

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

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
25 de noviembre de 2010 (25.11.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/133740 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C12N 5/10 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)
C12N 5/0786 (2010.01) A61P 13/12 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2010/070334

(22) Fecha de presentación internacional:

19 de mayo de 2010 (19.05.2010)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P 200930183 19 de mayo de 2009 (19.05.2009) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES];
C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):

HOTTER CORRIPIO, Georgina [ES/ES]; Instituto De Investigaciones Biomédicas De Barcelona (iibb), Rosellón, 161 - 6ª y 7ª Planta, E-08036 Barcelona (ES).
SOLA MARTÍNEZ, Anna [ES/ES]; Instituto De Investigaciones Biomédicas De Barcelona (iibb), Rosellón, 161 - 6ª y 7ª Planta, E-08036 Barcelona (ES).
JUNG, Michaela [DE/ES]; Instituto De Investigaciones Biomédicas De Barcelona (iibb), Rosellón, 161 - 6ª y 7ª Planta, E-08036 Barcelona (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Dario, 4, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,

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

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,

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

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: MPS CELL GENETICALLY MODIFIED TO OVEREXPRESS NGAL AND THE USE THEREOF AS A DRUG

(54) Título : CÉLULA DEL SMF MODIFICADA GENÉTICAMENTE PARA SOBREENPRESAR NGAL Y SU USO COMO MEDICAMENTO

(57) Abstract: The present invention lies in the field of biomedicine. Specifically, the present invention relates to a cell of the mononuclear phagocyte system (MPS), preferably a monocyte or a macrophage, which is genetically modified in order to overexpress neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), to a method for production thereof and to the use thereof for preparing a drug for preventing or treating the damage caused by ischemia, ischemia followed by reperfusion or toxins, or acute failure or rejection of a transplanted organ.

(57) Resumen: La presente invención se encuadra dentro del campo de la biomedicina. Específicamente, la presente invención se refiere a una célula del Sistema Mononuclear Fagocítico o SMF, preferiblemente un monocito o un macrófago, modificada genéticamente para sobreexpresar la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL, en sus siglas en inglés), a un método para su obtención y a su uso para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del daño causado por isquemia, isquemia seguida de reperusión o toxinas, fallo agudo o rechazo al trasplante de un órgano.



WO 2010/133740 A1

**CÉLULA DEL SMF MODIFICADA GENÉTICAMENTE PARA
SOBREEXPRESAR NGAL Y SU USO COMO MEDICAMENTO.**

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biomedicina.
5 Específicamente, la presente invención se refiere a una célula del Sistema Mononuclear Fagocítico o SMF, preferiblemente un monocito o un macrófago, modificada genéticamente para sobreexpresar la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL, en sus siglas en inglés), a un método para su obtención y a su uso para la elaboración de un medicamento para la
10 prevención o el tratamiento del daño causado por isquemia, isquemia seguida de reperfusión o toxinas, fallo agudo o rechazo al trasplante de un órgano.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 La patología de origen isquémico es la principal causa de muerte en los países desarrollados. En el caso del riñón, el fallo renal agudo (FRA) es una enfermedad que conlleva una mortalidad de más del 50%, cifra que no ha experimentado cambios significativos en las 4 últimas décadas. Normalmente los pacientes con síntomas clínicos de fallo renal, son tratados después de que
20 el daño se haya desarrollado, excepto en el caso de pacientes a los que se les va practicar un trasplante renal. Puesto que la enfermedad está desarrollada cuando el paciente llega al hospital, se requiere urgentemente disponer de vías de curación mediante la estimulación del proceso regenerativo y curativo en general.

