



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 291 588**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/28 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03075116 .8**

(86) Fecha de presentación : **28.03.1996**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1304113**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **23.04.2003**

(54) Título: **Células estromales aisladas y métodos de uso de las mismas.**

(30) Prioridad: **28.03.1995 US 412066**
13.11.1995 US 6627 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2008

(73) Titular/es: **Thomas Jefferson University**
11th and Walnut Streets
Philadelphia, Pennsylvania 19107, US

(72) Inventor/es: **Prockop, Darwin, J.;**
Pereira, Ruth, F.;
Leeper, Dennis, B.;
O'Hara, Michael, D.;
Kulkosky, Joseph;
Phinney, Donald;
Laptev, Alexander y
Caro, Jose

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

DESCRIPCIÓN

Células estromales aisladas y métodos de uso de las mismas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de células estromales aisladas que se han aislado de una muestra de médula ósea obtenida de un donante singénico equilibrado normal, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que padece una enfermedad, trastorno o estado caracterizados por un defecto de huesos o cartílagos, en el que el donante es singénico con dicho paciente y en el que el medicamento es para administración a dicho paciente por infusión intravenosa, y al uso de células estromales aisladas que se han aislado de una muestra de médula ósea de un paciente y que se han cultivado en condiciones que producen replicación de dichas células estromales en un cultivo expandido de células estromales en la fabricación de un medicamento para tratar a un paciente que padece una enfermedad, trastorno o estado caracterizados por un gen mutado, que no funciona o subexpresado que produce un defecto en los huesos o cartílagos de dicho paciente, en el que dicho medicamento es para administración a dicho paciente por infusión intravenosa.

Fundamento de la invención

Además de células estaminales hematopoyéticas, la médula ósea contiene "células estromales", que son células precursoras mesenquimales (Friedenstein, A.J. *et al.*, Exp. Hemat. 4:267-274 (1976)), que se caracterizan por sus propiedades de adherencia cuando se separan células de médula ósea y se ponen en placas de plástico. En aproximadamente cuatro horas, las células estromales se adhieren al plástico y pueden aislarse así separando de las placas células no adheridas. Estas células de médula ósea que se adhieren estrechamente a plástico se han estudiado extensamente (Castro-Malaspina, H. *et al.*, Blood 56:289-301 (1980); Piersma, A.H. *et al.*, Exp. Hematol. 13:237-243 (1985); Simmons, P.J. y Torok-Storb, B., Blood 78:55-62 (1991); Beresford, J.N. *et al.*, J. Cell. Sci. 102:341-351 (1992); Liesveld, J.L. *et al.*, Blood 73:1794-1800 (1989); Liesveld, J.L. *et al.*, Exp. Hematol. 19:63-70 (1990); y Bennett, J.H. *et al.*, J. Cell. Sci. 99:131-139 (1991)). Según se usa aquí, la expresión "células adherentes" se entiende que se refiere a células estromales y la expresión "células no adherentes" se entiende que se refiere a células precursoras hematopoyéticas.

Se cree que las células estromales participan en la creación del microambiente con la médula ósea *in vivo*. Cuando se aíslan, las células estromales son inicialmente inactivas, pero comienzan eventualmente a dividirse de modo que pueden cultivarse *in vitro*. Pueden establecerse y mantenerse números expandidos de células estromales. Se han usado células estromales para generar colonias de células adipocíticas y osteogénicas fibroblásticas cuando se cultivan en condiciones apropiadas. Si se cultivan las células adherentes en presencia de hidrocortisona u otras condiciones selectivas, se obtienen poblaciones enriquecidas en precursores hematopoyéticos o células osteogénicas (Carter, R.F. *et al.*, Blood 79:356-364 (1992) y Bienzle, D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:350-354 (1994)).

Hay varios ejemplos del uso de células estromales. La Patente Europea EP 0.381.490, que se incorpora aquí como referencia, describe terapia génica usando células estromales. En particular, se describe un método para tratar hemofilia. Se han usado células estromales para producir tejido fibroso, hueso o cartílago cuando se implantan en tejidos selectivos *in vivo* (Ohgushi, H. *et al.*, Acta. Orthop. Scand. 60:334-339 (1989); Nakahara, H. *et al.*, J. Orthop. Res. 9:465-476 (1991); Niedzwiedski, T. *et al.*, Biomaterials 14:115-121 (1993); y Wakitani, S. *et al.*, J. Bone & Surg. 76A:579-592 (1994)). En algunos informes, se usan células estromales para generar hueso o cartílago *in vivo* cuando se implantan subcutáneamente con una cerámica porosa (Ohgushi, H. *et al.*, Acta. Orthop. Scand. 60:334-339 (1989)), intraperitonealmente en una cámara de difusión (Nakahara, H. *et al.*, J. Orthop. Res. 9:465-476 (1991)), percutáneamente en un defecto de hueso inducido quirúrgicamente (Niedzwiedski, T. *et al.*, Biomaterials. 14:115-121 (1993)) o se trasplantan dentro de un gen de colágeno para reparar un defecto quirúrgico en un cartílago de unión (Wakitani, S. *et al.*, J. Bone & Surg. 76A:579-592 (1994)). Piersma, A.H. *et al.*, Brit. J. Hematol. 54:285-290 (1983) describen que, después de trasplante intravenoso de médula ósea, las células formadoras de colonias de fibroblastos que forman el estroma hematopoyético se alojan y permanecen en la médula ósea del hospedante. Stewart *et al.* (Blood 81:2566-2571 (1993)) han observado recientemente que administraciones inusualmente grandes y repetidas de células de médula ósea producían injerto a largo plazo de precursores hematopoyéticos en ratones que no habían experimentado ablación de médula. También, Bienzle *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:350-354 (1994)) usaron con éxito cultivos de médula ósea a largo plazo como células donantes para poblar permanentemente células hematopoyéticas en perros sin ablación de médula. En algunos informes, se usaron células estromales como células que establecen un microambiente para el cultivo de precursores hematopoyéticos (Anklesaria, PNAS USA 84:7681-7685 (1987)) o como fuente de una población enriquecida de células estaminales hematopoyéticas (Kiefer, Blood 78(10):2577-2582 (1991)).

60 **Sumario de la invención**

La presente invención es como se define en las reivindicaciones.

Descripción breve de la figura

65 La Figura 1 muestra un esquema de las construcciones retrovíricas pCMV-lac Z, pCOLI-lac Z y pCOL2-lac Z. Las casettes de las construcciones génicas son: LTR-Neo-promotor-Lac Z-LTR.

La Figura 2 es una ilustración esquemática de una cámara de difusión.

Descripción detallada de la invención

Según se usan aquí, “células estromales”, “fibroblastos formadores de colonias”, “células estromales de médula”, “células adherentes” y “MSCs” se usan intercambiamente y pretenden referirse a la pequeña fracción de células de la médula ósea que pueden servir como precursores de tipo células estaminales de osteocitos, condrocitos y adipocitos, y que pueden aislarse de la médula ósea por su capacidad para adherirse a placas de plástico. Las células estromales pueden derivarse de cualquier animal. En algunas realizaciones, las células estromales se derivan de primates, preferiblemente seres humanos.

Según se usan aquí, “enfermedades, trastornos y estados caracterizados por un defecto génico” pretende referirse a enfermedades, trastornos y estados en los que genes defectuosos y/o una expresión de genes insuficiente están enlazados causalmente con la enfermedad o síntomas. Un individuo que tenga alguno entre varias enfermedades, trastornos y estados caracterizados por un defecto génico puede identificarse por los expertos ordinarios en la técnica. Los ejemplos de enfermedades, trastornos y estados caracterizados por un defecto génico incluyen, aunque sin limitarse a ellos, deficiencia de hormona del crecimiento, diabetes, deficiencia de adenina desaminasa, hemofilia A y hemofilia B. Los métodos y medios para diagnosticar cada uno de tales estados son muy conocidos.

Según se usa aquí, la expresión “enfermedad, trastorno o estado caracterizados por un defecto en huesos, cartílagos o pulmones” trata de referirse a enfermedades, trastornos y estados que son causados por una mutación genética en un gen que se expresa por células de huesos, células que componen cartílagos o células de pulmón de tal modo que uno de los efectos de tal mutación se manifiesta por una estructura y/o función anormales de los huesos, cartílagos y pulmones respectivamente.

Según se usa aquí, la expresión “enfermedad, trastorno o estado caracterizados por un defecto en la dermis, vasos sanguíneos, corazón y riñón” trata de referirse a enfermedades, trastornos y estados que son causados por una mutación genética en un gen que se expresa por células de la dermis, vasos sanguíneos, corazón y riñón de tal modo que uno de los efectos de tal mutación se manifiesta por una estructura y/o función anormales de la dermis, vasos sanguíneos, corazón y riñón respectivamente. Los ejemplos de enfermedades, trastornos y estados caracterizados por un defecto en la dermis incluyen quemaduras, úlceras de decúbito y úlceras diabéticas.

Según se usa aquí, “enfermedades, trastornos y estados caracterizados por un defecto génico de un gen que codifica una proteína segregada” pretende referirse a enfermedades, trastornos y estados caracterizados por un defecto génico en el que el gen que es defectuoso produce o codifica una proteína expresada insuficientemente que se segrega normalmente.

Según se usa aquí, “enfermedades, trastornos y estados que pueden tratarse con proteínas beneficiosas” pretende referirse a enfermedades, trastornos y estados que pueden tratarse o prevenirse por la presencia de una proteína que alivia, reduce, previene u ocasiona aliviar, reducir o prevenir las causas y/o síntomas que caracterizan la enfermedad, trastorno o estado. Las enfermedades, trastornos y estados que pueden tratarse con proteínas incluyen enfermedades, trastornos y estados caracterizados por un defecto génico, así como aquellos que no se caracterizan por un defecto génico pero que de ningún modo pueden tratarse o prevenirse por la presencia de una proteína que alivie, reduzca, prevenga o cause ser aliviados, reducidos o prevenidos las causas y/o síntomas que caracterizan la enfermedad, trastorno o estado.

Según se usan aquí, “aislado inmunológicamente”, “protegido inmunológicamente”, “neutralizado inmunológicamente” y “una manera que los aisle físicamente del sistema inmune del receptor” pretenden referirse a la encapsulación, contención u otra separación física de una célula implantada del cuerpo en el que se implanta, de tal modo que la célula no esté expuesta y no pueda eliminarse por el sistema inmune del cuerpo, de tal modo que las células que se aíslan inmunológicamente se administran de una manera que las aisle físicamente del sistema inmune del receptor. Los ejemplos de medios de aislamiento inmunológico incluyen, aunque sin limitarse a ellos, tecnologías y dispositivos bien conocidos tales como microencapsulación, matrices biocompatibles, cámaras de difusión, cartuchos implantables, dispositivos de implante con conjuntos de membranas y otros recipientes con membranas. Se prefiere que las células se aíslan inmunológicamente manteniéndolas con dispositivos de implante.

Según se usan aquí, “proteína beneficiosa” y “proteína heteróloga” son intercambiables y tratan de referirse a 1) proteínas que pueden compensar la proteína codificada por genes defectuosos y/o una expresión génica insuficiente que está enlazada causalmente con la enfermedad o síntomas en enfermedades, trastornos y estados caracterizados por un defecto génico y 2) proteínas cuya presencia alivia, reduce, previene o causa que se alivien, reduzcan o prevengan, las causas y/o síntomas que caracterizan enfermedades, trastornos y estados que pueden tratarse con proteínas beneficiosas.

Según se usa aquí, “construcción génica” pretende referirse a moléculas de ácidos nucleicos que incluyen secuencias de codificación que codifican proteínas beneficiosas enlazadas operativamente a elementos reguladores suficientes para la expresión de la secuencia de codificación en células estromales.

Según se usa aquí, “moléculas de ácidos nucleicos recombinantes extrañas” pretende referirse a moléculas de ácidos nucleicos recombinantes que no están presentes en células estromales o no se expresan como proteínas en niveles suficientemente altos en células estromales, hasta que se introducen en la célula por medios tales, aunque sin limitarse a ellos, como transfección clásica (CaPO₄ o DEAE dextrano), electroporación, microinyección, transferencia mediada por liposomas, transferencia mediada por compuestos químicos, transferencia mediada por ligando o transferencia con vector vírico recombinante.

Según se usa aquí, “gen heterólogo” pretende referirse a la secuencia de codificación de la construcción génica.

Según se usan aquí, las expresiones “material genético exógeno” y “gen exógeno” se usan intercambiamente y tratan de referirse a ADN genómico, cADN, ADN y ARN sintéticos, mARN y ADN y ARN antisentido que se introducen en la célula estromal. El material genético exógeno puede ser heterólogo o una copia o copias adicionales de material genético encontrado normalmente en el individuo o animal. Cuando se usan células como componente de una composición farmacéutica en un método para tratar enfermedades, estados o trastornos humanos, el material genético exógeno que se usa para transformar las células puede codificar proteínas seleccionadas como agentes terapéuticos usados para tratar al individuo y/o hacer a las células más propensas a trasplante.

Según se usa aquí, “células estromales transfectadas” pretende referirse a células estromales a las que se ha proporcionado una construcción génica mediante cualquier tecnología usada para introducir moléculas de ácido nucleico extraño en células tales como, aunque sin limitarse a ellas, transfección clásica (CaPO₄ o DEAE dextrano), electroporación, microinyección, transferencia mediada por liposomas, transferencia mediada por compuestos químicos, transferencia mediada por ligando o transferencia de vector vírico recombinante.

