácido 6-(4-Metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-Hidroxí-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); CD-1530 (ácido 4-(6-Hidroxí-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-hidroxí-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); BMS-189961 (ácido 3-Fluoro-4-[2-hidroxí-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]naftalen-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftalen-2-il)propenil]tiofen-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.
12. El método de cualquiera de los párrafos 1-11, en donde el tejido muscular se ha lesionado como resultado de un accidente o lesión física, enfermedad, infección, exceso de uso, pérdida de circulación sanguínea, o pérdida o atrofia muscular.
13. El método de cualquiera de los párrafos 1-11, en donde el tejido muscular lesionado es un músculo distrófico o un músculo envejecido.
14. El método de cualquiera de los párrafos 1-11, en donde el tejido muscular lesionado es el resultado de la atrofia/pérdida muscular.
15. El método de cualquiera de los párrafos 1-14, en donde el sujeto es un mamífero.
16. El método de cualquiera de los párrafos 1-15, en donde el sujeto es un ratón.
17. El método de cualquiera de los párrafos 1-15, en donde el sujeto es un humano.
18. El método de cualquiera de los párrafos 1-17, que además comprende la administración de un agente anti-inflamatorio al sujeto.
19. Un método de regeneración o reparación muscular en un sujeto, que comprende la administración de células madre pluripotentes o multipotentes que han sido pretratadas con un agonista de RAR, a un sujeto en el sitio de la lesión muscular, para de este modo reparar o regenerar músculo en el sitio.

000043

20. El método del párrafo 19, en donde la lesión muscular es una lesión tisular compuesta.
21. El método del párrafo 20, en donde la lesión del tejido compuesto comprende una lesión a músculo y hueso.
22. El método de cualquiera de los párrafos 19-21, en donde las células madre pre-tratadas son administradas en combinación con células madre no-tratadas.
23. El método del párrafo 22, en donde las células madre pre-tratadas y células madre no-tratadas son administradas en una proporción de 1:1.
24. El método de cualquiera de los párrafos 19-23, en donde las células madre pre-tratadas han sido pre-tratadas con el agonista de RAR por un periodo de alrededor 3 días.
25. El método del párrafo 19, en donde las células madre pluripotentes son células madre pluripotentes inducidas.
26. El método de cualquiera de los párrafos 19-25, en donde las células madre pluripotentes son células madre mesenquimales.
27. El método de cualquiera de los párrafos 19-26, en donde la administración es local.
28. El método de cualquiera de los párrafos 19-27, en donde la administración es mediante trasplante de células en el sujeto.
29. El método de cualquiera de los párrafos 19-28, en donde las células madre pluripotentes son autólogas o heterólogas para el sujeto.
30. El método de cualquiera de los párrafos 19-29, en donde las células madre pluripotentes son de mamífero.
31. El método de cualquiera de los párrafos 19-30, en donde las células madre pluripotentes son de roedor.
32. El método de cualquiera de los párrafos 19-30, en donde las células madre pluripotentes son de humano.
33. El método de cualquiera de los párrafos 19-32, que además comprende la administración de un agente anti-inflamatorio al sujeto.
34. El método de cualquiera de los párrafos 19-33, en donde el agonista de RAR es seleccionado a partir del grupo que consiste de CD-271 (ácido 6-(4-Metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-Hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); 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-

000044

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]naftalen-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftalen-2-il)propenil]tiofen-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

35. El método de cualquiera de los párrafos 19-34 en donde el músculo es lesionado como resultado de un accidente o lesión física, enfermedad, infección, exceso de uso, pérdida de circulación sanguínea, o pérdida o atrofia muscular.
36. El método de cualquiera de los párrafos 19-34, en donde el tejido muscular lesionado es un músculo distrófico o un músculo envejecido.
37. El método de cualquiera de los párrafos 19-34, en donde la lesión muscular es como resultado de atrofia/pérdida muscular.
38. Un método para la inducción o estimulación de diferenciación miogénica de células madre mesenquimales aisladas *in vitro* que comprende, contactar las células madre mesenquimales con una cantidad efectiva de un agonista del receptor de ácido retinoico gamma (RAR γ).
39. El método del párrafo 38, en donde la puesta en contacto es por un periodo de tiempo seleccionado a partir del grupo que consiste de aproximadamente 12 horas, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, y aproximadamente 3 días.
40. Un método para la inducción o estimulación de la diferenciación linaje-dirigida de una célula madre pluripotente en un linaje mesenquimal, donde el método comprende poner en contacto la célula madre pluripotente con una cantidad efectiva de un agonista del receptor de ácido retinoico gamma (RAR γ).
41. El método del párrafo 40, en donde la célula madre pluripotente es una célula madre pluripotente inducida.
42. El método de cualquiera de los párrafos 40-41, en donde la célula madre pluripotente es una célula madre mesenquimal.
43. El método de cualquiera de los párrafos 40-42, en donde el linaje mesenquimal es seleccionado a partir del grupo que consiste de miogénico, osteogénico, condrogénico, tendogénico, ligamentogénico, estromatogénico de la médula, adipogénico, y dermogénico.
44. El método de cualquiera de los párrafos 40-43, en donde la célula madre pluripotente es de mamífero.
45. El método de cualquiera de los párrafos 40-44, en donde la célula madre pluripotente es de ratón.
46. El método de cualquiera de los párrafos 40-45, en donde la célula madre pluripotente es de humano.

000045

47. El método de cualquiera de los párrafos 40-46, en donde el agonista de RAR γ es seleccionado a partir del grupo que consiste de CD-271 (ácido 6-(4-Metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-Hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); 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]naftalen-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftalen-2-il)propenil]tiofen-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.
48. Una composición que comprende células madre mesénquimales en donde una porción de las células madre mesénquimales ha sido pre-tratada mediante contacto con un agonista de RAR γ para de este modo se generen células madre mesénquimales pre-tratadas.
49. La composición del párrafo 43, en donde la porción de las células madre mesénquimales pre-tratadas es seleccionada a partir del grupo que consiste de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, y 90%.
50. Una composición que comprende una población de células madre pluripotentes, en donde al menos una célula de la población es contactada con un agonista de RAR γ para que de este modo se genere una célula madre pluripotente pre-tratada.
51. La composición del párrafo 50, en donde la célula madre pluripotente es una célula pluripotente inducida.
52. La composición de cualquiera de los párrafos 50-51, en donde la célula madre pluripotente es una célula madre mesenquimal.
53. La composición de cualquiera de los párrafos 50-52, en donde la célula madre es una célula madre aislada.
54. La composición de cualquiera de los párrafos 50-53, en donde la célula madre es de mamífero.
55. La composición de cualquiera de los párrafos 50-54, en donde la célula madre es de murino.
56. La composición de cualquiera de los párrafos 50-54, en donde la célula madre es de humano.

000046

57. La composición de cualquiera de los párrafos 50-56, en donde el agonista de RAR γ es seleccionado a partir del grupo que consiste de CD-271 (ácido 6-(4-Metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-Hidroxí-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); CD-1530 (ácido 4-(6-Hidroxí-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-hidroxí-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); BMS-189961 (ácido 3-Fluoro-4-[2-hidroxí-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); 6-[3-(adamantan-1-il)-4-(prop-2-iniloxi)fenil]naftalen-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftalen-2-il)propenil]tiofen-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.
58. Una composición farmacéutica que comprende una composición de cualquiera de los párrafos 50-57 y un transportador farmacéuticamente aceptable.
59. A kit para la reparación o regeneración del músculo, que comprende al menos unode
- (i) un agonista de RAR γ ;
 - (ii) un agonista de RAR γ y a célula madre; o
 - (iii) una composición de cualquiera de los párrafos 48-58.
60. El kit del párrafo 59, en donde la célula madre es una célula madre pluripotente inducida.
61. El kit de cualquiera de los párrafos 59-60, en donde la célula madre es una célula madre mesenquimal.
62. El kit de cualquiera de los párrafos 59-61, en donde el agonista de RAR γ es formulado en una composición farmacéutica.
63. El kit de cualquiera de los párrafos 59-62, en donde el agonista de RAR γ es formulado para la aplicación tópica.
64. El kit de cualquiera de los párrafos 59-63, en donde la célula madre es una célula madre aislada.
65. El kit de cualquiera de los párrafos 59-64, en donde la célula madre es de mamífero.
66. El kit de cualquiera de los párrafos 59-65, en donde la célula madre es de roedor.
67. El kit de cualquiera de los párrafos 59-65, en donde la célula madre es de humano.
68. El kit de cualquiera de los párrafos 59-67, en donde el agonista de RAR γ es seleccionado a partir del grupo que consiste de CD-271 (ácido 6-(4-Metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-

000047

- (4-Hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1³,7]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); 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-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]naftalen-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftalen-2-il)propenil]tiofen-2-carboxílico; y enantiomeros, derivados, profármacos, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.
69. El kitde cualquiera de los párrafos 59-68, queademás comprendeinstrucciones de uso.