25 Una aproximación terapéutica dirigida a disminuir la inflamación y el daño renal ha sido la terapia celular con macrófagos modificados genéticamente. En este sentido, la alteración genética de los macrófagos hacia un fenotipo antiinflamatorio, mediante el tratamiento con adenovirus recombinante para
30 expresar IL-1 ra y su posterior inyección en modelos inflamatorios de enfermedad renal puede reducir la infiltración, la inflamación glomerular e incluso la proteinuria (Holdsworth et al. Lab Invest. 1984, 51:172-180; Kitamura

et al. *Kidney Int.* 2000, 57:709-716; Kluth et al. *Gene Ther.* 2000, 7:263–270).

En cuanto a la regeneración del riñón dañado, las medidas terapéuticas empleadas hasta ahora, han sido: la aplicación de factores de crecimiento (Hirschberg et al. *Kidney Int.* 1999, 55:2423-2432; Miller y Padanilam. Chapter 17: Molecular responses and growth factors, in : *Atlas of diseases of the kidney*, Robert W Schrier, p. 17.1-17.16, Blackwell Science Press, Philadelphia, USA. 1999) o ensayos con células madre (Brodsky et al. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002, 282: F1140-F1149; Kale et al. *J Clin Invest.* 2003, 112:42-49; Lin F et al. *J Am Soc Nephrol.* 2003, 14:1188-1199; Gupta et al. *Kidney Int.* 2002, 62: 1285-1290; Oliver et al. *Clin Invest.* 2004, 114: 795-803), pero no se ha conseguido el resultado regenerativo deseado. Estudios previos han demostrado la capacidad de la terapia con macrófagos para inducir la regeneración en modelos animales de isquemia/reperfusión (I/R), si éstos eran administrados en la fase no inflamatoria (Vinuesa et al. *Journal of Pathology*; 2007, 213: 2008 Jan; 214(1):104-13).

NGAL es una proteína de 25 kDa de la superfamilia de las lipocalinas (Flower. *FEBS Lett.* 1994, 354: 7-11) que actúa sobre la proliferación en múltiples tipos celulares (Cowland et al. *J Immunol.* 2003, 171: 6630-6639; Gwira et al. *J Biol Chem.* 2005, 280: 7875-7882). Se trata de una proteína expresada en células tubulares, que aumenta notablemente en respuesta a estímulos dañinos como la isquemia o toxicidad. También se ha descrito que mejora la apoptosis de la célula tubular (Mishra et al. *J Am Soc Nephrol.* 2004, 15: 3073-3082). Estudios previos han demostrado la capacidad de NGAL para inducir la regeneración en modelos animales de isquemia/reperfusión (I/R) en la fase no inflamatoria del daño renal, pero el efecto es el contrario en la fase inflamatoria (Vinuesa E et al. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 Nov; 295(5):F1554-62.).

Por tanto, existen estudios que indican la capacidad del macrófago para modular y resolver la inflamación renal, dependiendo de su fenotipo, y también existen estudios que indican que se puede regenerar el riñón dañado, pero no

se conocen terapias que posean la doble función antiinflamatoria por una parte y potenciadora de la regeneración por otra. Existe por tanto la necesidad de disponer de terapias que permitan reducir la inflamación y el daño renal, potenciando la regeneración renal durante la fase inflamatoria del daño renal.

5

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una célula del SMF, preferiblemente un monocito o un macrófago, modificada genéticamente para sobreexpresar
10 NGAL, a un método para su obtención y a su uso para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del daño causado por isquemia, isquemia seguida de reperfusión o toxinas, de un fallo agudo o del rechazo al trasplante de un órgano.

15 En la presente invención se demuestra que macrófagos modificados genéticamente para que sobreexpresen NGAL, son capaces de disminuir la inflamación y el daño renal, además de inducir la regeneración en un modelo animal de isquemia-reperfusión renal, cuando son administrados en la fase inflamatoria del daño renal. La invención, por tanto, provee una terapia que
20 reduce la inflamación y el daño renal, potenciando la regeneración renal durante la fase inflamatoria del daño renal. Esta terapia asimismo puede emplearse en la prevención o el tratamiento del daño por isquemia, isquemia seguida de reperfusión o causada por toxinas, de un fallo agudo o del rechazo al trasplante de otros órganos.