Algunos aspectos descritos aquí proceden del descubrimiento de que algunas células estromales que se introducen en un paciente se desarrollan en huesos, cartílagos y pulmón mientras otras permanecen células precursoras que emiten células hijas que se desarrollan en huesos, cartílagos y pulmón. Este descubrimiento permite el tratamiento con éxito de individuos que padecen enfermedades, estados y trastornos asociados con defectos en células de huesos, cartílagos o pulmón proporcionando a tales individuos células estromales de un donante singénico equilibrado normal o aislando células estromales del paciente, cultivándolas y modificándolas genéticamente para corregir cualquier defecto genético que sea responsable de las enfermedades, estados y trastornos asociados con defectos en células de huesos, cartílagos o pulmón. De modo similar, se cree que se desarrollarán también células estromales en células de la dermis, vasos sanguíneos, corazón y riñones, o emitirán células hijas que lo hagan así.

El descubrimiento de que células estromales cultivadas aisladas repueblan tejidos, particularmente tejido de huesos, cartílagos y pulmón, cuando se administran a la corriente sanguínea de un individuo, las hace adecuadas para tratar individuos que padecen enfermedades, estados y trastornos asociados con defectos en células de huesos, cartílagos o pulmón. El descubrimiento de que algunas células estromales cultivadas aisladas, cuando se administran a la corriente sanguínea de un individuo, actúan como células precursoras que producen células hijas que maduran después en células diferenciadas, hace a esto particularmente útil porque permite la presencia a largo plazo y continuada de células normales o modificadas genéticamente donadas sin necesidad de readministración continua de células. De manera similar, el desarrollo de células estromales en células de la dermis, vasos sanguíneos, corazón y riñones, o la emisión de células hijas, permite el tratamiento de enfermedades efectuando esos tejidos por medios similares.

Por consiguiente, pueden administrarse intravenosamente células estromales de un donante equilibrado a individuos que padecen enfermedades que implican células de huesos, cartílagos o pulmón, o células de dermis, vasos sanguíneos, corazón o riñón, con el fin de aumentar o sustituir las células de huesos, cartílagos o pulmón, o células de dermis, vasos sanguíneos, corazón o riñón, del individuo. Pueden administrarse intravenosamente células estromales de un donante equilibrado a individuos que padecen enfermedades asociadas con expresión génica defectuosa en células de huesos, cartílagos o pulmón, o células de dermis, vasos sanguíneos, corazón o riñón, con el fin de sustituir las células de huesos, cartílagos o pulmón, o células de dermis, vasos sanguíneos, corazón o riñón, del individuo, que no expresan o subexpresan un gen normal y/o expresan un escenario mutado. También pueden transfectarse células estromales con genes heterólogos en métodos de terapia de genes. Según tales aspectos, pueden separarse células estromales de un donante equilibrado o células estromales de un individuo y alterarse genéticamente antes de reintroducir las células en el individuo. Las células pueden alterarse genéticamente para introducir un gen cuya expresión tiene efecto terapéutico en el individuo. Según algunos aspectos descritos aquí, pueden alterarse genéticamente células estromales de un individuo para sustituir un gen defectuoso y/o introducir un gen cuya expresión tiene efecto terapéutico en el individuo.

En algunos aspectos descritos aquí, pueden tratarse individuos que padecen enfermedades y trastornos que afectan a los huesos y que se caracterizan por un defecto genético, suplementando, aumentando y/o sustituyendo células de huesos defectuosas o deficientes con células que expresan correctamente un gen normal. Las células pueden derivarse de células estromales de un donante equilibrado normal o células estromales del individuo a tratar. Si se derivan del individuo a tratar, las células pueden modificarse genéticamente para corregir el defecto. Un ejemplo de una enfermedad o trastorno que afecta a huesos y que se caracteriza por un defecto genético es osteogénesis imperfecta. Otro ejemplo de una enfermedad o trastorno que afecta a huesos y que se caracteriza por un defecto genético es osteoporosis. La osteoporosis se considera frecuentemente como una enfermedad multifactorial a la que contribuyen factores ambientales tales como dieta y ejercicio. Sin embargo, estudios de la enfermedad en gemelos, grandes familias y poblaciones grandes demuestran que muchos individuos desarrollan la enfermedad principalmente debido a un defecto

genético (véase Morrison *et al.* Nature 367:284-287 (1994)). Pueden administrarse a individuos que padecen osteogénesis imperfecta células estromales de un donante equilibrado normal que sustituyen a las células de los huesos en el individuo que tienen un gen de colágeno mutado. En tales realizaciones, las células normales compensarán las células defectuosas. En algunas realizaciones, las células normales pueden prepararse a partir de las células estromales propias del individuo, porque células con un defecto colaginoso mutado tienen una desventaja de crecimiento en comparación con células normales cuando se desarrollan en cultivo. Por tanto, si se desarrollan en cultivo células estromales de un individuo con osteogénesis imperfecta, resultarán enriquecidas gradualmente por células normales. Esta realización será particularmente eficaz si el individuo es un mosaico para el colágeno mutado, de modo que algunas de sus células contienen el colágeno mutado y otras no. En una realización alternativa, se aíslan células estromales de un individuo que padece osteogénesis imperfecta y se inserta un gen normal para colágeno I en las células estromales aisladas. Las células transfectadas se reintroducen después en el individuo. Unos pocos individuos que padecen osteoporosis tienen también mutaciones en uno de los dos genes para colágeno I, y las mismas realizaciones compensarán las células defectuosas. En muchos individuos con osteoporosis, los genes en defecto son aún desconocidos, pero probablemente serán identificados pronto. En tales individuos, células normales compensarán el defecto. También, cuando se identifican y aíslan los genes en defecto, una realización alternativa será aislar células estromales del individuo, insertar copia o copias normales del gen mutado y reintroducir las células en el individuo.

En algunos aspectos descritos aquí, pueden tratarse individuos que padecen enfermedades y trastornos que afectan a cartílagos y que se caracterizan por un defecto genético suplementando, aumentando y/o sustituyendo células defectuosas con células que expresan correctamente un gen normal. Las células pueden derivarse de células estromales de un donante equilibrado normal o células estromales del individuo a tratar. Si se derivan del individuo a tratar, las células pueden modificarse genéticamente para corregir el defecto. Un ejemplo de una enfermedad o trastorno que afecta a cartílagos y que se caracteriza por un defecto genético es condrodisplasia, que ocasiona enanismo grave, problemas graves con articulaciones y problemas relacionados. Pueden administrarse a individuos que padecen condrodisplasia células estromales de un donante equilibrado normal que sustituyen a las células que producen cartílago en el individuo que tiene un gen de colágeno mutado. En tales realizaciones, las células normales compensarán a las células defectuosas. En una realización alternativa, se aíslan células estromales de un individuo que padece condrodisplasia y se inserta un gen normal para colágeno II en las células estromales aisladas. Las células transfectadas se reintroducen después en el individuo. La realización con el gen de colágeno II será útil para el 20% al 90% de los individuos con diversos tipos de condrodisplasia grave. Los restantes individuos con condrodisplasia tienen mutaciones en otros genes de colágeno (colágeno X y X1), en otros genes (receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 3) y en genes no identificados todavía. En tales individuos, las células normales compensarán las células defectuosas. También, una realización alternativa será aislar células estromales del individuo, insertar una copia o copias normales del gen mutado y reintroducir las células en el individuo. Otro ejemplo de una enfermedad o trastorno que afecta a cartílagos es osteoartritis. La osteoartritis es una enfermedad heterogénea en términos de etiología y manifestaciones. Algunos individuos desarrollan la degeneración de cartílagos en articulaciones que caracterizan a la osteoartritis debida a trauma o las secuelas tardías de infecciones. Unos pocos individuos desarrollan osteoartritis en múltiples articulaciones debida a mutaciones en el gen de colágeno II similares a las mutaciones en el gen que causa condrodisplasia. Tales individuos pueden o no mostrar signos de una condrodisplasia leve. La causa de la osteoartritis en otros individuos es desconocida, pero estudios en grandes familias sugieren que la enfermedad es hereditaria y causaba por tanto mutaciones en genes no identificados todavía. Por tanto, las mismas realizaciones que serán útiles para compensar genes mutados en individuos con condrodisplasia serán útiles también para muchos individuos con osteoartritis.

En algunos aspectos descritos aquí, pueden tratarse individuos que padecen enfermedades y trastornos que afectan a los pulmones y que se caracterizan por un defecto genético suplementando, aumentando y/o sustituyendo células defectuosas con células que expresan correctamente un gen normal. Las células pueden derivarse de células estromales de un donante equilibrado normal o células estromales del individuo a tratar. Si se derivan del individuo a tratar, las células pueden modificarse genéticamente para corregir el defecto. Un ejemplo de una enfermedad o trastorno que afecta a los pulmones y que se caracteriza por un defecto genético es fibrosis quística. Otro ejemplo de una enfermedad o trastorno que afecta a los pulmones y que se caracteriza por un defecto genético es deficiencia de $\alpha 1$ -antitripsina. Pueden administrarse a individuos que padecen fibrosis quística células estromales de un donante equilibrado normal que tenga una fibrosis quística normal para sustituir o suplementar las células del pulmón en el individuo que tenga un gen de fibrosis quística mutado. En tales realizaciones, las células normales compensarán las células defectuosas. En una realización alternativa, se aíslan células estromales de un individuo que padece fibrosis quística y se inserta un gen de fibrosis quística normal en las células estromales aisladas. Las células transfectadas se reintroducen después en el individuo.

En algunos aspectos, los individuos que padecen enfermedades de los huesos, cartílagos y pulmones, así como los que padecen enfermedades de la dermis, vasos sanguíneos, corazón y riñones, pueden tratarse mediante células estromales aisladas, expandiendo su número y administrando sistemáticamente las células estromales rejuvenecidas expandidas. Algunas de las células estromales rejuvenecidas se desarrollarán en células de huesos, cartílagos, pulmón, dermis, vasos sanguíneos, corazón o riñones normales. Las células estromales normales se expanden más rápidamente que las defectuosas y la población rejuvenecida expandida reflejará una mayor proporción de células normales. La Tabla 1 describe medios útiles para cultivar cultivos rejuvenecidos expandidos de células estromales aisladas.

Además de la sustitución de células que son defectuosas con células reparadas o células normales de donantes equilibrados, se describe también el uso para expresar proteínas deseadas que se segregan. Es decir, pueden aislarse células estromales, proporcionarse con un gen para una proteína deseada e introducirse en un individuo dentro del cual

se produciría la proteína deseada y ejercería o produciría de otro modo un efecto terapéutico. Este aspecto se refiere a una terapia génica en la que se administran a un individuo proteínas terapéuticas.

Según algunos aspectos descritos aquí, se usan células estromales transfectadas aisladas inmunológicamente como terapéutica celular para tratar enfermedades, trastornos y estados caracterizados por un defecto génico y/o enfermedades, trastornos y estados que pueden tratarse con proteínas. En particular, se introducen en células estromales construcciones génicas que comprenden genes heterólogos que codifican proteínas beneficiosas. Las células estromales transfectadas se aíslan después inmunológicamente y se implantan en un individuo que se beneficiará cuando se exprese y segregue la proteína por la célula en el cuerpo.

Son particularmente útiles células estromales aisladas inmunológicamente en composiciones terapéuticas de células, porque, además de ser hospedantes adecuados para expresar genes heterólogos y producir proteínas heterólogas, las células estromales funcionan favorablemente cuando están aisladas inmunológicamente. Las células estromales aisladas inmunológicamente tienen una viabilidad muy alta cuando se implantan en localizaciones que carecen de un suministro de sangre vascular directo. Además, las células estromales pueden obtenerse fácil y rápidamente, y se expanden rápidamente en cultivo haciéndolas una buena fuente de un suministro adecuado de células útiles para terapéutica de células aisladas inmunológicamente.

Por consiguiente, se introducen en células estromales construcciones génicas que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican proteínas heterólogas. Esto es, las células se alteran genéticamente para introducir un gen cuya expresión tiene efecto terapéutico en el individuo. Según algunos aspectos descritos aquí, pueden alterarse genéticamente células estromales de un individuo o de otro individuo o de un animal no humano para sustituir un gen defectuoso y/o para introducir un gen cuya expresión tiene efecto terapéutico en el individuo.

Por consiguiente, las células estromales son útiles para preparar células transfectadas que pueden aislarse inmunológicamente y expresar genes beneficiosos heterólogos, que proporcionan el medio para corregir defectos genéticos y/o producir proteínas terapéuticas. Las células estromales pueden aislarse con relativa facilidad y las células estromales aisladas pueden cultivarse para aumentar el número de células disponibles. Las células estromales pueden transfectarse, aislarse inmunológicamente e implantarse con un alto grado de viabilidad en localizaciones que carecen de suministro de sangre directo tales como localizaciones subcutáneas. En algunas realizaciones, las células estromales pueden immortalizarse tal como mediante virus SV40 o proteínas con propiedades transformadoras.

En algunos aspectos descritos aquí, pueden tratarse individuos que padecen enfermedades y trastornos genéticos suplementando, aumentando y/o sustituyendo genes defectuosos o deficientes, proporcionando células estromales aisladas inmunológicamente que contienen construcciones génicas que incluyen copias de funcionamiento, normales, del gen deficiente. Este aspecto se refiere a terapia génica en la que se proporcionan al individuo genes para los que es deficitario en presencia y/o función. Los genes proporcionados en la terapéutica de células compensan el gen defectuoso del individuo. Tales genes codifican preferiblemente proteínas que son segregadas.