[00171] La presente invenciones ilustrada de forma adicional con relación a los siguientesEjemplos. Estosejemplossonproporcionadoscomo una ayuda para la comprensiónde la invenciónu no se interpretará como una limitación de la misma.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Métodos

[00172] **Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales (MSCs) derivadas de médula ósea.** Los MSCs fueronaislados tal como se ha descrito previamente (ref) con modificaciones menores. Brevemente,células de médula ósea($1-2 \times 10^7$) cosechadas a partir de huesos largosde ratones de 4-6 semanas, las cuales fueron sembradas en placas de cultivo de 100-mm, incubadas por 3 horas a 37°Cpara permitir la unión de las células adherentes, y luego se lavó dos veces con PBSpara eliminar las células no adherentes. lasMSCs derivadas de médula óseaforman colonias adherentes luego de 12-15 díasde cultivo. Los cultivos primariosfueron pasados para la dispersiónde lascélulas formadoras de colonias(pasaje 1). Las células fueron luego subcultivadasde nuevo cuando alcanzaron el 70% de confluencia. Las células fueron mantenidas en α -MEM (Gibco BRL; Invitrogen Corp.) conteniendo 20% de suero bovino fetal (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

000048

primer pasaje. Luego del primer pasaje, las células fueron mantenidas en FBS al 10%, α -MEM a menos que se indique de otro modo.

[00173] Las DsRED que expresan MSCs fueron aisladas a partir de B6.Cg-Tg(CAG-DsRed*MST)1Nagy/J ratón (Jax Mice). Las MSCs que expresan GFP fueron obtenidos a partir de un ratón transgénico que porta H2K-GFP (Dominici et al. Genesis 42:17-22(2005)).

[00174] **Transplante de células.** MSCs (1×10^5) con o sin pre-tratamiento con agonista de RAR fueron suspendidas en 10 μ l DMEM libre y se colocaron en el músculo con defecto total como se ha descrito en el presente documento.

[00175] **Procedimientos Histológicos.** Una muestra de estructura de tejido de músculo fue fijada en PFA al 4% y se embebió en parafina. Secciones seriadas de cinco μ m fueron teñidas mediante ya sea por H&E (http://www.ihcworld.com/protocols/special_stains/HE_Mayer.htm) o con solución de tinción tricrómica de Masson (http://www.ihcworld.com/protocols/special_stains/masson_trichrome.htm). Para detectar el tejido adiposo, las muestras fijadas en PFA al 4% fueron equilibradas en sucrosa al 20% en PBS, se embebieron en compuesto OCT luego se cortaron en un criostato. Las criosecciones de diez μ m fueron deshidratadas, rehidratadas y luego se tiñeron con Aceite-rojo O (http://www.ihcworld.com/protocols/special_stains/oil_red_o.htm).

[00176] **Inmuno-fluorescencia.** Para la detección de varios antígenos en secciones de tejido, secciones de 5 μ m de parafina fueron des-parafinadas, re-hidratadas y luego tratados con pepsina al 0.1% en HCl 0.02 N por 15 min a 37°C. Las secciones fueron lavadas tres veces en PBS-T y bloqueadas en suero normal de cabra al 10% con BSA al 0.3%. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario, lavadas tres veces con PBS-T y luego incubadas con anticuerpo secundario. La lista de antígenos, anticuerpos y sus diluciones es mostrado abajo.

[00177] MyoD: Anti-MyoD; sc-760 (Santa Cruz, 1:100), Anti-Conejo Alexa Flour 488 (Invitrogen, 1:500)

[00178] Myf5: Anti-Myf5; sc-302 (Santa Cruz, 1:100), Anti-Conejo Alexa Flour 488 (Invitrogen, 1:500)

[00179] Anti-Laminina2; ALX-804-190 (Enzo Life Science, 1: 250), Anti-Rata Alexa Flour 594 (Invitrogen, 1:500)

[00180] Cadena pesada de miosina (MHC): Anti-MHC; MF-20 (Developmental Studies Hybridoma Bank, 1: 25), Anti-ratón Alexa Flour 588 (Invitrogen, 1:500)

[00181] Osteocalcina (OC): Anti-OC; M173 (Takara, 1:500), Anti-Conejo Alexa Flour 594 (Invitrogen, 1:500)

[00182] Proteína fluorescente verde (GFP): conjugado con biotina Anti-GFP; NB100-1678 (Novus, 1: 250), Streptavidina Alexa Flour 488 (Invitrogen, 1:500)

000040

[00183] Administración local y sistémica de agonistas de RAR.

La administración sistémica de agonistas de RAR fue llevada a cabo mediante sondas tal como se ha descrito previamente (Shimono et al. J. Orthop. Res. 28:271-277, 2010). La administración local del agonista de RAR fue hecho mediante la inyección del agonista de RAR (disuelto en DMSO) usando una jeringa Hamilton 87943 con una aguja 26G.

Resultados

[00184] Se investigaron los efectos diferenciales de los agonistas retinoides sobre la diferenciación miogénica en cultivos de células madre mesenquimales de ratón derivadas de médula ósea (BMSC). Las BMSCs fueron preparadas a partir de fémures y tibias de ratones de 6 semanas de edad mediante métodos estándar y se mantuvieron en FBS al 5% y DMEM por 7 días en presencia de DMSO al 0.1 % (vehículo: Control), 1 μ M de todos los ácidos retinoicos trans (RA) (comercialmente disponibles de Sigma), 1 μ M del agonista alfa de RAR (obtenida a partir de un NuRx Pharmaceuticals) o 30 nM de gamma agonista de RAR (CD1530, comercialmente disponible). Varias células elongadas multinucleadas de músculo células se formaron solo en cultivos tratados con agonista gamma de RAR.

[00185] Las líneas celulares provenientes de una célula madre mesenquimal fueron cultivadas por 10 días en presencia o ausencia de agonista gamma de RAR (CD1530, 100 nM). Los cultivos fueron procesados mediante inmunotinción con anticuerpos MyoD o Myf5 o teñidos con tinción nuclear de DAPI. Las células control no tratadas contuvieron cantidades no detectable de MyoD y Myf5, pero ambas proteínas estuvieron claramente presentes en cultivos tratados con agonista gamma. Los resultados indican un incremento en los niveles de MyoD y Myf5 para el agonista gamma de RAR en los cultivos de células madre mesenquimales (MSC).

[00186] Un modelo murino con defectos musculares fue usado para investigar la estimulación de reparación de músculo mediante la administración de agonistas gamma de RAR. Se creó un defecto con forma redonda con un cauterizador en la pantorrilla o los músculos tibiales anteriores en ratones de 8 semanas de edad lo cual conlleva a un defecto de 2.0 mm x 2.0 mm x 2.0 mm.

[00187] Se crearon defectos con forma redonda en el tejido del músculo de la pantorrilla de ratones de 8 semanas de edad tal como se indicó anteriormente (un defecto de músculo/ratón). Los ratones recibieron aceite de maíz (vehículo) o 300 μ g de agonista gamma RAR (CD1530)/día mediante sonda en los días 8, 10 y 12 después de la lesión. El tejido fue colectado para análisis histológico en el día 14. El defecto muscular en los ratones de control fueron llenados en gran medida con tejido fibroso similar a cicatriz y con tejidos conectivos al día 14. Estos tejidos similares a las cicatrices fueron totalmente negativos para la cadena pesada de la miosina (MHC) tal como se detectó mediante inmunotinción. En

000250

contraste, los sitios de defecto muscular en ratones tratados con agonista gamma RAR fueron rellenos con varias células elongadas similares a músculos y varias de estas células fueron positivas para MHC. Los resultados indican la estimulación de la reparación del músculo mediante la administración sistémica con un agonista gamma RAR.