25

El macrófago tiene su origen en las células progenitoras pluripotenciales granulo-monocíticas (CGp-GM) de la médula ósea. Por acción de los factores de estimulación colonial (CSF), la CGp-GM se diferencia en célula progenitora monopotencial monocítica (CGm-M), la cual, se diferencia en monoblasto, y
30 éste, a su vez, en promonocito, la primera célula morfológicamente identificable como precursora del macrófago y que ya posee algunas de sus características, como adherencia al vidrio y capacidad fagocítica. Por división del promonocito

y posterior diferenciación aparecen los monocitos, que abandonan la médula ósea pasando a la sangre. Los monocitos circulantes pasan por diapédesis a través del endotelio vascular, emigrando hacia los tejidos en los que se diferenciarán en macrófagos, que, a su vez, pueden presentarse en diferentes
5 estados funcionales: residentes, inflamatorios y activados. El conjunto formado por los precursores medulares, los monocitos y los macrófagos tisulares, se engloba actualmente bajo la denominación de Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF).

10 Un primer aspecto de la invención se refiere a una célula del Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF) aislada modificada genéticamente caracterizada porque comprende un polinucleótido exógeno (en adelante, el polinucleótido de la invención) que presenta una identidad con la SEQ ID NO: 1 seleccionada de la lista que consiste en:

15

- a. al menos, un 50 %,
- b. al menos, un 60 %,
- c. al menos, un 70 %,
- d. al menos, un 80 %, y

20

- e. al menos, un 90 %,

donde dicha célula del SMF es capaz de inducir la regeneración renal durante la fase inflamatoria del daño renal. Dicha capacidad se puede determinar mediante métodos convencionales tales como los ensayos descritos en el
25 Ejemplo que acompaña esta descripción.

La expresión "fase inflamatoria" tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una primera fase del daño renal caracterizada por un aumento de mediadores inflamatorios, típicamente durante las primeras 24 horas después
30 de un insulto isquémico. A su vez, este ambiente promueve el daño del tejido renal por apoptosis y necrosis. La fase regenerativa se inicia con un cambio del ambiente inflamatorio. El macrófago juega un papel importante en eliminar

células muertas que a su vez, estimulan su cambio de fenotipo hacia anti-inflamatorio y pro-proliferativo, permitiendo asimismo la inducción de la regeneración renal.

- 5 La expresión "modificada genéticamente" tal y como se utiliza en la presente descripción, incluye aquí cualquier célula del SMF en la cual el genotipo ha sido alterado de manera que comprende un polinucleótido exógeno, introducido experimentalmente, que presenta una identidad con la SEQ ID NO: 1 seleccionada de la lista que consiste en:

10

- a. al menos, un 50 %,
- b. al menos, un 60 %,
- c. al menos, un 70 %,
- d. al menos, un 80 %, y
- 15 e. al menos, un 90 %,

15

donde dicha célula del SMF es capaz de inducir la regeneración renal durante la fase inflamatoria del daño renal.

- 20 Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxiribonucleótidos (ADN ó DNA).

- 25 En una primera realización preferida de este primer aspecto de la invención, la célula del SMF modificada genéticamente está caracterizada porque comprende el polinucleótido exógeno con la SEQ ID NO: 1, que corresponde a la secuencia nucleotídica del cDNA de la proteína NGAL humana (Número de referencia del *Genbank*: NM_005564).

30

En una segunda realización preferida de este primer aspecto de la invención, la célula del SMF modificada genéticamente está caracterizada porque

comprende el polinucleótido exógeno con la SEQ ID NO: 2, del cDNA de la proteína NGAL de ratón (Número de referencia del *Genbank*: NM_008491).