Las células estromales se transfectan y aíslan inmunológicamente. En algunas realizaciones, se transfectan células estromales con genes de los que el individuo a tratar padece una ausencia completa de una copia no mutada del gen, o padece ausencia o expresión insuficiente de una forma no mutada de la proteína. Las células estromales se transfectan con una copia no mutada del gen en forma expresable. Es decir, la proteína codificada por el gen transfectado se expresará por las células estromales, preferiblemente como una proteína segregada. Los ejemplos de enfermedades, estados o trastornos en los que genes defectuosos o expresión insuficiente de genes están enlazados causalmente con la enfermedad o síntomas incluyen, aunque sin limitarse a ellos, deficiencia de hormona del crecimiento, diabetes, deficiencia de adenina desaminasa, hemofilia A y hemofilia B. Otras enfermedades genéticas que pueden tratarse usando métodos de la invención incluyen: deficiencia de $\alpha 1$ -antitripsina, enfermedad de Fabry, hipercolesterolemia familiar, enfermedad de Gaucher, síndrome de Lesch-Nyhan, enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce, deficiencia de ornitina transcarbamilasa, fenilcetonuria, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Tay-Sachs y enfermedad de Willebrand. Introduciendo genes normales en forma expresable que codifican hormona del crecimiento, insulina, adenina transaminasa o un factor de coagulación de la sangre apropiados, pueden proporcionarse a individuos que padecen deficiencia de hormona del crecimiento, diabetes, deficiencia de adenina desaminasa y hemofilia, respectivamente, los medios para compensar defectos genéticos y eliminar, aliviar o reducir algunos o todos los síntomas asociados con tales enfermedades. Las Tablas IV y V contienen listas parciales de enfermedades, estados y trastornos que pueden tratarse usando la presente invención.

Además de sustituir genes que son defectuosos con genes funcionales, se describe también el uso para expresar proteínas segregadas deseadas que ejercen un efecto terapéutico o profiláctico activo biológicamente. Tales proteínas se segregan preferiblemente por las células. Es decir, pueden aislarse células estromales, proveerse con un gen para una proteína deseada, aislarse inmunológicamente e introducirse en un individuo dentro del cual se produciría la proteína deseada y ejercería o produciría de otro modo un efecto terapéutico. Este aspecto se refiere a terapia génica en la que se administran a un individuo proteínas terapéuticas. Según estos aspectos, las células estromales aisladas son vectores para introducir genes terapéuticos en el individuo, así como hospedantes para tales genes cuando se administran las células al individuo.

En tales realizaciones, se transfectan células estromales con genes que codifican proteínas que tendrán un efecto terapéutico cuando se expresen en el individuo a tratar. En lugar de administrar la proteína terapéutica directamente y

en una serie de intervalos de tiempo, se proporcionan medios para administrar una proteína terapéutica continuamente administrando células que producen la proteína. Las células estromales se transfectan con un gen que codifica la proteína en forma expresable. Es decir, la proteína codificada por el gen transfectado se expresará por las células estromales, preferiblemente como una proteína segregada. Los ejemplos de proteínas terapéuticas incluyen, aunque sin limitarse a ellos, factor de obesidad (Considine, R.V. *et al.*, J. Clin. Invest., 1995, 95, 2986-2988; Amer, P., N. Engl. J. Med., 1995, 333, 382; Emorine, L. *et al.*, Trends Pharmacol. Sci. 1994, 15, 3; Flier, J.S., Cell, 1995, 80, 15; Lowell, B.B. *et al.*, J. Clin. Invest., 1995, 95, 923; Y Rink, T.J. *et al.*, Nature, 1994, 372, 406), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, factor estimulante de colonias de granulocitos, eritropoyetina, proteína de antagonista de receptor de interleuquina-2 e interleuquina-1. Las Tablas IV y V contienen listas parciales de enfermedades, estados y trastornos que pueden tratarse usando la presente invención y contiene los nombres de las proteínas que pueden entregarse mediante construcción génica.

En todos los casos en los que se transfecta una construcción génica en una célula estromal, el gen heterólogo se enlaza operativamente a secuencias reguladoras requeridas para conseguir la expresión del gen en la célula estromal. Tales secuencias reguladoras incluyen un promotor y una señal de poliadenilación.

La construcción génica se proporciona preferiblemente como un vector de expresión que incluye la secuencia de codificación para una proteína heteróloga enlazada operativamente a secuencias reguladoras esenciales de tal modo que, cuando se transfecta el vector en la célula, la secuencia de codificación será expresada por la célula. La secuencia de codificación está enlazada operativamente a los elementos reguladores necesarios para expresión de esa secuencia en las células. La secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede ser cADN, ADN genómico, ADN sintetizado o un híbrido de ellos o una molécula de ARN tal como mRNA.

La construcción génica que incluye la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína beneficiosa enlazada operativamente con los elementos reguladores puede permanecer presente en la célula como una molécula citoplásmica que funciona, una molécula episómica que funciona o puede integrarse en el ADN cromosómico de la célula. Puede introducirse en las células material genético exógeno en donde permanece como material genético separado en forma de un plásmido. Alternativamente, puede introducirse en la célula ADN lineal que puede integrarse en el cromosoma. Cuando se introduce ADN en la célula, pueden añadirse reactivos que promueven la integración de ADN en cromosomas. También pueden introducirse en la molécula de ADN secuencias de ADN que son útiles para promover la integración. Alternativamente, puede introducirse ARN en la célula.

Los elementos reguladores necesarios para expresión génica incluyen: un promotor, un codón de iniciación, un codón de detención y una señal de poliadenilación. Es necesario que estos elementos sean operativos en las células estromales o en las células que surgen de las células estromales tras infusión en un individuo. Además, es necesario que estos elementos estén enlazados operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína, de tal modo que la secuencia de nucleótidos pueda expresarse en las células estromales y pueda así producirse la proteína. Los codones de iniciación y el codón de detención se consideran generalmente parte de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína. Sin embargo, es necesario que estos elementos sean funcionales en las células estromales o las células que surgen de las células estromales. De manera similar, los promotores y las señales de poliadenilación usados deben ser funcionales dentro de las células estromales o las células que surgen de las células estromales. Los ejemplos de promotores útiles incluyen, aunque sin limitarse a ellos, promotores que son activos en muchas células tales como el promotor del virus citomegálico, los promotores de SV40 y promotores retrovíricos. Otros ejemplos de promotores útiles incluyen, aunque sin limitarse a ellos, promotores específicos para tejidos, es decir, promotores que funcionan en algunos tejidos pero no en otros; también, promotores de genes expresados normalmente en células estromales con o sin secuencias aumentadoras específicas o generales. En algunas realizaciones, se usan promotores que expresan constitutivamente genes en células estromales con o sin secuencias aumentadoras. Se proporcionan secuencias aumentadoras en tales realizaciones cuando es apropiado o deseable.

Según algunas realizaciones, genes deseados para transfección en células estromales están enlazados operativamente al promotor de procolágeno I humano, el promotor de procolágeno II humano y el promotor de procolágeno III humano. En algunas realizaciones, los genes están enlazados a fragmentos 5' relativamente cortos del gen COL1A1 o COL2A1 que comprenden el promotor junto con alguna de las secuencias traducidas y/o no traducidas 5' del gen. En algunas realizaciones, el gen a transfectar está enlazado operativamente a una secuencia que contiene un fragmento *SphI-HindIII* de 1,9 kb del extremo 5' del COL1A1 humano. El fragmento contiene de -476 pb a +1440 pb del gen COL1A1 y, por tanto, incluye el promotor (476 pb), el exón 1 (222 pb) y buena parte del intrón 1 (1223 pb de un total de 1453 pb). En algunas realizaciones, el gen a transfectar está enlazado operativamente a una secuencia que contiene un fragmento del extremo 5' del COL2A1 humano. En algunas realizaciones, el fragmento contiene -4,0 kb del promotor de COL2A1 y el gen COL2A1 completo, uno o más exones e intrones secuencialmente desde el exón 1 al exón 15 y el intrón 1 al intrón 14. Algunas construcciones pueden diseñarse como se indica en la Patente de los EE.UU. N° de Serie 08/184.260 en tramitación junto con la presente, presentada el 18 de Enero de 1994, titulada "Métodos para fijar como objetivo inserción de ADN en genoma", que se incorpora aquí como referencia.

Los ejemplos de señales de poliadenilación útiles para practicar la presente invención incluyen, aunque sin limitarse a ellas, señal de poliadenilación de colágeno I humano, señal de poliadenilación de colágeno II humano y señal de poliadenilación de SV40.

Con el fin de expresar material genético exógeno en un vector de expresión, los elementos reguladores deben estar enlazados operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína. Con el fin de maximizar la producción de proteína, deben seleccionarse secuencias reguladoras que sean adecuadas para expresión génica en las células deseadas. Además, pueden seleccionarse codones que se transcriban más eficazmente en la célula. Un experto ordinario en la técnica puede producir material genético exógeno como vectores de expresión que sean funcionales en las células deseadas.

También se considera que pueden seleccionarse elementos reguladores para proporcionar expresión específica para tejido de la proteína. Así, por ejemplo, pueden proporcionarse promotores específicos de tal modo que el gen heterólogo se exprese solamente en tejido en el que se implantan las células estromales aisladas inmunológicamente.

La proteína heteróloga incluye preferiblemente una secuencia señal que dirige el transporte y secreción de la proteína heteróloga en la célula estromal. Las secuencias señal se elaboran generalmente y se separan por secreción de la proteína madura desde la célula.

Además de proporcionar células con material genético que 1) corrige defectos genéticos en las células, 2) codifica proteínas que de otro modo no están presentes en cantidades suficientes y/o condición funcional de modo que el material genético corrija defectos genéticos del individuo y/o 3) codifica proteínas que son útiles como terapéuticos en el tratamiento o prevención de una enfermedad, estado o trastorno particular o síntomas asociados con ellos, también puede introducirse material genético en las células estromales usadas en la presente invención para proporcionar un medio para terminar selectivamente con tales células si tal terminación resulta deseable. Tales medios para fijar como objetivo células a destruir pueden introducirse en células estromales que hayan de ser modificadas genéticamente así como aquellas en las que no ha de introducirse otro material genético exógeno.

Se proporciona a células estromales aisladas material genético que las hace susceptibles específicamente a destrucción. Por ejemplo, las células estromales pueden proporcionarse con genes que codifican un receptor que puede fijarse como objetivo específicamente con un agente citotóxico. Puede introducirse en las células una forma expresable de un gen que puede usarse para inducir muerte de células selectiva. En tal sistema, células que expresan la proteína codificada por el gen son susceptibles a destrucción con objetivo fijado en condiciones específicas o en presencia o ausencia de agentes específicos. Por ejemplo, puede introducirse en las células una forma expresable de un gen de timidina quinasa del virus del herpes (herpes tk) y usarse para inducir muerte de células selectiva. Cuando se introduce en el individuo el material genético exógeno que incluye gen de (herpes tk), se producirá herpes tk. Si es deseable o necesario destruir las células implantadas, puede administrarse al individuo el fármaco ganciclovir y ese fármaco causará la destrucción selectiva de cualquier célula que produzca herpes tk. Así, puede proporcionarse un sistema que permita la destrucción selectiva de células implantadas.

Los que tengan experiencia ordinaria en la técnica pueden identificar individuos que padezcan enfermedades genéticas tales como las listadas en las Tablas IV y V incluyendo deficiencia de hormona del crecimiento, diabetes, deficiencia de adenina desaminasa y hemofilia, usando rutinariamente procedimientos de diagnóstico estándares.

Pueden obtenerse células estromales separando células de médula ósea de un donante y poniendo las células en un recipiente estéril con una superficie de plástico u otra superficie apropiada con la que tomen contacto las células. Las células estromales se adherirán a la superficie de plástico en 30 minutos a aproximadamente 3 días. Después de al menos 30 minutos, preferiblemente alrededor de cuatro horas, las células no adheridas pueden separarse y desecharse. Las células adheridas son células estromales que son inicialmente no divisorias. Sin embargo, después de aproximadamente 2-4 días, las células comienzan a proliferar y pueden cultivarse para aumentar sus números usando técnicas de cultivo de células estándares.

Según realizaciones preferidas, se cultivan células estromales en medio suplementado con 2-20% de suero de becerro fetal o medio exento de suero con o sin suplementos adicionales.

Pueden transfectarse células estromales aisladas usando técnicas muy conocidas disponibles fácilmente para los expertos ordinarios en la técnica. Pueden introducirse genes extraños en células estromales por métodos estándares que se emplean para introducir construcciones génicas en una célula que expresará las proteínas codificadas por los genes. En algunas realizaciones, se transfectan células mediante transfección por precipitación de fosfato cálcico, transfección con DEAE dextrano, electroporación, microinyección, transferencia mediada por liposomas, transferencia mediada por compuestos químicos, transferencia mediada por ligando o transferencia con vector vírico recombinante.