[00188] Luego de la creación de un defecto de 2x2x2 mm en el centro del músculo tibial anterior tal como se indicó anteriormente (un defecto muscular/ratón), los ratones recibieron aceite de maíz (vehículo) o 300 µg agonista gamma de RAR / día mediante sonda en el día 8, 10 y 12 después de la lesión. Los tejidos fueron colectados para el análisis histológico a las semanas 2 y 4. Macro-fotos del tejido muscular lesionado colectados a partir de los ratones control y tratados con agonista gamma RAR (CD1530) fueron tomados a las 4 semanas después de la lesión. En los controles, el defecto fue claramente visible como una mancha blanca. En contraste, casi nunca hubo un signo visible del defecto original en los ratones tratados con agonista gamma de RAR. Los análisis histológicos revelaron que los defectos del tejido muscular en los ratones control fueron ocupados por mezclas de tejido adiposo y fibroso a las 2 y 4 semanas. La deposición de tejido fibroso fue también observado entre las fibras del músculo. Sin embargo, en los ratones tratados con agonista gamma de RAR, los defectos del músculo fueron rellenos con fibras de músculo alineadas a lo largo del eje longitudinal mayor del músculo tibial anterior. Los resultados indican una reparación total de los defectos del músculo mediante la administración sistémica de agonistas gamma RAR a través del tiempo.

[00189] Los análisis histológicos del tejido de músculo esquelético fueron llevados a cabo 4 semanas después de la lesión. Secciones transversas seriadas de muestras de tejido muscular fueron colectadas 4 semanas después de la lesión (las mismas muestras tal como se discutió directamente antes) fueron teñidas con tinción tricrómica de Masson's o procesadas para ser inmuno-teñidas con anticuerpos para laminina (una proteína extracelular abundante alrededor de las células del músculo). En los controles, el sitio inicial de lesión fue reparado de forma deficiente y fue ocupado de forma conspicua por tejido adiposo y tejido fibroso conectivo que no se tiñó con anticuerpos anti-laminina. En contraste, el músculo lesionado fue casi siempre reparado de forma completa en los animales tratados con el agonista gamma; el tejido reparado se tiñó fuertemente con anticuerpos anti-laminina. Para evaluar y cuantificar los cambios en la estructura del tejido de músculo esquelético, se tomaron imágenes de secciones seriadas teñidas con tinción tricrómica y se determinaron las cantidades relativas de fibra muscular, tejidos adiposo y fibroso en múltiples áreas definidas mediante el programa ImagePro. Las áreas analizadas fueron grillas de 9 x 9 cada una (aproximadamente 3 x 3 mm) que incluyen el sitio lesionado original (2 x 2 mm). La lesión muscular causó una disminución en el número total de fibras musculares en el área y un incremento paralelo en las áreas de tejido fibroso y adiposo.

000051

En contraste, el tratamiento con CD1530 restaura en gran parte la composición del tejido. La cantidad relativa de músculo ha sido determinado tal como se muestra gráficamente en la Figura 1.

[00190] Para verificar que el RAR γ es requerido para la reparación y regeneración muscular, se crearon lesiones musculares en ratones de tipo salvaje (WT) y ratones nulos para RAR γ tal como se indicó anteriormente. Los animales fueron luego tratados con agonista γ o vehículo (aceite de maíz). Se colectaron muestras de tejido 4 semanas después de la lesión, se seccionaron y tiñeron con solución de tinción tricrómica de Masson. En concordancia con los resultados anteriormente discutidos, el tratamiento con el agonista γ indujo una reparación muscular efectiva en los ratones de tipo salvaje WT. Sin embargo, este tuvo efectos mínimos en los ratones nulos para RAR γ , en los cuales el defecto muscular fue relleno con tejido adiposo y algo de tejido conectivo y cordones con células fibrosas. Estos hallazgos indican que: (1) el efecto de reparación muscular por el agonista γ es mediado por el RAR γ ; y (2) el RAR γ es requerido para reparar el tejido de músculo esquelético.

[00191] Se examinaron los efectos de los múltiples agonistas retinoides sobre la reparación del músculo esquelético. Macro fotografías fueron tomadas de sitios de lesión muscular luego de un periodo de 4 semanas. El análisis histomorfométrico de la composición de los músculos lesionados es mostrado en la Figura 2. Los defectos de lesión muscular fueron creados en ratones de 8 semanas de edad tal como se ha descrito anteriormente. Los ratones recibieron aceite de maíz (control), 300 μ g de pan-agonista de ácido retinoico (RA), 900 μ g de NRX195183 (agonista alfa RAR α) o 300 μ g de CD1530 (agonista γ RAR) en los días 8, 10 y 12 mediante sonda. Cuatro semanas después de la lesión, muestras de tejido fueron colectadas, procesadas para los análisis histológicos y sometidos a cuantificación histomorfométrica. En los animales control y los animales tratados con agonista alfa RAR o con RA, los sitios de lesión fueron claramente visibles como grandes manchas debido al reemplazo del músculo con tejido adiposo. Sin embargo, en los animales tratados con γ RAR, los sitios de lesión fueron esencialmente invisibles a las 4 semanas debido a que ellos fueron rellenos con tejido muscular de reparación. Para cuantificar las respuestas, se hicieron secciones seriadas de tejido en los sitios de reparación y se tiñeron con tricromo y se analizaron cuanto a la cuantificación de cantidades relativas de músculo, tejidos adiposo y fibroso en áreas definidas mediante el programa ImagePro tal como se ha descrito anteriormente. Las áreas analizadas fueron grillas de 9 x 9 cada una (aproximadamente 3 x 3 mm) que contenían el sitio original de lesión (2 x 2 mm). Los resultados son mostrados en la Figura 2. El gráfico muestra promedios de nueve secciones provenientes de tres ratones. "Normal" fue derivado a partir de la composición de un tejido muscular de un músculo normal no

000052

lesionado. Como se espera, los músculos en los animales control estuvieron compuestos de 90% de tejido muscular, 7% de tejido fibroso y cantidad estraza de tejido adiposo. La lesión del músculo causó una dramática disminución en el área de las fibras musculares de 90% a 33%, y ellos se correspondieron con el incremento de las áreas de los tejidos adiposo y fibroso. El tratamiento con RA mejoró de forma moderada el área de fibras musculares desde 33% (control) a 54%, pero hubo un incremento significativo de tejido fibroso en el área. El agonista alfa RAR NRX195183 no mejoró la composición de los tejidos. En contraste, la composición de los tejidos reparados en los animales tratados con CD1530 fue casi normal.

[00192] Se investigó los efectos de los agonistas gamma RAR con diferente estructura sobre la reparación del músculo. En los experimentos discutidos anteriormente, el agonista gamma CD1530 mostró ejercer una aceleración dramática en la reparación muscular y que la expresión de gamma RAR es requerida para tal efecto. Para validar estos hallazgos e identificar agonistas gamma posiblemente más potentes, Se evaluaron tres diferentes Agonistas gamma RAR (BMS270394, Palovaroteno, y CD437) estructuralmente diferentes en cuanto a la capacidad de reparación del músculo. Se crearon lesiones musculares en los músculos de la pierna tal como se indicó anteriormente. Cada grupo de ratones recibió uno de los diferentes agonistas (100 µg/sonda/día) o vehículo en los días 8, 10 y 12 desde la lesión. Los tejidos fueron colectados 4 semanas luego de la cirugía y se examinaron tal como se indica arriba. En los controles, los sitios de lesión muscular fueron claramente visibles como manchas en donde hubo una reparación muscular mínima; Adicionalmente, tejido fibroso de cicatrización estuvo presente dentro del músculo lesionado. En contraste, cada agonista gamma inducido fue efectivo para la reparación muscular; entre los tres agonistas evaluados, el BMS270394 fue el más efectivo y fue completamente restaurado hasta tener la estructura de un músculo normal. Los resultados indican que los agonistas gamma con extremadamente efectivos en gatillar la reparación muscular.