En una tercera realización preferida de este primer aspecto de la invención, la
5 célula del SMF modificada genéticamente está caracterizada porque comprende el polinucleótido de la invención unido operativamente a, al menos, una secuencia de control de la lista que comprende:

- 10 a. un promotor que dirija la transcripción de dicho polinucleótido,
- b. una señal de inicio de la transcripción,
- c. una señal de terminación de la transcripción,
- d. una señal de poliadenilación, o
- e. un activador transcripcional.

15 “Secuencia de control” se refiere a secuencias de polinucleótidos que afectan la expresión de las secuencias a las que están ligadas. En células eucariotas, generalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores, señales de terminación, intensificadores o silenciadores. Se pretende que el término “secuencias de control” incluya, como mínimo, todos los componentes cuya
20 presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa.

“Unidos operativamente” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la
25 manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” al polinucleótido, está ligada al mismo de tal manera que se consigue la expresión de la secuencia codificadora del polinucleótido.

Como se usa aquí, el término “promotor” hace referencia a una región del DNA
30 situada en posición 5’ con respecto al punto de inicio de la transcripción y que resulta necesaria o facilita dicha transcripción en una célula animal. Este término incluye, por ejemplo, pero sin limitarse, promotores constitutivos,

promotores específicos de tipo celular o de tejido o promotores inducibles o reprimibles.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la célula del SMF
5 modificada genéticamente está caracterizada porque comprende un polinucleótido exógeno que codifica la proteína NGAL.

En una cuarta realización preferida de este primer aspecto de la invención, la
célula del SMF modificada genéticamente está caracterizada porque
10 comprende un polinucleótido exógeno que codifica una secuencia aminoacídica que presenta una identidad con la SEQ ID NO: 3 seleccionada de la lista que consiste en:

- a. al menos, un 50 %,
- 15 b. al menos, un 60 %,
- c. al menos, un 70 %,
- d. al menos, un 80 %, y
- e. al menos, un 90 %,

20 donde dicha célula del SMF es capaz de inducir la regeneración renal durante la fase inflamatoria del daño renal. Dicha capacidad se puede determinar mediante métodos convencionales tales como los ensayos descritos en el Ejemplo que acompaña a esta descripción.

25 Los términos “secuencia aminoacídica”, “péptido”, “oligopéptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden estar, o no, química o bioquímicamente modificados.

30 En una quinta realización preferida de este primer aspecto de la invención, la célula del SMF modificada genéticamente está caracterizada porque comprende un polinucleótido exógeno que codifica la secuencia aminoacídica

SEQ ID NO: 3, que corresponde a la secuencia aminoacídica de la proteína NGAL humana (Número de referencia del *Genbank*: NP_005555).

5 En una sexta realización preferida de este primer aspecto de la invención, la célula del SMF modificada genéticamente está caracterizada porque comprende un polinucleótido exógeno que codifica la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4, que corresponde a la secuencia aminoacídica de la proteína NGAL de ratón (Número de referencia del *Genbank*: NP_032517).

10 Los términos “NGAL”, “lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos” o “lipocalina-2” se refieren a una proteína de 25 kDa de la superfamilia de las lipocalinas.

15 El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias nucleotídicas o aminoacídicas que se comparan. El tanto por ciento de identidad existente entre dos secuencias puede ser verificado fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

20 Preferiblemente, la célula del SMF es una célula de mamífero, y más, preferiblemente, de un humano. Aún más preferiblemente, la célula del SMF es un monocito o un macrófago.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la célula del SFM, preferiblemente, un monocito o un macrófago, modificada genéticamente según se ha descrito anteriormente en este documento (de ahora en adelante, célula de la invención) para la elaboración de un medicamento.