En algunas realizaciones, se usan vectores adenovirus recombinantes para introducir ADN con secuencias deseadas en la célula estromal. En algunas realizaciones, se usan vectores retrovirus recombinantes para introducir ADN con secuencias deseadas en la célula estromal. En algunas realizaciones, se emplean técnicas de transfección mediadas por CaPO_4 estándar, DEAE dextrano o vehículo lípido para incorporar ADN deseado en células divisorias. Pueden usarse técnicas de selección por resistencia a antibióticos estándares para identificar y seleccionar células transfectadas. En algunas realizaciones, se introduce directamente ADN en células por microinyección. De manera similar, pueden usarse técnicas de electroporación o bombardeo de partículas muy conocidas para introducir ADN extraño en células estromales aisladas. Un segundo gen se co-transfecta o enlaza usualmente al gen terapéutico. El segundo gen se frecuentemente un gen de resistencia a antibióticos seleccionable. Pueden seleccionarse células transfectadas haciendo crecer las células en un antibiótico que matará células que no absorban el gen seleccionable. En muchos casos, en los

que los dos genes están no enlazados y se co-transfectan, las células que sobreviven al tratamiento con antibióticos tienen ambos genes en ellas y expresan ambos.

Después de aislar las células estromales, las células pueden administrarse tras aislamiento o después de haber sido cultivadas. Se administran células estromales aisladas tras aislamiento en aproximadamente una hora después del aislamiento. Generalmente, pueden administrarse células estromales inmediatamente tras aislamiento en situaciones en las que el donante es mayor y el receptor es un niño. Se prefiere que se cultiven células estromales antes de las administraciones. Pueden cultivarse células estromales aisladas desde 1 hora hasta más de un año. En algunas realizaciones preferidas, las células estromales aisladas se cultivan antes de la administración durante un período de tiempo suficiente para convertirlas de células sin ciclación en replicantes. En algunas realizaciones, las células estromales aisladas se cultivan durante 3-30 días, preferiblemente 5-14 días, más preferiblemente 7-10 días. En algunas realizaciones, las células estromales aisladas se cultivan durante 4 semanas a un año, preferiblemente de 6 semanas a 10 meses, más preferiblemente 3-6 meses.

Si se transfectan las células, 1) se transfectan primero células estromales sin ciclación aisladas y se administran después como células sin ciclación, 2) se transfectan primero células estromales sin ciclación aisladas, se cultivan después durante un período de tiempo suficiente para convertir de células sin ciclación a replicantes y se administran después, 3) se cultivan primero células estromales sin ciclación aisladas durante un período de tiempo suficiente para convertir de células sin ciclación a replicantes, se transfectan después y se administran después, o 4) se cultivan primero células estromales sin ciclación aisladas durante un período de tiempo suficiente para convertir de células sin ciclación a replicantes, se transfectan después, se cultivan después y se administran después. En algunas realizaciones, las células estromales se aíslan, transfectan y administran inmediatamente. Se prefiere cultivar células estromales antes de la transfección y/o administraciones. Pueden cultivarse células estromales aisladas durante 3-30 días, en algunas realizaciones 5-14 días, en algunas realizaciones 7-10 días antes de la transfección. Las células estromales transfectadas pueden cultivarse durante 3-30 días, en algunas realizaciones 5-14 días, en algunas realizaciones 7-10 días antes de la administración. Pueden cultivarse células estromales aisladas durante 3-30 días, en algunas realizaciones 5-14 días, en algunas realizaciones 7-10 días antes de la transfección y, después de la transfección, se cultivan adicionalmente durante 3-30 días, en algunas realizaciones 5-14 días, en algunas realizaciones 7-10 días, antes de la administración. En algunas realizaciones, las células estromales aisladas se cultivan durante 4 semanas a un año, en algunas realizaciones 6 semanas a 10 meses, en algunas realizaciones 3-6 meses, antes de la transfección. Las células estromales transfectadas pueden cultivarse durante 4 semanas a un año, en algunas realizaciones 6 semanas a 10 meses, en algunas realizaciones 3-6 meses antes de la administración. En algunas realizaciones, las células estromales aisladas se cultivan durante 4 semanas a un año, en algunas realizaciones 6 semanas a 10 meses, en algunas realizaciones 3-6 meses antes de la transfección y, después de la transfección, se cultivan adicionalmente durante 4 semanas a un año, en algunas realizaciones 6 semanas a 10 meses, en algunas realizaciones 3-6 meses antes de la administración.

Pueden transfectarse células estromales aisladas usando técnicas muy conocidas disponibles fácilmente para los expertos ordinarios en la técnica. En algunas realizaciones, se usan vectores adenovirus recombinantes para introducir ADN con secuencias deseadas en la célula estromal. En algunas realizaciones, se emplean técnicas de transfección mediadas por CaPO_4 , DEAE dextrano o vehículo lípido para incorporar ADN deseado a células divisorias. Pueden usarse técnicas de selección por resistencia a antibióticos estándares para identificar y seleccionar células transfectadas. En algunas realizaciones, se introduce ADN directamente en células por microinyección. De manera similar, pueden usarse técnicas de electroporación o bombardeo de partículas muy conocidas para introducir ADN extraño en células estromales aisladas.

Para administración de células estromales, las células estromales aisladas se separan de placas de cultivo, se lavan con solución salina, se centrifugan hasta un glóbulo y se resuspenden en una solución de glucosa que se administra por infusión al paciente. En algunas realizaciones, se emprende ablación de médula ósea antes de la infusión con el fin de hacer espacio en el hueso para células introducidas. La ablación de médula ósea puede conseguirse aplicando rayos X al individuo a tratar, administrando fármacos tales como ciclofosfamida o mediante una combinación de radiación X y administración de fármacos. En algunas realizaciones, la ablación de médula ósea se produce por administración de radioisótopos de los que se sabe que destruyen células de huesos metastáticas tales como, por ejemplo, estroncio radioactivo, $^{135}\text{samario}$ o $^{166}\text{holmio}$ (véase Applebaum, F.R. *et al.* 1992 Blood 80(6): 1608-1613).

Si la ablación de médula ósea precede a la administración de células estromales, la administración de células estromales debe acompañarse por la administración de células no adherentes, que comprenden precursores de células sanguíneas necesarios para supervivencia. Tales células no adherentes pueden rescatarse de la misma muestra usada como materiales de partida en el aislamiento de células estromales y guardarse, o pueden derivarse de una muestra diferente. En algunas realizaciones preferidas, las células no adherentes se proporcionan por el receptor/paciente. Antes de los procedimientos que generan ablación de médula ósea, se obtiene y guarda una muestra de la médula ósea del paciente/receptor. Puede usarse la muestra completa o las células no adherentes pueden aislarse y usarse para administrar conjuntamente con células estromales aisladas. Las células no adherentes administradas conjuntamente con la administración de células estromales pueden administrarse separadamente antes o después de la administración de células estromales o pueden mezclarse con células estromales aisladas antes de la administración.

La ablación de médula ósea es opcional. En algunas realizaciones, se produce ablación de médula ósea parcial pero no completa antes de la administración de células estromales. En algunas realizaciones, se administran células estromales sin ninguna ablación de médula ósea.

Se administran por infusión entre 10^7 y 10^{13} células por 100 kg de persona. En algunas realizaciones, se administran por infusión intravenosamente entre aproximadamente $1-5 \times 10^6$ y $1-5 \times 10^{12}$ células por 100 kg de persona. En algunas realizaciones, se administran por infusión intravenosamente entre aproximadamente 1×10^9 y 5×10^{11} células por 100 kg de persona. En algunas realizaciones, se administran por infusión 4×10^9 células por 100 kg de persona. En algunas realizaciones, se administran por infusión 2×10^{11} células por 100 kg de persona.

En algunas realizaciones, se proporciona una administración simple de células. En algunas realizaciones, se proporcionan administraciones múltiples. En algunas realizaciones, se proporcionan administraciones múltiples durante el transcurso de 3-7 días consecutivos. En algunas realizaciones, se proporcionan 3-7 administraciones durante el transcurso de 3-7 días consecutivos. En algunas realizaciones, se proporcionan 5 administraciones durante el transcurso de 5 días consecutivos.

En algunas realizaciones, se proporciona una administración simple de entre 10^7 y 10^{13} células por 100 kg de persona. En algunas realizaciones, se proporciona una administración simple de entre aproximadamente $1-5 \times 10^8$ y $1-5 \times 10^{12}$ células por 100 kg de persona. En algunas realizaciones, se proporciona una administración simple de entre aproximadamente 1×10^9 y 5×10^{11} células por 100 kg de persona. En algunas realizaciones, se proporciona una administración simple de 4×10^9 células por 100 kg de persona. En algunas realizaciones, se proporciona una administración simple de 2×10^{11} células por 100 kg de persona.

En algunas realizaciones, se proporcionan administraciones múltiples de entre 10^7 y 10^{13} células por 100 kg de persona. En algunas realizaciones, se proporcionan administraciones múltiples de entre aproximadamente $1-5 \times 10^8$ y $1-5 \times 10^{12}$ células por 100 kg de persona. En algunas realizaciones, se proporcionan administraciones múltiples de entre aproximadamente 1×10^9 y 5×10^{11} células por 100 kg de persona durante el transcurso de 3-7 días consecutivos. En algunas realizaciones, se proporcionan administraciones múltiples de 4×10^9 células por 100 kg de persona durante el transcurso de 3-7 días consecutivos. En algunas realizaciones, se proporcionan administraciones múltiples de 2×10^{11} células por 100 kg de persona durante el transcurso de 3-7 días consecutivos. En algunas realizaciones, se proporcionan 5 administraciones de $3-5 \times 10^9$ células durante el transcurso de 5 días consecutivos. En algunas realizaciones, se proporcionan 5 administraciones de 4×10^9 células durante el transcurso de 5 días consecutivos. En algunas realizaciones, se proporcionan 5 administraciones de $1-3 \times 10^{11}$ células durante el transcurso de 5 días consecutivos. En algunas realizaciones, se proporcionan 5 administraciones de 2×10^{11} células durante el transcurso de 5 días consecutivos.

Se describen células estromales en cámaras de difusión en Benayahu, D. *et al.* (1989) J. Cell Physiol. 140:1-7 y Mardon, H.J. *et al.* (1987) Cell Tissue Res. 250:157-165.

Después de introducir la construcción génica en las células estromales, las células pueden aislarse inmunológicamente inmediatamente o después de haber sido cultivadas. Pueden implantarse células estromales después de aislarse inmunológicamente. Las células estromales pueden aislarse inmunológicamente por cualquier número de métodos bien conocidos usando materiales de partida y/o dispositivos disponibles fácilmente. Las células estromales pueden microencapsularse usando muchos de tales métodos de microencapsulación, incluyendo los descritos, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. número 4.391.909, la Patente de los EE.UU. número 4.806.355, la Patente de los EE.UU. número 4.942.129 y la Patente de los EE.UU. número 5.334.640.

Las células estromales pueden administrarse en cámaras con membranas difusibles o encapsularse en microperlas. En otra realización, las células estromales están contenidas en fibras huecas tales como las disponibles de Amicon, Inc. (Beverly MA). Estas fibras se usan por ejemplo para fabricar cartuchos para diálisis. Puede sacarse un extremo bajo la piel y reducirse de tamaño si han de reducirse las dosificaciones de la proteína hecha por las células. La superficie específica de las fibras es muy alta. Además, se pueden lavarse con una descarga las células de la fibra y sustituirse periódicamente. Se describen fibras huecas en las páginas 50-51 de la Publicación n° 323 de Amicon, Inc.

De manera similar, la incorporación de células estromales transfectadas en matrices biocompatibles permitirá la secreción de proteína beneficiosa al individuo mientras se mantienen las células en un estado aislado inmunológicamente. Se describen ejemplos de matrices biocompatibles, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. número 4.902.295 y la Patente de los EE.UU. número 4.997.443. En algunas realizaciones, se aíslan inmunológicamente células estromales transfectadas encerrándolas dentro de sistemas de implante de tejidos que son conjuntos de membranas. Es decir, se mantienen células en recipientes que incluyen al menos una membrana porosa. Las células dentro del conjunto de membranas se aíslan inmunológicamente mientras pueden hacerse disponibles para los individuos proteínas beneficiosas haciéndolas pasar a través de la membrana. Los dispositivos de implante que son conjuntos de membranas incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los descritos en la Patente de los EE.UU. número 5.314.471 y la Patente de los EE.UU. número 5.344.454. Según una realización de la invención, se proporciona un dispositivo de implante que comprende dos conjuntos de anillos. Cada conjunto de anillo comprende un anillo de plástico circular y una membrana de miliporos de $0,3 \mu\text{m}$ que cubre el área del círculo. Se disponen células estromales transfectadas entre los dos conjuntos de anillos que se conectan entre sí en la circunferencia. El dispositivo de implante construido se implanta preferiblemente subcutáneamente.

En algunos dispositivos de implante preferidos, se proporcionan 10^4 a 10^{11} células.

Pueden implantarse subcutáneamente o intraperitonealmente células aisladas inmunológicamente. Alternativamente, pueden incorporarse o implantarse de otro modo adyacentes a órganos y tejidos a los que se entrega preferiblemente la proteína beneficiosa. En realizaciones preferidas, se implantan dispositivos de implante subcutánea o intraperitonealmente.

5

La invención es particularmente útil para tratar las enfermedades, trastornos y estados que requieren cantidades de proteína relativamente pequeñas, más preferiblemente proteína segregada. Los ejemplos incluyen factor de crecimiento, factor de obesidad y factor IX, que requieren cada uno muy pequeña cantidad de proteína con el fin de funcionar. Las Tablas IV y V contienen listas parciales de enfermedades, estados y trastornos que pueden tratarse usando la presente invención.