[00193] Se evaluaron los efectos de la administración local de agonista gamma RAR sobre la reparación muscular. Aunque no se han observado efectos secundarios importante en la administración sistémica de agonistas gamma en experimentos de reparación muscular, podría ser necesario que ellos tengan que ser administrados en forma local en algunas situaciones clínicas. Para la prueba de efectividad de los fármacos cuando ellos son administrados localmente, se realizaron lesiones musculares tal como se indicó arriba y se inyectó 3 µg de CD1530 por vía subcutánea alrededor de los sitios de lesión en los días 8 y 10 luego de la operación. Se inyectó vehículo en los controles, y se colectaron tejidos a las 4 semanas y se examinaron tal como se ha indicado arriba. En los controles, los sitios de lesión fueron claramente visibles y conspicuamente ocupados por tejido adiposo. En el grupo tratado con CD1530, Sin embargo, los defectos del músculo fueron reparados casi

000052

completamente. El peso molecular de los agonistas gammaes en general menos de 500 y entonces, los fármacos pueden ser aplicados desde la piel a los tejidos musculares profundos en la forma de un ungüento u otras formulaciones (Adicionalmente a la inyección local).

[00194] Células madre mesenquimales que expresan GFP fueron tratadas con vehículo (control) o 100 nM de CD1530 por tres días en cultivo, mezclado con Matrigel y 1 µg de rhBMP2, y luego se trasplantaron en un ratón nude. Dos semanas luego de la implantación, se colectaron masas de tejido ectópico para el análisis. Se observó una masiva formación endocondral de hueso en los controles; la inmunotinción con anti-GFP y anti-OC (osteocalcina) reveló que las MSCs trasplantadas contribuyeron a la formación ósea. Sin embargo, no se formó ningún hueso ectópico endocondral en ratones trasplantados con MSCs pretratadas con el agonista gama; estas células estuvieron presentes tal como lo indicaba la tinción positiva de GFP pero fueron negativas para la tinción con OC y en su mayoría estuvieron alineadas. Algunas células estuvieron fusionadas o en proceso de fusión. De este modo, el tratamiento con el agonista gama efectivamente inició la vía de la diferenciación miogénica de las MSCs. Estos resultados indican que el agonista RAR gamma es un factor de inicio para la diferenciación miogénica de las células madre mesenquimales (MSC).

[00195] Para una evaluación adicional de la capacidad de los agonistas gama para iniciar a las MSCs en el linaje miogénico, se crearon defectos de lesión muscular en ratones nude. Como se ha discutido anteriormente, las MSCs que expresan DsRed pretratadas con agonista gama por tres días (o no tratadas) fueron trasplantadas. Dos semanas luego del trasplante, se colectaron los tejidos presentes en los sitios de lesión y se inspeccionaron bajo un estereomicroscopio fluorescente. Luego los tejidos fueron procesados para los análisis histológicos. La estereomicroscopía fluorescente reveló una fuerte señal de fluorescencia roja presente en el sitio de lesión muscular donde el MSCs pretratado con agonista gama fue implantado, pero se observó muy poca o ninguna fluorescencia en los sitios implantados con MSCs no tratadas de control (A, paneles de la izquierda). La tinción con el aceite rojo O reveló la presencia de abundante tejido adiposo en los sitios de lesión implantados con MSCs de control (B, izquierda), pero la ausencia de estas células en los sitios implantados con MSCs pretratados con agonista gama (B, derecha). Los análisis de inmunofluorescencia revelaron que las MSCs DsRed-positivas y pretratadas con el agonista gama contribuyeron a la formación de tejido muscular reparado que expresa MHC (C, derecha), pero estos estuvieron ausentes en el control. (DsRed, color rojo; MHC, verde; DAPI, púrpura). En los experimentos descritos anteriormente, la administración sistémica del agonista gama inducía la reparación de los defectos de lesión muscular en 4 semanas. Es destacable indicar que defectos similares fueron reparados casi completamente dentro de las 2 semanas luego del trasplante de MSCs preparado con agonista gama. Entonces el uso de MSCs pre-tratados con agonista gama puede representar un procedimiento muy efectivo para reparar las

000051

lesiones musculares rápidamente. Estos resultados indican la reparación de la lesión muscular mediante MSCs preparados con agonista gama.

Ejemplo 2

Métodos

[00196] A menos que se indique de otro modo, todos los métodos fueron llevados a cabo tal como se describe en el Ejemplo 1, o mediante procedimientos estándares conocidos en el arte.

[00197] La inmunodetección de células humanas y de la cadena pesada de miosina fueron llevados a cabo mediante la incubación de secciones con anticuerpo anti-humano TRA-1-85 biotinilado (1:250 dilución, R&D cat #BAM3195) y anti-laminina (1:250, Enzy, ALX-804-190), lavados y luego incubados con Alexa Fluor 488 estreptavidina y Alexa Fluor 594 anti-rata IgG.

Resultados

Reparación de lesión muscular mediante una célula madre mesenquimal derivada de tejido adiposo humano pre-tratado con agonista gama.

[00198] Los experimentos descritos abajo indican que las células madres RAR pre-tratadas con agonistas γ no solo regeneran tejido muscular por sí mismos, sino que también sustentan la diferenciación miogénica de células hospederas. Como tales, estas células son ahora denominadas como células madre mesenquimales “pre-tratada” en vez de “preparadas”, para ser consistente con la definición aceptada del término “preparado” tal como es usado en el arte para indicar células sometidas a miogénesis.

[00199] Para evaluar los efectos del pretratamiento de una célula madre mesenquimal humana con agonistas gama RAR, se efectuó un defecto de forma redonda en el músculo tibial anterior de ratones NOD (NOD.Cg-Rag1tm1Mom Prf1tm1Sdz/Sz) tal como se ha indicado arriba. Célula madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo no tratadas o tratadas con RARγ fueron trasplantadas al sitio (5,000 células per sitio). Se colectó tejido 2 semanas luego de la operación y se sometió a análisis histológico mediante secciones teñidas con tinción tricrómica de Masson de MSC pre-tratado con RARγ trasplantados a músculo y MSC control trasplantado a músculo, y también mediante detección con tinción por inmunofluorescencia de la cadena pesada de miosina (MHC, anti-antígeno celular derivado de humano, y núcleo (DAPI) de MSC pre-tratadas con RARγ trasplantadas a músculo y MSC control trasplantado a músculo.

[00200] El MSC humano pretratado con RARγ claramente facilita la reparación del tejido muscular lesionado. Mientras que las MSCs humanas pretratadas con RARγ

000055

contribuyen a la regeneración del tejidomuscular, los MSCs que no fueron pre-tratados fueron mayormente excluidos del tejido muscular.

[00201] Para evaluar si el pre-tratamiento con agonistas gama RARes efectivos sobre los diferentes tipos de células madre mesenquimales, se trataron células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo (Zenbio, Cat # ASC-F) con $1\mu\text{M}$ CD1530 o vehículo por 3 días *in vitro*, y luego se trasplantaron dentro de un sistema de modelo de daño muscular. Se creó un defecto con forma redonda en el músculo tibial anterior en ratones NSG de 6-semanas de edad (NOD scid gamma mouse, Jax mice #005557) tal como se ha descrito anteriormente (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ). Células madre mesenquimales humanas derivadas de adipocitos no tratadas o tratadas con RARg fueron trasplantadas en el sitio (10,000 células por sitio). Se colectó tejido 2 semanas luego de la operación y se sometió a análisis histológico (secciones teñidas con tinción tricrómica de Masson) de MSC preparado con RARg trasplantado a músculo y MSC control trasplantado a músculo, y también mediante detección por inmunofluorescencia de laminina, antígeno derivado de células humanas, y núcleos (DAPI) de MSC preparado con RARg trasplantado a músculo y MSC control.

[00202] Las MSC humanas pre-tratadas con RARg claramente facilitaron la reparación del tejido muscular lesionado. Mientras que las MSCs humanas pre-tratadas con RARg fueron observadas principalmente distribuidas alrededor de las fibras musculares, las células no-tratadas fueron mayormente excluidas del tejidomuscular. Estos resultados indican que el uso de células madres tales como MSC pre-tratadas con agonistas de RAR y es una terapia efectiva para la reparación muscular y también que las células madres (por ejemplo MSC) provenientes de varias fuentes pueden ser usadas para esta terapia.

Reparación de tejidos complejos (músculo + hueso) lesiones con MSCs preparadas (tratadas con agonista RARg) o no preparadas

[00203] Las lesiones musculares severas a menudo se acompañan de lesiones de otros tejidos tales como hueso, tendón y nervio. Mediante el uso de un modelo de lesión compuesto simplificado, se evaluó a las MSCs tratadas con agonista de RAR y en cuanto al objetivo preferencial de tejido muscular dañado.