10

Se prefiere cultivar células estromales antes de aislamiento inmunológico. Las células estromales pueden cultivarse desde 1 hora hasta más de un año. En algunas realizaciones preferidas, las células estromales se cultivan durante un período de tiempo suficiente para permitirles convertirse de células sin ciclación en replicantes. En algunas realizaciones, las células estromales se cultivan durante 3-30 días, preferiblemente 5-14 días, más preferiblemente 7-10 días. En algunas realizaciones, las células estromales se cultivan durante 4 semanas a un año, preferiblemente 6 semanas a 10 meses, más preferiblemente 3-6 meses.

15

En realizaciones preferidas, las células son 1) células estromales sin ciclación aisladas que se transfectan primero y se aíslan después inmunológicamente, y se administran después como células sin ciclación, 2) células estromales sin ciclación aisladas, que se transfectan primero, se cultivan después durante un período de tiempo suficiente para convertir de células sin ciclación en replicantes, se aíslan inmunológicamente después y se implantan después, 3) células estromales sin ciclación aisladas que se cultivan primero durante un período de tiempo suficiente para convertir de células sin ciclación en replicantes, se transfectan después, se aíslan después inmunológicamente y se implantan después, o 4) células estromales sin ciclación aisladas que se cultivan primero durante un período de tiempo suficiente para convertir de células sin ciclación en replicantes, se transfectan después, se cultivan después, se aíslan después inmunológicamente y se implantan después. En algunas realizaciones, se aíslan células estromales, se transfectan, se aíslan inmunológicamente y se implantan. Se prefiere cultivar las células estromales antes de y después de la transfección. Pueden cultivarse células estromales aisladas durante 3-30 días, en algunas realizaciones 5-14 días, en algunas realizaciones 7-10 días antes de la transfección. Pueden cultivarse células estromales transfectadas durante 3-30 días, en algunas realizaciones 5-14 días, en algunas realizaciones 7-10 días antes de la administración. Pueden cultivarse células estromales aisladas durante 3-30 días, en algunas realizaciones 5-14 días, en algunas realizaciones 7-10 días antes de la transfección y, tras la transfección, cultivarse adicionalmente durante 3-30 días, en algunas realizaciones 5-14 días, en algunas realizaciones 7-10 días antes de la administración. En algunas realizaciones, se cultivan las células estromales aisladas durante 4 semanas a un año, en algunas realizaciones 6 semanas a 10 meses, en algunas realizaciones 3-6 meses antes de la transfección. Pueden cultivarse células estromales transfectadas durante 4 semanas a un año, en algunas realizaciones 6 semanas a 10 meses, en algunas realizaciones 3-6 meses antes de la implantación. En algunas realizaciones, las células estromales aisladas se cultivan durante 4 semanas a un año, en algunas realizaciones 6 semanas a 10 meses, en algunas realizaciones 3-6 meses antes de la transfección y, tras la transfección, se cultivan durante 4 semanas a un año, en algunas realizaciones 6 semanas a 10 meses, en algunas realizaciones 3-6 meses antes de la implantación.

25

30

35

40

Otro aspecto descrito aquí se refiere al tratamiento de pacientes que padecen una enfermedad, trastorno o estado caracterizados por un defecto de huesos o cartílagos. Comprende las etapas de identificar un individuo con un defecto de huesos o cartílagos, obtener una muestra de médula ósea de un donante singénico, equilibrado, normal y administrar dicha muestra de médula ósea al paciente por infusión intravenosa.

45

Como se ha indicado antes, la muestra de médula ósea para trasplante puede derivarse de un donante equilibrado. Los que tienen experiencia ordinaria en la técnica pueden identificar fácilmente donantes equilibrados usando técnicas y criterios estándares.

50

Pueden obtenerse muestras de médula ósea para trasplante de donantes equilibrados por técnicas estándares. En algunas realizaciones, se emprende ablación de médula ósea antes de la infusión con el fin de hacer espacio en el hueso para las células introducidas. La ablación de médula ósea puede conseguirse aplicando rayos X al individuo a tratar, administrando fármacos tales como ciclofosfamida o mediante una combinación de radiación X y administración de fármacos. En algunas realizaciones, la ablación de médula ósea se produce por administración de radioisótopos de los que se sabe que destruyen células de huesos metastáticas tales como, por ejemplo, estroncio radioactivo, ¹³⁵samarium o ¹⁶⁶holmio (véase Applebaum, F.R. *et al.* 1992 Blood 80(6): 1608-1613).

55

La ablación de médula ósea es opcional. En algunas realizaciones, se produce una ablación de médula ósea parcial pero no completa antes del trasplante de médula ósea. En algunas realizaciones, se administra médula ósea sin ninguna ablación de médula ósea.

60

Se prefiere que el número de células usado en trasplante de médula ósea para tratar una enfermedad de huesos y cartílagos supere el que se usa normalmente para otros tratamientos. Se administran por infusión entre 3 y 10 veces la dosificación de médula ósea normal por 100 kg de persona.

65

En algunas realizaciones, se proporciona una administración simple de células. En algunas realizaciones, se proporcionan administraciones múltiples. En algunas realizaciones, se proporcionan administraciones múltiples durante el transcurso de 3-7 días consecutivos. En algunas realizaciones, se proporcionan 3-7 administraciones durante el transcurso de 3-7 días consecutivos. En algunas realizaciones, se proporcionan 5 administraciones durante el transcurso de 5 días consecutivos.

En algunas realizaciones, se proporciona una administración simple de entre 10^7 y 10^{13} células por 100 kg de persona. En algunas realizaciones, se proporciona una administración simple de entre aproximadamente $1-5 \times 10^6$ y $1-5 \times 10^{12}$ células por 100 kg de persona. En algunas realizaciones, se proporciona una administración simple de entre aproximadamente 1×10^9 y 5×10^{11} células por 100 kg de persona. En algunas realizaciones, se proporciona una administración simple de 4×10^9 células por 100 kg de persona. En algunas realizaciones, se proporciona una administración simple de 2×10^{11} células por 100 kg de persona.

En algunas realizaciones, se proporcionan administraciones múltiples de entre 10^7 y 10^{13} células por 100 kg de persona. En algunas realizaciones, se proporcionan administraciones múltiples de entre aproximadamente $1-5 \times 10^8$ y $1-5 \times 10^{12}$ células por 100 kg de persona. En algunas realizaciones, se proporcionan administraciones múltiples de entre aproximadamente 1×10^9 y 5×10^{11} células por 100 kg de persona durante el transcurso de 3-7 días consecutivos. En algunas realizaciones, se proporcionan administraciones múltiples de 4×10^9 células por 100 kg de persona durante el transcurso de 3-7 días consecutivos. En algunas realizaciones, se proporcionan administraciones múltiples de 2×10^{11} células por 100 kg de persona durante el transcurso de 3-7 días consecutivos. En algunas realizaciones, se proporcionan 5 administraciones de $3-5 \times 10^9$ células durante el transcurso de 5 días consecutivos. En algunas realizaciones, se proporcionan 5 administraciones de 4×10^9 células durante el transcurso de 5 días consecutivos. En algunas realizaciones, se proporcionan 5 administraciones de $1-3 \times 10^{11}$ células durante el transcurso de 5 días consecutivos. En algunas realizaciones, se proporcionan 5 administraciones de 2×10^{11} células durante el transcurso de 5 días consecutivos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se usaron células de un linaje de ratón transgénico que expresa un mini-gen humano para colágeno I de una manera específica para tejido, para ver si pueden servir células mesenquimales precursoras de médula que se expanden en cultivo como precursores a largo plazo de huesos y otros tejidos conectivos después de infusión intravenosa en ratones irradiados. El gen marcador consistía en un mini-gen suprimido internamente para la cadena $\text{pro}\alpha 1(\text{I})$ humana de procolágeno I que ocasionaba síntesis de cadenas $\text{pro}\alpha 1(\text{I})$ acortadas (Khillan, J.S. *et al.*, J. Biol. Chem. 266:23373-23379 (1991); Pereira, R. *et al.*, J. Clin. Invest. 91:709-716 (1983); y Sokolov, B.P. *et al.*, Biochemistry 32:9242-9249 (1983)).

Se obtuvieron células que expresan el gen de un linaje de ratones transgénicos en el que el número de copias del mini-gen humano con relación al gen de ratón endógeno fue aproximadamente 100 a 1, y los niveles permanentes de mRNA del mini-gen humano con relación al al mRNA del gen de ratón endógeno fue aproximadamente 0,5:1 en muchos tejidos.

Se prepararon por métodos estándares células de donante de médula parcialmente enriquecida en precursores mesenquimales (Friedenstein, A.J. *et al.*, Exp. Hemat. 4:267-274 (1976); Castro-Malaspina, H. *et al.*, Blood 56:289-301 (1980); Piersma, A.H. *et al.*, Exp. Hematol 13:237-243 (1985); Simmons, P.J. y Torok-Storb, B., Blood 78:55-62 (1991); Beresford, J.N. *et al.*, J. Cell. Sci. 102:341-351 (1992); Liesveld, J.L. *et al.*, Blood 73:1794-1800 (1989); Liesveld, J.L. *et al.*, Exp. Hematol 19:63-70 (1990); y Bennett, J.H. *et al.*, J. Cell. Sci. 99:131-139 (1991)). Brevemente, se cortaron los extremos de los huesos largos del ratón transgénico, y se extrajo la médula con una jeringa presurizada rellena con α -MEM (Sigma) que contenía 10% de suero de bovino fetal (Atlanta Biologicals). Se pusieron en placa aproximadamente 10^7 células nucleadas sobre matraces de cultivo de plástico de 175 cm² en 25 ml de α -MEM que contenía 10% de suero de bovino fetal. Después de 4 h, se desecharon las células no adherentes sustituyendo el medio. Aparecieron focos que contenían de dos a cuatro células de tipo fibroblasto en 2 a 3 días, y se desarrollaron los focos hasta colonias casi confluentes en aproximadamente 1 semana. La producción fue de aproximadamente 10^7 células por matraz después de digestión con tripsina. Por microscopía de contraste de fases, muchas de las células eran de tipo fibroblasto, pero se vieron también unos pocos macrófagos y adipocitos.

Aproximadamente 10^5 de las células adherentes cultivadas se mezclaron con 6×10^5 células no adherentes obtenidas por incubación de médula de ratones normales durante 4 h en matraces de 175 cm² en las mismas condiciones usadas para el aislamiento inicial de las células adherentes. La mezcla de aproximadamente 7×10^5 células en 0,2 a 0,4 ml de α -MEM y 10% de suero de bovino fetal se inyectó en la vena de la cola de cada ratón receptor.

Se prepararon ratones de ocho semanas de edad del mismo linaje FVB/N endógamo para recibir las células del donante por irradiación con un irradiador de ¹³⁷Cu (Atomic Energy of Canada, Ltd.). La unidad tenía una proporción de dosis de 116 cG/min con una configuración de haz opuesto paralelo. Cada animal recibió 9,0 Gy en dos fracciones con un intervalo de 4 h (4,5 Gy + 4,5 Gy) (O'Hara, M.D. *et al.*, Exp. Hemat. 19:878-881 (1991)). De una a 2 horas después de la segunda fracción de radiación, se inyectó intravenosamente la mezcla de células adherentes marcadas y células no adherentes normales. Los ratones irradiados testigo que no recibieron una infusión de células murieron después de 10 a 13 días de fallo de la médula.

Para seguir la suerte de las células del donante, se desarrollaron dos ensayos de PCR para el mini-gen COL1A1 humano y el gen COL1A1 endógeno de ratón. Con un ensayo de dos cebadores, los valores para la relación del gen humano al de ratón fueron lineales en un intervalo de 10^{-4} a aproximadamente 10^{-1} y, por tanto, de aproximadamente 10^{-6} a 10^{-1} células de donante por célula del receptor. Con el ensayo de tres cebadores, los valores fueron lineales en un intervalo de aproximadamente 10^{-3} a 10^{-2} y, por tanto, aproximadamente 10^{-5} a 1 células del donante por célula del receptor.

Los ensayos de ratones irradiados después de un día indicaron sólo cantidades de trazas de las células del donante en médula, bazo, huesos, pulmón o cerebro (Tabla 1). Se vieron niveles ligeramente más altos a los siete días. A los 30 días y 150 días, la progenie de las células del donante totalizó el 2,0 a 12% de las células de la médula, bazo, huesos y pulmón (Tabla 1). A los 150 días, totalizaron también el 1,5 a 5,0% de las células en el cartílago xifoide, que se diseccionó exento de cualquier tejido mineralizado o fibroso en el microscopio. Aunque los valores medios parecían mostrar una disminución entre 1 y 5 meses, no hubo una disminución significativa estadísticamente en los valores combinados para médula, bazo, huesos y pulmón entre estos dos períodos de tiempo (Tabla 1). Los ensayos de ratones no irradiados revelaron sólo muy bajos niveles de células del donante en los mismos puntos de tiempo ($<0,0001$ a $0,05\%$). El ensayo de PCR *in situ* de secciones de tejido de pulmón demostró que la progenie de las células del donante estaba distribuida uniformemente en el parénquima de alveolos y bronquios.

Para confirmar que la progenie de las células del donante estaba presente en cartílagos, se aislaron condrocitos de cartílago xifoide y articular por digestión a 37°C durante la noche con $0,5\text{ mg/ml}$ de collagenasa bacteriana (Sigma) en DMEM. Los ensayos de PCR indicaron que la progenie de las células del donante totalizaba el 2,5% de los condrocitos aislados.

Para determinar si las células del donante se hacían células mesenquimales funcionales en los tejidos que poblaban, se ensayó por RT-PCR en tejidos de los ratones receptores la expresión del mini-gen humano para colágeno I contenido en las células del donante. En tres ratones ensayados a los 150 días, el mini-gen se expresó en huesos, un tejido en el que más de la mitad de la proteína se sintetizó en colágeno I. La expresión en huesos se confirmó por un ensayo similar en células de huesos aisladas del fémur y cultivadas durante 1 semana. La expresión del mini-gen para colágeno I fue más variable en médula, bazo y pulmón, tejidos en los que la proporción de síntesis de colágeno I era menor que en huesos. Como se esperaba, el mini-gen no se expresó en cartílagos, un tejido en el que aproximadamente la mitad de la proteína se sintetiza en colágeno II, pero en el que no hay síntesis de colágeno I. El mini-gen para colágeno I tampoco se expresó en cultivos de condrocitos de los ratones receptores que contenían el gen marcador y que sintetizan colágeno II pero no colágeno I.

Informes anteriores han mostrado que ensayos de las células con marcadores citoquímicos o para mARNs indicaban que las células sintetizaban colágeno I, colágeno III, fibronectina, fosfatasa alcalina y osteopontina, pero no tenían aspectos característicos de macrófagos, granulocitos, linfocitos T, linfocitos B o células endoteliales. Los presentes resultados demuestran que, tras inyección intravenosa en ratones irradiados, los cultivos expandidos de células adherentes pueblan eficazmente varios tejidos conectivos. Los resultados demuestran también que las células sirven como verdaderas células precursoras para estos tejidos, porque expresan el gen marcador para colágeno I de una manera específica para el tejido, y se incorporan difusamente en el parénquima mesenquimal de pulmón.

Ejemplo 2

Condiciones para aislamiento y cultivo de MSCs

Se han estudiado las condiciones para cultivo de MSCs de manera que se expandan pero conserven el fenotipo como célula estaminal. La Tabla I muestra que el co-cultivo de MSCs con fragmentos de hueso aumentó el número de células obtenido después de 1 semana. En el mismo tiempo, el co-cultivo con hueso disminuyó los niveles de fosfatasa alcalina (APase) en las células, una observación que sugiere que las células no se diferenciaban en osteoblastos. También, hubo una disminución en los niveles de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), una observación que sugiere que las células no se diferenciaban en osteoclastos. Se observaron efectos similares con cultivos secundarios de las MSCs. Por tanto, los resultados sugieren que el co-cultivo con fragmentos de hueso puede proporcionar condiciones mejoradas para la expansión de MSCs. También, el medio de fragmentos de hueso cultivados puede ser una fuente importante de citoquinas y factores de crecimiento para la expansión de MSCs en cultivo.

En experimentos relacionados, se ha encontrado que pueden mantenerse cultivos secundarios de MSCs durante largos períodos de tiempo. Las MSCs pueden hacerse pasar en cultivo durante más de 4 meses por tripsinización y re-colocación en placas. Las células son destacadamente estables en cultivos en fase estacionaria. En un experimento, cultivos estacionarios permanecieron viables durante más de 4 meses con re-alimentación aproximadamente una vez por semana. En otro experimento, las células permanecieron viables cuando, por descuido, se dejaron en un incubador sin re-alimentación durante 1 mes.

Transfección estable de MSCs con un vector retroviral

Para obtener virus para infección de MSCs, se modificó el vector retroviral LNCZ (Miller, A.D. y Rosman, G.J. (1989) Bio-Techniques 7, 980-990) de modo que el promotor para citomegalovirus (pCMV) impulsó la expresión del gen de lacZ (Fig. 1). El vector se transfectó establemente en un linaje celular de empaquetado, de ratón, anfotrópico

(PA317). Se aislaron los clones productores del virus constitutivo por selección con G418, y se usó el sobrenadante de los clones para infección de MSCs. Se infectaron MSCs de cultivos primarios (3 días de edad) durante tres días sucesivos con sobrenadante reciente del linaje productor con el más alto título. La coloración de las células 5 días después indicó que aproximadamente el 15-20% de las células expresaban típicamente el gen de lacZ. Se pusieron varios cultivos de las células infectadas bajo selección con G418 (concentración activa 0,44 $\mu\text{g/ml}$) durante 5 días. Muchas de las células recuperadas continuaban expresando el gen de lacZ. Se construyeron también modificaciones de LNCZ de modo que la expresión del gen de lacZ es impulsada por el promotor del gen COL1A1 y el promotor del gen COL2A1 (pCOL2A1). La expresión del gen de lacZ se obtuvo con éxito en cultivos primarios de MSCs con ambas construcciones.

Sustitución de células de hueso en ratones transgénicos con MSCs normales

Se realizó infusión de MSCs de ratones normales en los ratones transgénicos que expresaban altos niveles del gen COL1A1 mutado (Tablas II y III). Un mes después de la infusión de MSCs normales en los ratones osteoimperfectos (OI) (Tabla II), la progenie de las células del donante totalizó del 10 al 45% de las células de hueso en ratones receptores que se habían irradiado con una dosis tolerada al máximo de rayos X (700 centi-Grays o cGy). Se obtuvieron valores similares con ratones irradiados con la mitad de la dosis tolerada al máximo de rayos X (350 cGy). Sin embargo, la reducción de la dosis a un cuarto (175 cGy) redujo los valores en cuatro ratones al 0%, 5%, 10% y 40%. Se obtuvieron resultados similares cuando se realizó infusión en ratones transgénicos OI con grandes números de células de médula completa de las que no se separaron MSCs (Tabla III).

En cinco ratones receptores en los que se examinó la síntesis de cadenas pro α 1(1) (Tablas II y III), la sustitución de las células de hueso del receptor por MSCs del donante normales fue acompañada por un aumento de la relación de cadenas pro α 1(1) normales a cadenas pro α 1(1) en huesos. Por ello, la sustitución por células normales fue acompañada por los cambios esperados en el nivel de proteína.

Ejemplo 3

Expresión a largo plazo de los genes humanos para hGH, factor IX u Ob en MSCs transfectadas establemente

Se aíslan MSCs de ratones y se cultivan en las condiciones descritas en Pereira, R.F. *et al.* (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 4857-4861, que se incorpora aquí como referencia. Se infectan MSCs con vectores retrovíricos o se transfectan con ADN romo para obtener clones que expresan los genes para hormona del crecimiento humano (hGH), la proteína de la obesidad (Ob) humana o el gen para factor IX humano. Puesto que se ha introducido con éxito un gen de lacZ en MSCs de ratones con un vector retrovílico, se usan variantes del mismo vector. Al mismo tiempo, se transfectan establemente MSCs con electroporación (Andreason, G.L. y Evans, G.A. (1988) Bio Techniques 6, 650-660 y Toneyuzzo, F. *et al.* (1986) Mol. Cell. Biol. 6, 703-76), lipofectamina e inyección nuclear (Mercer, W.E. *et al.* (1992) en: Antisense Strategies, Ann. N. Y. Acad. Sci. Biol. 660, 209-218), de manera que pueden usarse genes endógenos mayores. Además, pueden usarse algunos de esos genes endógenos mayores. Además, se evitan algunas de las desventajas potenciales de los retrovirus usando metodología de introducción alternativa.

Las condiciones estándares para aislamiento y cultivo son: Se obtiene médula completa de las tibias y fémures de ratones FVB/N de 6 a 10 semanas de edad cortando los extremos de los huesos y extruyendo la médula con una jeringa que contiene de 1 a 2 ml de α MEM enfriado con hielo y 10% de suero de bovino fetal (FBS). Las células de médula agrupadas se dispersan por sacudidas suaves y se cuentan en un contador automático (Coulter modelo ZM). Se ponen de 5×10^6 a 5×10^7 células nucleadas en 25 ml de α -MEM y 10% de FBS en placa sobre matraces de cultivo de 75 cm^2 . Después de 4 h o 3 días, se separan las células no adherentes sustituyendo el medio. Las células adherentes se expanden como cultivos primarios durante 10 a 12 días con una re-alimentación cada 4 días. Las células se recuperan por digestión con 0,25% de tripsina y EDTA de 1 a 5 mM durante 5 min a 37°C, seguido por raspadura suave. Las células se diluyen con α -MEM con 10% de FBS y se vuelven a poner en placa con una densidad de 3×10^4 a 1×10^5 células por 9,5 cm^2 en placas de 6 pocillos. En estas condiciones, el tiempo de duplicación de las células es de 19 a 22 horas. Los cultivos secundarios se re-alimentan aproximadamente cada 4 días, y se hacen pasar por tripsinización y vuelta a poner en placa en las mismas condiciones.

Preparación de construcciones de genes

Se usa el vector retrovílico LNCX como construcción progenitora. Se usan lugares de clonación convenientes en la construcción para preparar las construcciones modificadas pRSV-lacZ, pCMV-lacZ, pCOL1-LacZ y pCOL2-lacZ (Fig. 1). El promotor pCOL1 es un fragmento de 1,4 kb que contiene 476 pb del promotor, el primer exón y buena parte del primer intrón del gen COL1A1 humano. El promotor ha mostrado expresar en ratones transgénicos una forma sin promotor del gen COL2A1 de una manera altamente específica para el tejido y específica de desarrollo (Sokolov, B.P. *et al.* (1995) J. Biol. Chem. 270, 9622-9629). El promotor de COL2A1 es un fragmento de 1 kb del gen COL2A1 humano (Ala-Kokko, L. *et al.* (1991) J. Biol. Chem. 266, 14175-14178) que confiere especificidad para tejidos de expresión (Bradham, D.M. *et al.* (1994) J. Cell Physiol. 158, 61-68). El gen de lacZ se sustituye con el gen de hGH (Nichols Laboratories), el gen de OB (Considine, R.V. *et al.* (1995) J. Clin. Invest. 95, 2986-2988), o el gen de factor IX humano (Genetic Therapy, Inc.) Use of the Retrovirus Vector.

Linajes celulares productores de retrovirus

Para establecer linajes celulares productores, se usaron células de ratón de empaquetado PA317 de retrovirus amfotrófico. Las células se transfectaron al 20% de confluencia en placas de 100 mm por el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico (Promega) usando 15 μg de ADN plásmido que se linealizó por digestión con ScaI, que corta en la región de pBR322 del vector retroviral. Un día después de la transfección, se añadió al medio G418 (GIBCO/BRL) con una concentración activa de 1 mg/ml. Entre 7 y 10 días de selección aparecieron colonias resistentes a neomicina y se aislaron por clonación con anillos mecánicos. Los clones se expandieron y se ensayó en clones individuales la capacidad para expresar lacZ por coloración directa de pocillos duplicados. Se ensayó el título del virus producido por las células positivas por adición simple de 50 μl de medio a células de tumor humano HT-1080 desarrolladas hasta 20% de confluencia en placas de microtitulación de 6 pocillos con 3 ml de medio por pocillo y en presencia de 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de polibreno. Se ensayó el título para determinar el número de células HT-1080 que coloreaban positivamente para expresión del gen de lacZ. Típicamente, el título fue 1×10^5 a 1×10^6 .

15 *Infección con retrovirus de MSCs de ratón*

Se prepararon como se ha descrito antes cultivos primarios de MSCs de ratón. Después de 3 días, se desecharon las células de médula no adherentes y se añadió medio reciente. Se infectaron después las células con el retrovirus en presencia de 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de polibreno por adición de $\frac{1}{4}$ de volumen de medio de sobrenadante reciente de células productoras transfectadas establemente que tenían el más alto título de producción de virus. La infección se repitió en dos días sucesivos adicionales. Se colorearon después directamente las células para expresión de lacZ o se dividieron en placas mayores y se pusieron en selección con 0,4 mg/ml de G418 (concentración activa). Aproximadamente del 15 al 20% de cultivos primarios fueron positivos para lacZ y muchas de las células que sobrevivieron a la selección con G418 fueron positivas para lacZ.

25 *Transfección con lipofectamina*

Se desarrollaron cultivos primarios de MSCs durante 10 días en α -MEM que contenía 10% de FBS. Después de tripsinización y raspadura suave, se sembraron las células en una placa de 6 pocillos con una densidad de 10^5 células por pocillo. Las células se desarrollaron durante 2 días, se lavaron después 2 veces con PBS y se incubaron con un complejo de ADN-lipofectamina. El complejo de ADN-lipofectamina se preparó como sigue: se mezclaron 6 μl de lipofectamina (GIBCO/BRL) con 1 μg de ADN de LINCZ en 200 μl de α -MEM, se incubó a temperatura ambiente durante 30 min y se añadió a un pocillo de una placa de 6 pocillos que contenía MSCs en 800 μl de α -MEM. Después de 6 h de incubación a 37°C, el complejo de ADN-lipofectamina se sustituyó con 2 ml de α -MEM que contenía 10% de FBS. Las células se colorearon para lacZ o se pusieron bajo selección de G418 después de 18 h de incubación en medio que contenía FBS. Se obtuvieron clones positivos, pero crecieron lentamente, aparentemente porque la densidad de células era demasiado baja después de la selección de G418. Para salvar esta situación, pueden usarse tres estrategias diferentes: (a) se ponen las células en placa con densidades mayores; (b) se pondrá co-cultivo de insertos de cultivo de células sobre clones supervivientes temprano en el procedimiento de selección y se pondrán MSCs recientes o fragmentos de hueso en los insertos (véase Tabla 1) en base diaria para proporcionar los factores celulares necesarios para estimular el crecimiento; (c) en el momento en que la selección con G418 ha destruido muchas de las células no transfectadas, se vuelven a sembrar los cultivos con MSCs que se han infectado con una variante del retrovirus LNCX (Fig. 1) en el que está sustituido el gen de lacZ con un gen seleccionable para timidina quinasa. Por tanto, las MSCs transfectadas establemente con retrovirus se usan para proporcionar las citoquinas, factores de crecimiento e interacciones celulares necesarios, requeridos para el crecimiento inicial de las MSCs transfectadas durante la selección en G418. Se pueden separar después las células infectadas con el retrovirus por selección negativa con gangciclovir.