[00204] La lesión compuesta de tejido (hueso y músculo) fue realizada en ratones de 2 meses de edad mediante el corte de la fíbula y el tejido muscular circundante. Luego de esto, una mezcla 1:1 de MSC pre-tratada con agonista de RAR y MSCs control no pre-tratadas fueron trasplantadas cerca al sitio de lesión. Las MSC fueron preparadas a partir de médula ósea de ratón que expresa ya sea GFP (pre-tratada) o DsRED (no-tratada). El tejido lesionado fue colectado 1 semana luego de la cirugía, fue seccionado y examinado en

000055

cuanto a la distribución de las MSCs pre-tratadas y no pre-tratadas usando anticuerpos anti-GFP y anti-DsRed respectivamente. Los análisis histológicos con tinción HE revelaron daño en los tejidos óseo y muscular que estaban aún en proceso de reparación. Sorprendentemente, mientras que la mayoría de MSCs preparadas fueron detectadas en el tejido muscular, la mayoría de las células preparadas estuvo siempre asociada con el tejido óseo. Algunos de los MSCs pre-tratados con agonista de RAR γ que expresan DsRed fueron observados en células de músculo esquelético típicamente multinucleadas.

[00205] Las MSCs pre-tratadas con el agonista de RAR γ y no tratadas fueron observadas en diferentes tejidos objetivo en los sitios de lesión. Los resultados indican que las MSCs pre-tratadas con el agonista de RAR γ selectivamente apuntan al tejido muscular lesionado. Las MSCs pre-tratadas con el agonista de RAR γ serán útiles para reparar el tejido muscular lesionado cuando otros tejidos también estén dañados. Se ha reportado previamente que la administración sistémica del agonista de RAR γ no solo inhibe la osificación heterotópica sino que retrasa la sanación de una fractura (Shimono et al., Nature Medicine 17, 454-460 (2011)). Adicionalmente, estos resultados sugieren fuertemente que el trasplante combinado de MSCs pre-tratadas y no tratadas en una proporción adecuada es una terapia efectiva para la lesión tisular compuesta.

Requerimiento de la señalización de RAR γ en la reparación muscular

[00206] Los resultados anteriores indican que las lesiones en el tejido muscular son pobremente reparadas en ratones nulos de RAR γ . Para confirmar este hallazgo, otro modelo ampliamente usado de degeneración muscular fue usado. 1 μ g de cardio-toxina fue inyectada en el tejido del músculo tibial anterior de ratones de tipo salvaje y nulos de RAR γ . El tejido muscular fue colectado a las dos semanas luego de la inyección de cardio-toxina, se seccionó y examinó mediante tinción tricromica de Masson. Se observe que el tejido muscular inyectado con cardio-tóxina fue profusamente restaurado con fibras inmaduras de músculo luego de 2 semanas en los ratones salvajes de control. En contraste, en los ratones nulos para RAR γ se observe una reparación pobre del músculo.

Sobre regulación de la señalización local de retinoides luego de lesión muscular

[00207] Un ratón reportero de la señalización del ácido retinoico en el músculo tibial anterior (ratón RARE-LacZ) fue cortado u operado. El tejido muscular fue colectado en los días 1, 4 o 7 y se tiñó con X-gal. Se observe un incremento en la actividad del reportero a los 4 días después de la lesión, sugiriendo que esta vía de señalización se encuentra involucrada en la reparación tisular del músculo.

[00208] Se colectó el ARN total del tejido muscular a las 8 horas, 2 días y 4 días, y se sometió a RT-PCR para el análisis de los genes relacionados a la expresión de RAR. La

000057

expresión de ALDH2, la enzima limitante tardía que produce RA a partir de su precursor fue observada sobre-regulada a los 4 días después de la lesión, retornando a niveles normales de expresión en el día 11. En contraste, Cyp26b1 (Cyp26B), la enzima que degrada RA tuvo una sobre regulación pasajera a los 2 días después de la lesión. Los resultados son mostrados en las Figuras 4 y 5, e indican que la concentración local de RA disminuye primero y luego incrementa de forma pasajera luego de la lesión muscular.

Efecto del lapso de tratamiento sobre la reparación del tejido muscular

[00209] Se realizaron defectos sobre el músculo tal como antes se ha descrito. Los ratones fueron tratados con agonista RAR γ (CD1530) a los días 1-3 o días 5-7. Las figuras muestran la tinción HE de los tejidos musculares luego de 4 semanas de la lesión. El defecto del músculo en los controles no tratados fueron conspicuamente reemplazados con tejido graso y fibroso. En los días 1-3 del tratamiento con agonista de RAR γ disminuyó el tejido adiposo y el tejido fibroso de cicatrización pero el defecto permaneció parcialmente. En contraste, los defectos del músculo fueron completamente rellenos con fibras musculares generadas de novo en los grupos de tratamiento de los días 5-7. De este modo se evidencia que el momento de inicio del tratamiento es muy importante para acelerar y mejorar la reparación del tejido muscular. La señalización con RAR γ debe ser potenciada cuando se incrementa la señal de retinoide endógeno. El régimen sugerido de tratamiento es de administración local o sistémica de agonista RAR γ en los días 5 y 7 luego de la lesión muscular. La potenciación adicional del momento del tratamiento agudo puede ser alcanzado mediante la concentración local de ácido retinoico por LS/MS/MS.

[00210] Se crearon defectos musculares tal como se ha indicado anteriormente. Los ratones fueron administrados con 100 ng de agonista de RAR γ (CD1530) en días intercalados durante un periodo de 1-5 días, 5-9 días, y 1-9 días. Los ratones del grupo de 1-5 días recibieron CD1530 en los días 1, 3 y 5. Los de los días 5-9 recibieron CD1530 en los días 5, 7 y 9. Los del grupo de 1-9 días recibieron CD1530 en los días 1, 3, 5, 7 y 9. Los músculos fueron luego comparados con un músculo lesionado tratado con vehículo así como también con tejido muscular intacto (músculo no lesionado). Se examinó la tinción HE de los tejidos musculares a las 4 semanas luego de la lesión. Los defectos del músculo en controles no tratados control fueron observados con un amplio reemplazo con tejido adiposo y fibroso (Vehículo). Tanto en los días de tratamiento 1-5 o 1-9 con agonista de RAR γ se observó una disminución del tejido adiposo y fibroso de cicatrización pero dejó una gran huella. La calidad y la cantidad de tejido muscular recién formado fue mayor en los grupos de tratamiento de los días 5-9, en los cuales las huellas fueron profusamente reducidas.

000058

Del análisis histomorfométrico of el tejido muscular lesionado

[00211] Secciones seriadas de tejido en los sitios de reparación fueron teñidos con tinción tricrómica de Masson y analizados en relación a la cantidad relativa de tejidos muscular, adiposo y fibroso en áreas definidas mediante el programa ImagePro tal como ya se ha descrito. Los resultados son mostrados en la Figura 6. El análisis de imágenes confirma que el tejido muscular del grupo tratado los días 5-9 contiene la menor cantidad de tejido adiposo y fibroso entre todos los grupos lesionados. Esto indica que el momento de tratamiento es muy importante para acelerar y mejorar la reparación del tejido muscular y que se obtienen resultados más beneficiosos cuando la señalización de $RAR\gamma$ es potenciada de forma terapéutica (por ejemplo, mediante la administración de un agonista de $RAR\gamma$) y el momento de incremento de la señalización del retinoide endógeno, y no antes.

000059

REIVINDICACIONES

1. Un método de regeneración o reparación muscular en un sujeto, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista del receptor de ácido retinoico gama (RAR γ) a un sujeto con el tejido muscular lesionado, para de este modo reparar o regenerar el tejido muscular lesionado.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha administración es local o sistémica.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la administración se inicia durante un periodo de tiempo de incremento de la señalización del retinoide endógeno en el sujeto, que resulta de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la administración se inicia a más tardar 3 días después de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular en el sujeto.
5. El método de la reivindicación 4, en donde la administración se inicia a aproximadamente 4 días después de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular en el sujeto.
6. El método de la reivindicación 4, en donde la administración se inicia a aproximadamente 5 días después de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular en el sujeto.
7. El método de la reivindicación 4, en donde la administración se inicia a aproximadamente 6 días después de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular en el sujeto.
8. El método de la reivindicación 4, en donde la administración se inicia a aproximadamente 7 días después de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular en el sujeto.
9. El método de la reivindicación 4, en donde la administración se inicia a aproximadamente 5 días, y se continúa a través de al menos 7 días luego de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular en el sujeto.
10. El método de la reivindicación 9, en donde la administración se continúa a través de al menos 9 días luego de la ocurrencia de la lesión del tejido muscular en el sujeto.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el agonista de RAR γ es seleccionado a partir del grupo que consiste de CD-271 (ácido 6-(4-Metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-Hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); 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-Tetrahydro-5,5,8,8-tetrametil-3-(1H-

000060

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-butyl-fenil)-3-oxo-propenil]-benzoico); ácido 6-[3-(adamantan-1-il)-4-(prop-2-iniloxi)fenil]naftalen-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftalen-2-il)propenil]tiofen-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el tejido muscular se ha lesionado como resultado de un accidente o lesión física, enfermedad, infección, exceso de uso, pérdida de circulación sanguínea, o pérdida o atrofia muscular.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el tejido muscular lesionado es un músculo distrofico o un músculo envejecido.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el tejido muscular lesionado como resultado de atrofia/pérdida muscular.
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el sujeto es un mamífero.
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el sujeto es un ratón.
17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el sujeto es un humano.
18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, que además comprende la administración de un agente anti-inflamatorio al sujeto.
19. Un método de regeneración o reparación muscular en un sujeto, que comprende la administración de células madre pluripotentes o multipotentes, que han sido pretratadas con un agonista de RAR γ , a un sujeto en el sitio de la lesión muscular, para de este modo reparar o regenerar músculo en el sitio de la lesión.
20. El método de la reivindicación 19, en donde la lesión muscular es una lesión tisular compuesta.
21. El método de la reivindicación 20, en donde la lesión de tejido compuesto comprende una lesión de músculo y hueso.
22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-21, en donde las células madre pre-tratadas son administradas en combinación con células madre no-tratadas.
23. El método de la reivindicación 22, en donde las células madre pre-tratadas y células madre no-tratadas son administradas en una proporción de 1:1.

000061

24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-23, en donde las células madre pre-tratadas han sido pretratadas con el agonista de RAR γ por un periodo de alrededor 3 días.
25. El método de la reivindicación 19, en donde las células madre pluripotentes son células madre pluripotentes inducidas.
26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-25, en donde las células madre pluripotentes son células madre mesenquimales.
27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-26, en donde la administración es local.
28. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-27, en donde la administración es mediante trasplante de las células in el sujeto.
29. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-28, en donde las células madre pluripotentes son autólogas o heterólogas al sujeto.
30. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-29, en donde las células madre pluripotentes son de mamífero.
31. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-30, en donde las células madre pluripotentes son de roedor.
32. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-30, en donde las células madre pluripotentes son de humano.
33. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-32, que además comprende la administración de un agente anti-inflamatorio al sujeto.
34. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-33, en donde el agonista de RAR γ es seleccionado a partir del grupo que consiste de CD-271 (ácido 6-(4-Metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-Hidroxí-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); CD-1530 (ácido 4-(6-Hidroxí-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-hidroxí-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); BMS-189961 (ácido 3-Fluoro-4-[2-hidroxí-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-inilo)fenil]naftalen-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftalen-2-il)propenil]tiofen-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

000062

35. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-34 en donde el músculo es lesionado como resultado de un accidente o lesión física, enfermedad, infección, exceso de uso, pérdida de circulación sanguínea, o pérdida o atrofia muscular.
36. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-34, en donde el tejido muscular lesionado es un músculo distrófico o un músculo envejecido.
37. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-34, en donde la lesión muscular es como resultado de atrofia/pérdida muscular.
38. Un método para la inducción o estimulación de diferenciación miogénica de células madre mesenquimales aisladas *in vitro* comprende, contactar las células madre mesenquimales con una cantidad efectiva de un agonista del receptor de ácido retinoico gamma (RAR γ).
39. El método de la reivindicación 38, en donde la puesta en contacto es por un periodo de tiempo seleccionado a partir del grupo que consiste de aproximadamente 12 horas, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, y aproximadamente 3 días.
40. Un método para la inducción o estimulación de diferenciación linaje-dirigida de una célula madre pluripotente en un linaje mesenquimal, el método comprende poner en contacto la célula madre pluripotente con una cantidad efectiva de un agonista del receptor de ácido retinoico gamma (RAR γ).
41. El método de la reivindicación 40, en donde la célula madre pluripotente es una célula madre pluripotente inducida.
42. El método según cualquiera de las reivindicaciones 40-41, en donde la célula madre pluripotente es una célula madre mesenquimal.
43. El método de cualquiera de las reivindicaciones 40-42, en donde el linaje mesenquimal seleccionado a partir del grupo que consiste de miogénico, osteogénico, condrogénico, tendogénico, ligamentogénico, estromatogénico de la médula, adipogénico, y dermogénico.
44. El método de cualquiera de las reivindicaciones 40-43, en donde la célula madre pluripotente es de mamífero.
45. El método de cualquiera de las reivindicaciones 40-44, en donde la célula madre pluripotente es de ratón.
46. El método de cualquiera de las reivindicaciones 40-45, en donde la célula madre pluripotente es de humano.
47. El método de cualquiera de las reivindicaciones 40-46, en donde el agonista de RAR γ es seleccionado a partir del grupo que consiste de CD-271 (ácido 6-(4-Metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-Hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); CD-1530 (ácido 4-(6-Hidroxi-7-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il-2-naftalenil)benzoico); CD-

000063

2247; palovaroteno (ácido4-[(1E)-2-[5,6,7,8-Tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-3-(1H-pirazol-1-ilmetil)-2-naftalenil]-etenil]-benzoico); BMS-270394 (ácido3-Fluoro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); BMS-189961 (ácido3-Fluoro-4-[2-hidroxi-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)-acetilamino]-benzoico); CH-55 (ácido4-[(E)-3-(3,5-Di-tert-butil-fenil)-3-oxo-propenil]-benzoico); ácido6-[3-(adamantan-1-il)-4-(prop-2-iniloxi)fenil]naftalen-2-carboxílico; ácido5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftalen-2-il)propenil]tiofen-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

48. Una composición que comprende células madre mesénquimales en donde una porción de las células madre mesenquimales ha sido pre-tratada mediante contacto con un agonista de RAR γ , para de este modo generar células madre mesénquimales pre-tratadas.
49. La composición de la reivindicación 43, en donde la porción de las células madre mesénquimales pre-tratadas es seleccionada a partir del grupo que consiste de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, y 90%.
50. Una composición que comprende una población de células madre pluripotentes, en donde al menos una célula de la población fue contactada con un agonista de RAR γ para de este modo generar a célula madre pluripotente pre-tratada.
51. La composición de la reivindicación 50, en donde la célula madre pluripotente es una célula pluripotente inducida.
52. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 50-51, en donde la célula madre pluripotente es una célula madre mesenquimal.
53. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 50-52, en donde la célula madre es una célula madre aislada.
54. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 50-53, en donde la célula madre es de mamífero.
55. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 50-54, en donde la célula madre es de murino.
56. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 50-54, en donde la célula madre es de humano.
57. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 50-56, en donde el agonista de RAR γ es seleccionado a partir del grupo que consiste de CD-271 (ácido6-(4-Metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido6-(4-Hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); CD-1530 (ácido4-(6-Hidroxi-7-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il-2-naftalenil)benzoico); CD-2247; palovaroteno (ácido4-[(1E)-2-[5,6,7,8-Tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-3-(1H-

000064

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-butyl-fenil)-3-oxo-propenil]-benzoico); ácido 6-[3-(adamantan-1-il)-4-(prop-2-iniloxi)fenil]naftalen-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftalen-2-il)propenil]tiofen-2-carboxílico; y enantiómeros, derivados, profármacos, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