50 *Métodos de entrega*50 *Inyecciones nucleares*

Las inyecciones nucleares son altamente eficaces como medio para transfectar algunas células. Se pusieron células en placas de 60 mm que contenían un cubreplata de 22 x 22 mm marcado con un círculo para delinear el área para microinyección. Se incubaron las células en medio que contenía 0,1% de CS durante 5 días para inducir la detención del crecimiento antes de la microinyección. En estas condiciones, entre el 8 y el 15% de las células incorporaron [^3H]timidina durante el marcado continuo durante 24 h entre los días 5 y 6. La microinyección se realizó usando un microscopio invertido Zeiss Axiovert equipado con un microinyector Eppendorf y un micromanipulador usando femtopuntas capilares de vidrio compradas comercialmente (Eppendorf). Todas las células dentro de un área delimitada del cubreplata (usualmente 150-200) se microinyectaron en el núcleo con ADN en concentraciones variables de 0,01 a 1,0 $\text{g}/\mu\text{l}$ en tampón Tris 10 mM (pH 7,6). Las células inyectadas se expandirán y ensayaran como se ha descrito antes.

Electroporación

Se tratan MSCs con 0,25% de tripsina y EDTA de 1 a 5 mM durante 5 min a temperatura ambiente y se cosechan después por raspadura. Las células se globulizan por centrifugación a 4.000 x g durante 10 min, y se lavan después dos veces resuspendiendo el glóbulo en PBS enfriada con hielo (pH 7,4). Se resuspenden las MSCs a razón de 2×10^6 células por 0,8 ml y se dividen en partes alícuotas en una cubeta de electroporación (separación 0,4 cm). Las células

se incuban 10 min en hielo, se añade ADN a la suspensión (5-50 μ g) y se enfrían las células durante 10 min más. La suspensión de células se somete después a electroporación usando un instrumento comercial (BioRed Gene Pulser; modelo 1652076) con una intensidad de campo determinada empíricamente que produce el mayor porcentaje de células que conservan el ADN añadido exógenamente. Para determinar la intensidad de campo apropiada para MSCs, se han realizado titulaciones variables de 0,25 a 2,5 kv/cm. Se comprobó la eficacia de electroporación introduciendo un gen de lacZ (vector de LNCZ) y coloreando después las células de 48 a 72 h después de la electroporación.

Ensayos

hGH

La expresión del gen de hGH se comprueba ensayando medio de clones de células desarrolladas en placas de microtitulación de 6 pocillos con un ensayo de inmunoabsorbente enlazado a enzima, con un juego disponible comercialmente (GIBCO/BRL). En este ensayo, se añaden por pocillo de una placa de microtitulación 0,1 ml de tampón diluyente 2 X. Después de 5 min, se añaden 0,1 ml de muestra de ensayo y se incuban la placa a 37°C durante 30 min. Se lavan los pocillos 5 veces y se añaden por pocillo 0,2 ml de anticuerpo principal. Las muestras se incuban a 37°C durante 30 min y se lavan 5 veces. Se añaden después 0,2 ml de tampón de sustrato que contiene sustrato de O-fenilendiamina. Se incuban muestras a temperatura ambiente durante 30 min y se detiene la reacción por adición de 0,1 ml de ácido sulfúrico 2 N. La absorbancia de la muestra se ensaya a 490 nm.

Proteína de Ob

Se ensaya en células la expresión del gen de Ob con un radioinmunoensayo de proteína de medio de células. El anticuerpo principal para proteína de Ob humana se produjo en conejos contra proteína recombinante sintetizada en un sistema de expresión de *E. coli* y se purificó hasta homogeneidad. La proteína humana es altamente homóloga con la de ratón y, por tanto, anticuerpos anti-humanos deberían reaccionar cruzadamente con la proteína de ratón. Si no lo hacen, el cADN de ratón corto (619 nt) se expresa en *E. coli*, se purifica la proteína y se preparan anticuerpos. Alternativamente, se compran péptidos sintéticos con la secuencia de ratón y se usan éstos para preparar anticuerpos. Para el ensayo, se radiomarcó proteína de Ob humana recombinante con ^{125} I yodo por el método de Bolton-Hunter, seguido por purificación por filtración en gel usando Sephadex G-25. La actividad específica obtenida fue -30 μ Ci/ μ g. Se preincubaron muestras de ensayo (0,2 ml) con antisuero principal (dilución 1:2000) en solución salina tamponada con fosfato que contenía 0,1% de Triton X-100 durante 16 h a 4°C en un volumen total de 0,4 ml. Se añadió después ^{125} I-proteína de Ob (-30.000 cpm llevadas en 100 μ l) y se continuó la incubación durante 24 h más. La proteína de Ob unida ($12 \pm 1\%$; unión no específica $1,4 \pm 0,1\%$) se inmunoprecipitó por adición de 0,1 ml de suero anti-IgG de conejo, de oveja, (Antibodies, Inc., Davis, CA), 0,1 ml de suero de conejo normal (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD) y 0,1 ml de polietilenglicol del 10%. Los tubos se centrifugaron durante 15 min (2.200 rpm), y la marca no unida se decantó y se contó el glóbulo en un contador gamma Packard 5000 (Downers Grove, IL). Se calculó la concentración de proteína de Ob en muestras desconocidas usando modelo logístico de cuatro parámetros sin pesar de Rodbard. El límite de detección de este ensayo es 0,39 ng/ml. La varianza intra-ensayo es 11,6% a 12 ng/ml con una varianza interensayo de 20,8% a 13,1 ng/ml.

Factor IX humano

Se ensayará la expresión del gen para Factor IX con un ELISA disponible comercialmente (American Bioproducts Company) en condiciones similares a las usadas para el ensayo de hGH (anterior). Como se ha indicado por Smith *et al.* (74), la curva estándar variaba de 1 a 50 ng/ml $^{-1}$ y el límite de sensibilidad fue 1 ng/ml $^{-1}$. El ensayo no reaccionó cruzadamente con factor IX de ratón.

Ejemplo 4

Expresión sostenida de los tres genes en niveles importantes fisiológicamente por infusión sistémica a ratones de MSCs trasfectadas establemente

Experimentos con el ratón transgénico OI (Tablas II y III) han demostrado que MSCs cultivadas pueden servir como precursores de tipo células estaminales de huesos, cartílagos y otros tejidos mesenquimales tras infusión sistémica. Por tanto, se administran por infusión MSCs que expresan hGH, la proteína de Ob o factor IX a ratones irradiados y no irradiados para evaluar expresión sostenida de los genes *in vivo*.

Infusión de MSCs

Inicialmente, se administran por infusión MSCs a ratones en condiciones tales como las descritas en la Tabla II (ratones de 3 semanas de edad; irradiación de 300 o 700 Grays; inyección intraperitoneal; 1 x 10⁶ MSCs; y 2 x 10⁶ células de médula completa). Además, se compara infusión intravenosa con intraperitoneal; y se emplean niveles más bajos de irradiación con rayos X. También, se administran por infusión las células a embriones por sección cesárea. En pruebas preliminares, se inyectaron 50 μ l de 5 x 10⁴ ES en la placenta de siete embriones de 13 días; 6 de 7 se entregaron como cachorros viables. Por tanto, es factible la inyección intrauterina de MSCs.

Curvas de crecimiento

La expresión *in vivo* eficaz de hGH debe aumentar la proporción de crecimiento de ratones y la expresión de la proteína de Ob debe inducir hambre. Por tanto, se comprueban el peso y tamaño de los ratones tratados y de crías testigo.

Ensayos para expresión génica

Se obtiene sangre del plexo retro-orbital de ratones a 1 semana, 1 mes, 3 meses, 5 meses, 10 meses y 20 meses tras la infusión de las MSCs. Se ensayan por ELISA hGH y factor IX, y se ensaya la proteína de Ob con un ensayo radioinmune. Además, si se obtienen con ELISA aumentos medibles de factor IX humano, el procedimiento descrito en Smith, T.A.G. *et al.* (1993) Nature Genet. 5 397-402, que se incorpora aquí como referencia, para ensayar factor IX humano activo biológicamente. En este procedimiento, se capturó primero factor IX humano en un pocillo de microtitulación con el anticuerpo monoclonal BGIX1, y se activo después por factor IXa. El factor IX activo, en combinación con factor VIII, convirtió factor X en Xa. El factor Xa dividió el sustrato cromógeno, S2765, produciendo un producto amarillo. Las placas de microtitulación revestidas con BGIX1 y el Factor VIII se compraron de Elcatech, Inc. (Winston-Salem, NC). El factor XIa se compró de Enzyme Research Labs, Inc. (South Bend, IN). El factor X, solución de fosfolípido, S-2765 y el inhibidor de trombina, 1-2581, se compraron de Kabi Pharmacia Hepar, Inc. (Franklin, OH). Se prepararon cuatro tampones: A, Tris 50 mM, NaCl 150 mM, 1% de BSA, pH 7,5; B, Tris 150 mM, CaCl₂ 150 mM, 10 mg/ml⁻¹ de gelatina, pH 7,6; C, Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7,5; D, Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8,4. La mezcla de reacción factor VIII/X se preparó reciente mezclando cantidades iguales de las siguientes materias primas: factor VIII, 5 Uml⁻¹ en tampón A; factor X, 1 Uml⁻¹ en tampones; 1-2581, 34 µg/ml⁻¹ en tampón A; CaCl₂, 25 mM en agua; y fosfolípido. Se diluyeron muestras de plasma en tampón A y se añadieron 100 µl a cada pocillo de microtitulación. La placa se incubó durante 90 min a temperatura ambiente y se lavó después cinco veces con tampón B, se añadieron a cada pocillo 100 µl de factor XIa (2 µg/ml⁻¹ en tampón C). Después de 30 min a 37°C, se añadieron a cada pocillo 100 µl de S2765 (0,5 mM en tampón D) y la placa se incubó durante 10 min a temperatura ambiente antes de detener la reacción añadiendo ácido acético hasta una concentración final del 10%. Se determinaron las absorbancias a 405 nm con un lector de microplacas Bio-Rad. La curva estándar, preparada con diluciones de plasma agrupado normal humano, era lineal de 3 a 25 ng/ml⁻¹. El ensayo no reaccionó cruzadamente con factor IX de ratón. Del factor IX, niveles de 250 ng por ml o 5% del normal se consideran generalmente terapéuticos y de 100 a 150 ng/ml se consideran beneficiosos.

Ejemplo 5

Expresión sostenida de los genes en niveles importantes fisiológicamente poniendo las MSCs en cámaras de difusión subcutánea

Las células implantadas en cámaras de difusión subcutánea tienen al menos dos ventajas distintas para terapia de pacientes: (a) se salvan respuestas inmunes y (b) cuando se implantan en cápsulas en ratones (Benayahu, D. *et al.* (1989) J. Cell Physiol. 140, 1-7), ratas (Mardon, H.J. *et al.* (1987) Cell Tissue Res. 250, 157-165) o conejos (Fiedenstein, A.J. *et al.* (1987) Cell Tissue Kinet. 20, 263-272) sobreviven al menos 6 semanas (Wakitani, S. *et al.* (1994) J. Bone and J.T. Surgery 76A, 579-592) aparentemente porque persisten como hueso, tejido fibroso o cartílago que no requieren vascularización (Benayahu, D. *et al.* (1989) *supra*, Mardon, H.J. *et al.* (1987) *supra*, Owen, M. y Friedenstein, A.J. (1988) en: Cell and Molecular Biology of Invertebrate Hard Tissues, Wiley Chicester, CIBA Foundation Symposium, 136, 42-60, A.J. *et al.* (1987) *supra*).

Preparación de cámaras

Se montan cámaras de difusión a partir de componentes disponibles comercialmente (Millipore Corp.) y se usan como se ha descrito en informes previos (Benayahu, D. *et al.* (1989) *supra*, Mardon, H.J. *et al.* (1987) *supra*). Breve-mente, se pegan filtros de membrana con 0,3 µm de tamaño de poros a un lado de cada uno de dos anillos de plástico con cola acríloide. Los dos anillos se pegan después entre sí para formar una cámara, cuyas dimensiones son 9 mm de diámetro interior y 2 mm de espesor, con un volumen de aproximadamente 127 mm³. Se inoculan en las cámaras de 10⁴ a 10⁷ MSCs a través de un agujero en un anillo y se cierra el agujero con un tapón de plástico con conicidad hacia dentro revestido con cola. Las cámaras se implantan en ratones subcutáneamente en el lomo o intraperitonealmente bajo anestesia. Inicialmente, se insertan una o más cámaras en ratones destetados recientemente (3 semanas). A continuación, se insertan cámaras en ratones de 1 semana de edad. Para los experimentos con los ratones de 1 semana de edad, se preparan cámaras más pequeñas a partir de discos (diámetro interior 5 mm) cortados de puntas de plástico para micropipetas.

Ensayos

Se obtiene sangre del plexo retro-orbital a 1 semana, 1 mes, 3 meses, 5 meses, 10 meses y 20 meses tras la implantación de las cámaras. Se ensaya en el plasma hGH, proteína de Ob y factor IX como se ha descrito antes.