58. Una composición farmacéutica que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 50-57 y un transportador farmacéuticamente aceptable.
59. Un kit para la reparación o regeneración del músculo, que comprende al menos unode
 - un agonista de RAR γ ;
 - un agonista de RAR γ y una célula madre; o
 - una composición de cualquiera de las reivindicaciones 48-58.
60. El kit de la reivindicación 59, en donde la célula madre es una célula madre pluripotente inducida.
61. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 59-60, en donde la célula madre es una célula madre mesenquimal.
62. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 59-61, en donde el agonista de RAR γ es formulado en una composición farmacéutica.
63. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 59-62, en donde el agonista de RAR γ es formulado para la aplicación tópica.
64. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 59-63, en donde la célula madre es una célula madre aislada.
65. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 59-64, en donde la célula madre es de mamífero.
66. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 59-65, en donde la célula madre es de roedor.
67. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 59-65, en donde la célula madre es de humano.
68. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 59-67, en donde el agonista de RAR γ es seleccionado a partir del grupo que consiste de CD-271 (ácido 6-(4-Metoxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); CD-394, CD-437 (ácido 6-(4-Hidroxi-3-triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico); 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-

000065

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-butyl-fenil)-3-oxo-propenil]-benzoico); ácido 6-[3-(adamantan-1-il)-4-(prop-2-iniloxi)fenil]naftalen-2-carboxílico; ácido 5-[(E)-3-oxo-3-(5,5,8,8-tetrahidronaftalen-2-il)propenil]tiofen-2-carboxílico; y enantiomeros, derivados, profármacos, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

69. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 59-68, además comprende instrucciones de uso.

000086

RESUMEN

La invención proporcionamétodos para la regeneración o reparación muscularque comprenden la administración de unacantidad terapéuticamente efectiva de unagonista de RARs o célula madres que han sido pre-tratadas mediante contacto con un agonista de RARa un sujetoen el sitio de la lesión muscular. De forma adicional,la invención proporcionacomposicionesque comprenden célula madres tratadascon un agonista de RARy métodospara el uso de dichas células para la regeneración o reparación muscular. En una realización, la célula madres son células madre mesenquimales. En una realización, el agonista de RARes un agonista de RAR γ . En una realización, la administracióndel agonista de RARes iniciadadurante elperiodode incremento delaseñalización del retinoide endógenoen el sujeto, lo que ocurre a partir de la lesión del tejido muscular.

000067

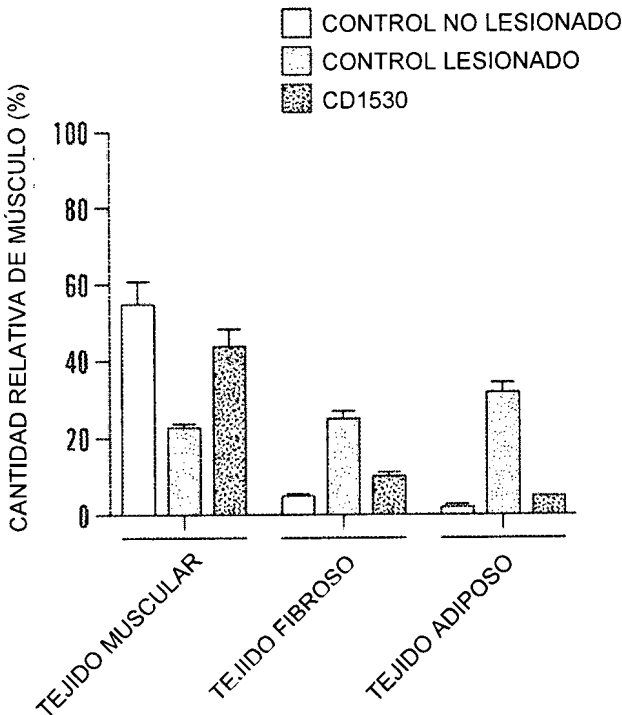
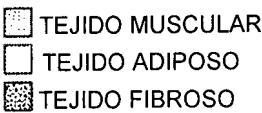


FIG. 1.



ANÁLISIS HISTOMORFOMÉTRICO DE LA COMPOSICIÓN DE LOS MÚSCULOS LESIONADOS

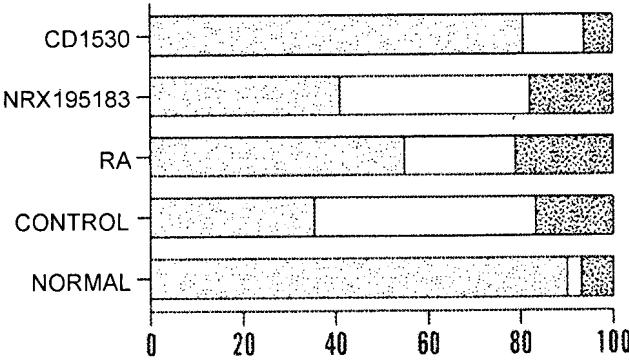


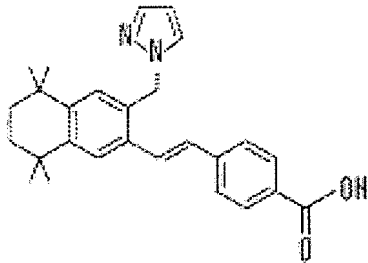
FIG. 2.

000068

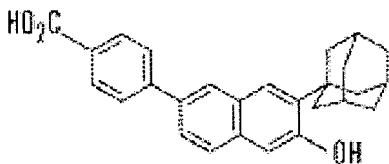
2/5

PALOVAROTENO

Ácido 4-[(1E)-2-[5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-3-(1H-pirazol-1-ilmetil)-2-naftalenil]-etenil]-benzoico

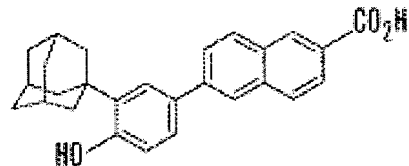


CD 1530
Cat. No. 2554



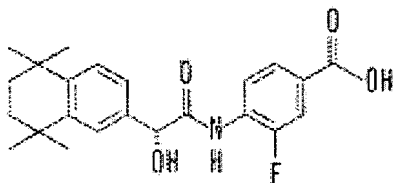
NOMBRE QUÍMICO: ácido 4-(6-Hidroxi-7-triciclo[3.3.1.13,7]dec-1-il-2-naftalenil)benzoico

CD 437
Cat. No. 1549



NOMBRE ALTERNATIVO: NOMBRE QUÍMICO AHPN: ácido 6-(4-Hidroxi-3-triciclo[3.3.1.13,7]dec-1-ilfenil)-2-naftalencarboxílico

BMS 270394
(R)-(+)-BMS-270394



CAS 262433-54-5
C23H26FNO4 PM 399.47

BMS 270394 FUE ADQUIRIDO DE AXON.
CD437 Y CD1530 FUERON ADQUIRIDOS DE TOCRIS USA
PALOVAROTENO (R667) FUE ADQUIRIDO DE ATOMAX CHEMICALS CO. LTD.

FIG. 3.

000069

00070

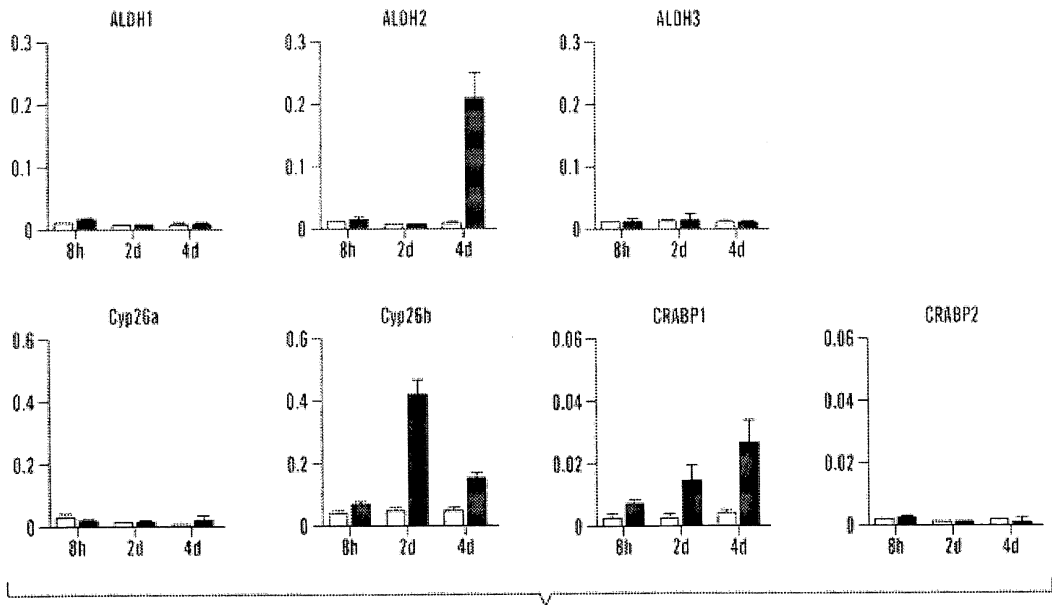


FIG. 4.

4/5

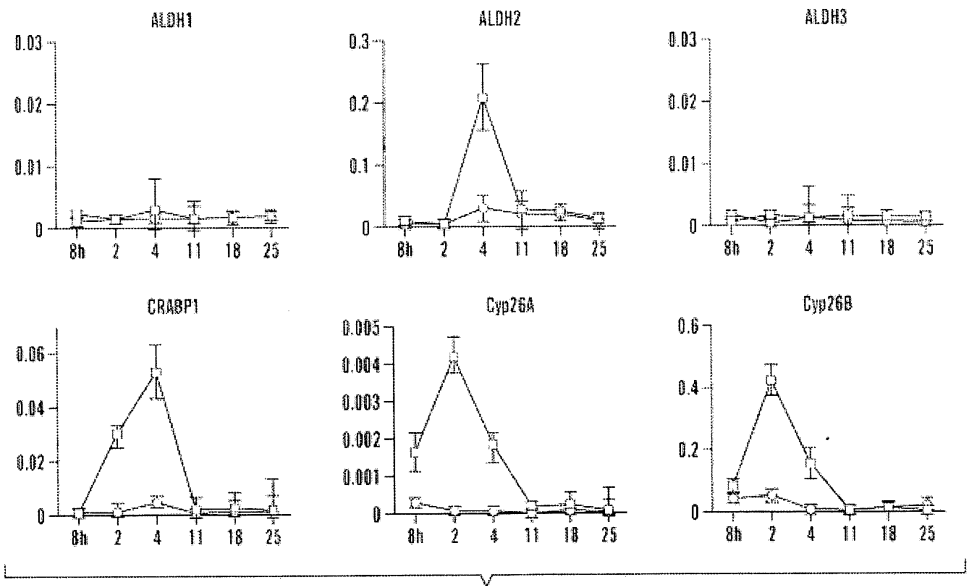


FIG. 5.

000071

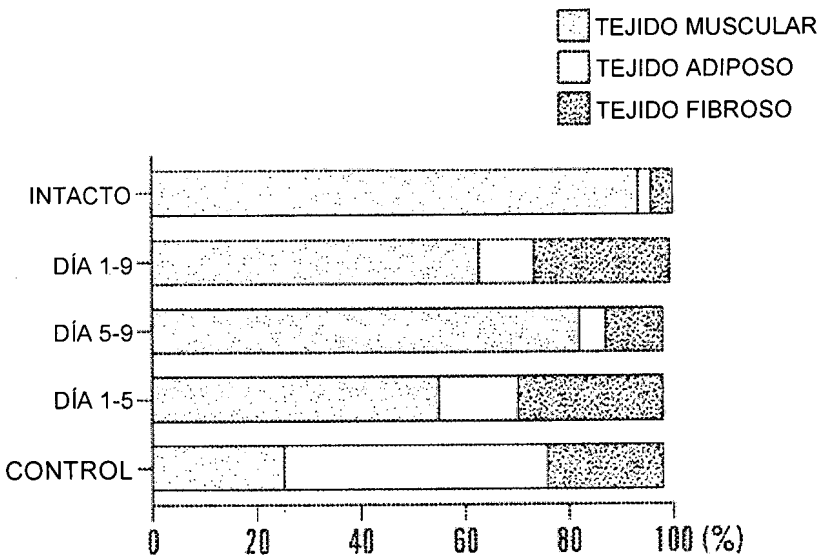


FIG. 6.

000072

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(10) International Publication Number
WO 2012/030919 A3

(43) International Publication Date
8 March 2012 (08.03.2012)

(51) International Patent Classification:
A61K 31/19 (2006.01) A61K 31/185 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2011/049905

(22) International Filing Date:
31 August 2011 (31.08.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/378,996 1 September 2010 (01.09.2010) US

(71) Applicant (for all designated States except US):
THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY [US/US]; 1020
Walnut Street, Philadelphia, Pennsylvania 19107 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): IWAMOTO,
Masahiro [JP/US]; 613 Radnor Valley Drive, Villanova,
Pennsylvania 19085 (US). PACIFICI, Maurizio [US/US];
440 South Broad Street, Philadelphia, Pennsylvania 19146
(US).

(74) Agents: RESNICK, David, S. et al.; Nixon Peabody LLP,
100 Summer St., Boston, Massachusetts 02110-2131 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,

DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

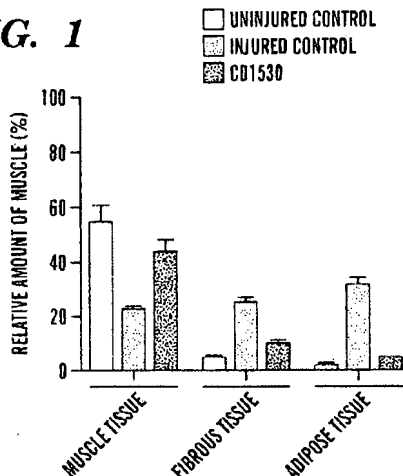
Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))

[Continued on next page]

(54) Title: COMPOSITION AND METHOD FOR MUSCLE REPAIR AND REGENERATION

FIG. 1



(57) Abstract: The invention provides methods for muscle repair or regeneration comprising administering therapeutically effective amounts of RAR agonists or stem cells that are pretreated with contact with a RAR agonist to a subject at a site of muscle damage. Additionally, the invention provides compositions comprising RAR agonist treated stem cells and methods of use of said cells for muscle repair or regeneration. In one embodiment, the stem cells are mesenchymal stem cells. In one embodiment, the RAR agonist is an RARY agonist. In one embodiment, administration of the RAR agonist is begun during a period of increased endogenous retinoid signaling in the subject resulting from incurrence of the damaged muscle tissue.

WO 2012/030919 A3

000073

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0011004
		Bogotá D.C., Febrero 05 de 2013 - 09:03:55

RECIBIDO DE : CLARKE MODET	NI 830.008.643
----------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	545480751	04/02/2013	12.500.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00 500.000.00
			\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-044010- -00000-0000

Fecha: 2013-03-05 15:11:01	Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII	Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION	Folios: 76

000074

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0021377
		Bogotá D.C., Marzo 04 de 2013 - 10:15:26

RECIBIDO DE : CLARKE MODET	NI 830.008.643
----------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	10073	01/02/2013		175.000.00
RECIBO DE CA	999999999	10134	01/02/2013		480.000.00
RECIBO DE CA	999999999	10182	01/02/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	10183	01/02/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	10184	01/02/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	10185	01/02/2013		530.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
59 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	1.770.000.00
			\$1.770.000.00

SON: **UN MILL&OACUTE;N SETECIENTOS SETENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-044010- -00000-0000

Fecha: 2013-03-05 15:11:01
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 76

000075

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

RESNICK, David, S.
Nixon Peabody LLP
100 Summer St.
Boston, Massachusetts 02110-2131
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 19 September 2011 (19.09.2011)	
Applicant's or agent's file reference 003252067701	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2011/049905	International filing date (day/month/year) 31 August 2011 (31.08.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address PACIFICI, Maurizio 303 Elm Avenue Swarthmore, Pennsylvania 19081 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address PACIFICI, Maurizio 440 South Broad Street Philadelphia, Pennsylvania 19146 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☒ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 71 30	Authorized officer Marquis Catherine e-mail pt09.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 09
---	---



No. 13-044010- -00000-0000

Fecha: 2013-03-05 15:11:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 76

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UT

- ☐
- ☐
- ☐
- ☐
- ☐

Indicación que se solicita una patente.

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Descripción de la invención

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒
- ☒
- ☒
- ☒

Indicación que se solicita una PCT

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐
- ☐
- ☐
- ☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐
- ☐
- ☐
- ☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica de un esquema de trazado

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