Ejemplo 6

Con referencia a la Figura 2, la cámara de difusión (1) puede tener un cilindro de cámara (3) que tiene dos extremos, un primer extremo (5) y un segundo extremo (7). El cilindro puede estar constituido por uno o más anillos asegurados

entre sí por medios no tóxicos. La cámara está equipada en cada extremo con un filtro, un primer filtro (9) y un segundo filtro (11). Los filtros son porosos a factores de tal modo que los factores puedan pasar entre la cámara y el mamífero. El tamaño de poros de los filtros puede ser de aproximadamente $0,25 \mu\text{m}$ o inferior, preferiblemente alrededor de $0,1 \mu\text{m}$. Los filtros pueden ser de plástico, teflón, poliéster o cualquier material inerte que sea fuerte, flexible y capaz de resistir tratamientos químicos. Los filtros pueden asegurarse en posición con juntas de caucho que pueden proporcionar también un cierre más hermético. Opcionalmente, la porción de cilindro de la cámara puede tener una abertura (13) que puede estar cubierta por un tapón (no representado). El tapón puede ser de tipo roscado de caucho autoobturante y ajustado a la abertura. Puede realizarse así la inserción de células al contenido de la cámara dando acceso a la abertura retirando el tapón e insertando células usando una aguja y jeringa ordinarias. La cámara puede ser de cualquier sustancia, tal como, aunque sin limitarse a ellas, plástico, teflón, lucita, titanio o cualquier material inerte, que sea no tóxico y sea bien tolerado por mamíferos. Además, las cámaras deben ser capaces de sobrevivir a esterilización.

La cámara puede implantarse de las siguientes formas no limitativas: subcutánea o intraperitonealmente, por ejemplo. La cámara puede separarse de alrededor de 24 a aproximadamente 30 horas después de la implantación. Alternativamente, puede emplearse una cámara rellenable de tal modo que la cámara pueda reutilizarse para tratamientos y vaciarse después de los tratamientos.

TABLA I

Condiciones para el crecimiento de cultivos primarios y secundarios de MSCs

MSCs	Condiciones de cultivo	Células por pocillo $\times 10^5$	APase ^a (mmoles min/mg)	TRAP ^a (mmoles min/mg)
Primario	Estándar ^a	2,0	426	144
	Co-cultivado ^b	6,41	22,3	102
	Co-cultivado ^c (Matrigel)	6,94	42,0	105
Secundario ^d	Estándar	1,33	2.052	75
	Co-cultivado	7,40	362	60,6
	Co-cultivado (Matrigel)	5,08	506	59,2

^aSe cultivaron células de médula completa (20×10^6) de ratones de 6 semanas de edad en pocillos de $9,5 \text{ cm}^2$ individuales en 2 ml de FCS al 10% y α -MEM. Las células no adherentes se separaron el día 3 y se continuó la incubación en medio reciente hasta el día 7. Se ensayan APase y TRAP como se ha descrito en la referencia 55.

^bCo-cultivado con fragmentos de hueso (medio fémur y media tibia) en insertos de cultivo de células (23 mm; tamaño de poros $3 \mu\text{m}$; Becton Dickinson).

^cIgual que ^b, con insertos revestidos con Matrigel.

^dSe separaron cultivos primarios el día 10 con 0,25% de tripsina y EDTA 1 mM durante 5 min a 37°C , seguido por raspadura suave. Se diluyeron 1:4 células de un pocillo (2×10^5) y se cultivaron en pocillos de $9,5 \text{ cm}^2$ durante 7 días con cambios del medio el día 3 y el día 6.

^eLas actividades de APase (20, 54) y TRAP (55) fueron por mg de proteína total.

ES 2 291 588 T3

TABLA II

Experimentos con (a) ratones transgénicos como receptores; (b) MSCs normales como células de donante; y (c) disminución de dosis de rayos X

Ratones receptores	Rayos X (cG)	Donante	Células ^a	Disminución de la recolocación de hueso a 1 mes (%)	Cadenas proα (1) mutadas
		MSCs	Médula completa		
Transgénico (3 semanas)	700	0,7x10 ⁶ (N) ^a	15x10 ⁶ (TG) ^{ab} 2x10 ⁶ (TG)	10 al 45% (n=3)	26 a 73% (n=3)
Transgénico (3 semanas)	350	1,2x10 ⁶ (N)	2x10 ⁶ (TG)	28 al 60% (n=4)	
Transgénico (3 semanas)	175	1,2x10 ⁶ (N)		0 al 40% (n=4)	

^a(N), normal; (TG), transgénico.

^bMSCs separadas de células de médula completa antes de infusión por incubación en placa de cultivo de plástico durante 4 h a 37°C.

TABLA III

Experimentos con (a) ratones transgénicos como receptores; (b) aumento de 10 veces en células de médula completa como células de donante; y (c) disminución de la dosis de rayos X

Ratones receptores	Rayos X (cG)	Células de donantea	Recolocación de hueso a 1 mes (%)	Disminución de cadenas proα (1) mutadas
		MSCs	Médula completa	
Transgénico (3 semanas)	700		5x10 ⁶ (N) ^a (n = 3)	20 al 38% (n = 3)
Transgénico (3 semanas)	350		1,6x10 ⁶ (N) (n = 3)	50 al 78% (n = 3)
Transgénico (3 semanas)	350		5x10 ⁶ (N) (n = 4)	21 al 24% (n = 2)

^a(N) Médula completa de ratones normales sin ningún tratamiento para separar MSCs.

TABLA IV

Enfermedades complejas genéticas o adquiridas tratables por células estromales encapsuladas (lista parcial)

Enfermedad	Metabolito o proteína deficiente o excesivo	Defecto génico	Gen terapéutico potencial en células estromales
Deficiencias de hormona del crecimiento más defectos de crecimiento	Baja hormona del crecimiento en algunas	Hormona del crecimiento en algunas	Hormona del crecimiento
Obesidad	Desconocido	Desconocido	Gen para la proteína de Ob (disminuye el apetito)
Enfermedad renal	Anemia más otros cambios	Genes y formas adquiridas múltiples	Eritropoyetina
Diabetes	Insulina disminuida	Múltiple	Varios genes para síntesis de insulina y liberación regulada (complejo)
Aterosclerosis	Niveles de LDL relativamente bajos	Múltiple	Gen para Apo-AI (aumenta HDL en ratones transgénicos)
Osteoporosis	Desconocido	Múltiple	Agonista de estrógeno específico para células de huesos
Enfermedades infecciosas, incluyendo SIDA			Anticuerpos para agente infeccioso
Enfermedades autoinmunes			Antagonistas para el epítipo inmune

TABLA V

Enfermedades monógenas definidas tratables por células estromales encapsuladas (lista parcial)

Enfermedad	Metabolito o proteína deficiente o excesivo	Defecto génico	Gen terapéutico potencial en células estromales
Defectos del ciclo de urea	Glutamina	Varios diferentes	Glutaminasa
Acidurias orgánicas de cadena ramificada	Cetoácidos de leucina, isoleucina y valina	Tres diferentes	Descarboxilasas específicas
Deficiencia inmunodeficiencia de adenina desaminasa	Desoxi-adenosina	Adenina desaminasa	Adenina desaminasa
Lipoproteína familiar	Quilomicrones	Lipoproteína lipasa	Lipoproteína lipasa
Enfermedad de Gaucher (tipo I)	Glucosilceramida	β -Glucosidasa ácida	β -glucosidasa ácida
Deficiencia de α 1- antitripsina	Baja proteína del suero	α -Antitripsina	α -Antitripsina
Galactosemia	Galactosa aumentada	Una de cuatro enzimas	Una de cuatro enzimas
Hemofilia	Factor VIII o IX disminuido	Factor VIII o IX	Factor VIII o IX

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de células estromales aisladas que se han aislado de una muestra de médula ósea obtenida de un donante
singénico, equilibrado, normal, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que padece una
enfermedad, trastorno o estado **caracterizados** por un defecto de huesos o cartílagos, en el que el donante es singénico
con dicho paciente y en el que el medicamento es para administración a dicho paciente por infusión intravenosa.
- 10 2. El uso de la reivindicación 1ª, en el que dicho medicamento es para administración a un paciente que ha experi-
mentado ablación de médula ósea antes de la administración de las células estromales aisladas.
- 15 3. El uso de la reivindicación 1ª, en el que dichas células estromales aisladas se han transfectado con una construc-
ción génica que comprende un gen de herpes de timidina quinasa, en el que dicho gen está enlazado operativamente a
secuencias reguladoras y se expresa por dichas células estromales.
- 20 4. El uso de la reivindicación 1ª, en el que dicha enfermedad, trastorno o estado se **caracteriza** por un defecto en
los huesos de dicho paciente.
5. El uso de la reivindicación 4ª, en el que dicha enfermedad, trastorno o estado es osteogénesis imperfecta u
osteoporosis.
- 25 6. El uso de la reivindicación 1ª, en el que dicha enfermedad, trastorno o estado se **caracterizan** por un defecto en
los cartílagos de dicho paciente.
7. El uso de la reivindicación 6ª, en el que dicha enfermedad, trastorno o estado es condrodisplasia u osteoartritis.
- 30 8. El uso de células estromales aisladas que se han aislado de una muestra de médula ósea de un paciente y que se
han cultivado en condiciones que producen replicación de dichas células estromales en un cultivo expandido de células
estromales, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que padece una enfermedad,
trastorno o estado **caracterizados** por un gen mutado, que no funciona o subexpresado, que produce un defecto de
los huesos o cartílagos de dicho paciente, en el que dicho medicamento es para administración a dicho paciente por
infusión intravenosa.
- 35 9. El uso de la reivindicación 8ª, en el que dicho medicamento es para administración a un paciente que ha experi-
mentado ablación de médula ósea antes de la administración de las células estromales.
10. El uso de la reivindicación 8ª, en el que dicha enfermedad, trastorno o estado se **caracterizan** por un defecto
en los huesos de dicho paciente.
- 40 11. El uso de la reivindicación 10ª, en el que dicha enfermedad, trastorno o estado es osteogénesis imperfecta u
osteoporosis.
12. El uso de la reivindicación 8ª, en el que dicha enfermedad, trastorno o estado se **caracterizan** por un defecto
en los cartílagos de dicho paciente.
- 45 13. El uso de la reivindicación 12ª, en el que dicha enfermedad, trastorno o estado es condrodisplasia u osteoartritis.

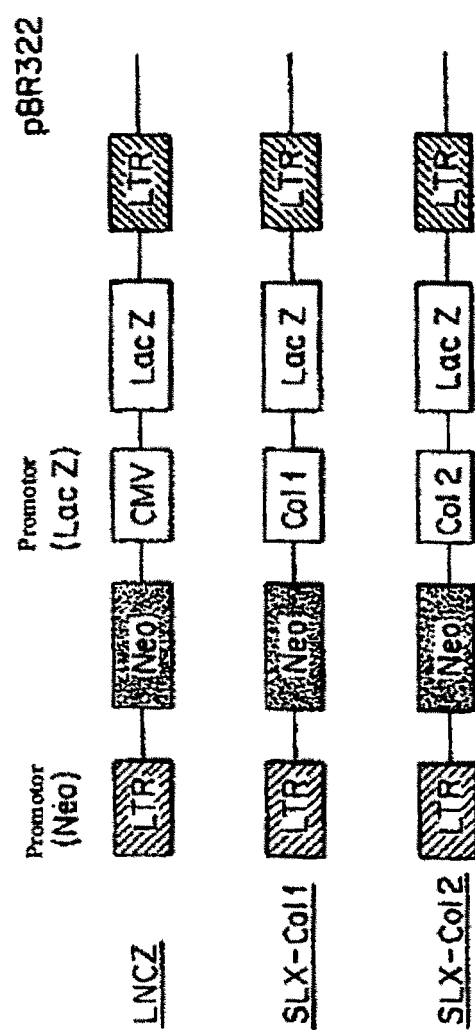


Fig. 1

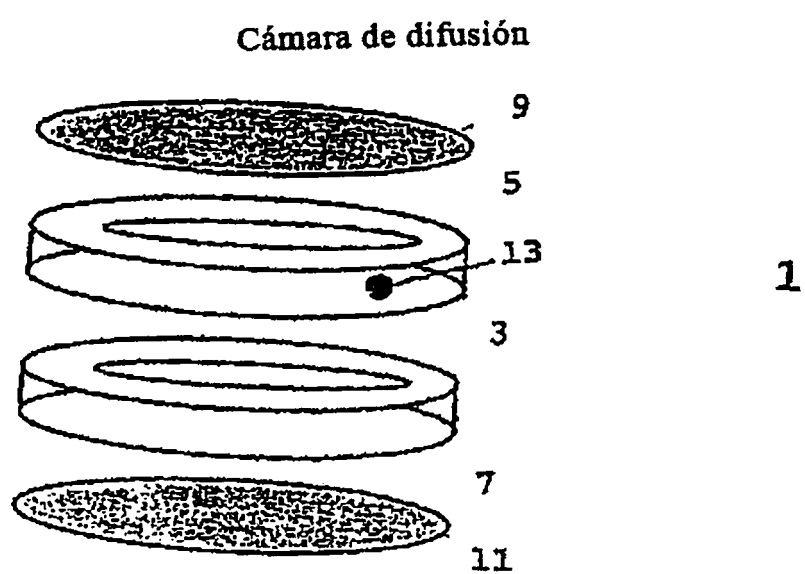


FIG. 2