30 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la célula de la invención para la elaboración de un medicamento de terapia génica. En general, se entiende por medicamento de terapia génica cualquier producto obtenido mediante un

conjunto de procesos de fabricación destinados a transferir, bien *in vivo* bien *ex vivo*, un ácido nucleico profiláctico, de diagnóstico o terapéutico a células animales, preferiblemente humanas, y su posterior expresión *in vivo*. Entre los medicamentos de terapia génica se encuentran, pero sin limitarse los
5 siguientes, ácido nucleico desnudo, vectores no virales, vectores virales o células modificadas genéticamente. Tal y como se utiliza en la presente descripción, el término “medicamento de terapia génica”, se refiere a cualquier medicamento que comprende una célula del SMF modificada caracterizada porque comprende el polinucleótido de la invención. Puede tratarse de
10 medicamentos de terapia génica basados en células autólogas (procedentes del propio paciente), como alogénicas (de otro ser humano) o xenogénicas (de animales).

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la célula de la
15 invención para la elaboración de un medicamento de terapia génica para la prevención o el tratamiento del daño causado por isquemia, isquemia-reperusión o toxinas en un tejido o un órgano. Preferiblemente, el tejido o el órgano es de la lista que comprende: riñón, hígado, cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, colon, páncreas, vejiga, útero o piel. Más preferiblemente,
20 el órgano es el riñón.

El término “isquemia” se refiere a una disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo en un tejido o un órgano, con la consecuente disminución del aporte de oxígeno. El conjunto de los daños que sufre el tejido o el órgano
25 debido a la isquemia se conoce como “daño causado por isquemia”.

El término “reperusión” se refiere a la restauración del suministro de sangre a un tejido o un órgano que está isquémico como consecuencia de una disminución del riego normal de sangre. La recuperación del riego sanguíneo
30 restaura el aporte de oxígeno y nutrientes al tejido, permitiendo la recuperación del tejido o del órgano isquémico. Sin embargo, la reperusión en sí misma

puede lesionar el tejido o el órgano isquémico, ocasionando lo que se conoce como “daño causado por reperfusión”.

La expresión “daño por isquemia-reperfusión” se refiere al conjunto de los
5 daños que sufre un tejido o un órgano debido a una disminución del riego sanguíneo (isquemia) seguida de una restauración del riego sanguíneo (reperfusión).

La expresión “daño causado por toxinas” se refiere al conjunto de los daños
10 que sufre un tejido o un órgano como consecuencia de su exposición a toxinas como, por ejemplo, pero sin limitarse, antibióticos, anestésicos, quimioterapéuticos, contrastes radiológicos, metales pesados, fungicidas, pesticidas, solventes orgánicos, venenos animales, tóxicos fúngicos o tóxicos de origen endógeno.

15 Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del daño causado por isquemia en el riñón o isquemia renal. La isquemia renal consiste en una disminución transitoria o
20 permanente del riego sanguíneo, con la consecuente disminución del aporte de oxígeno al riñón, como consecuencia, por ejemplo, pero sin limitarse de una disminución del volumen sanguíneo total, una redistribución de la sangre o una obstrucción. La disminución del riego sanguíneo puede ser unilateral, cuando afecta únicamente a un riñón, o bilateral, cuando afecta a los dos riñones. El
25 conjunto de los daños que sufre el tejido o el órgano debido a la isquemia se conoce como “daño causado por isquemia renal”.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la
30 prevención o el tratamiento del daño causado por isquemia-reperfusión en el riñón o isquemia-reperfusión renal. La expresión “daño por isquemia-reperfusión renal” se refiere al conjunto de los daños que sufre el riñón debido

a una disminución del riego sanguíneo (isquemia renal) seguida de una restauración del riego sanguíneo (reperfusión).

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la
5 célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la
prevención o el tratamiento del daño que sufre el tejido renal o el riñón como
consecuencia de su exposición a toxinas como, por ejemplo, pero sin limitarse,
antibióticos, anestésicos, quimioterapéuticos, contrastes radiológicos, metales
pesados, fungicidas, pesticidas, solventes orgánicos, venenos animales,
10 tóxicos fúngicos o tóxicos de origen endógeno.

Como consecuencia de los daños causados por isquemia, isquemia-
reperfusión o toxinas en un órgano puede producirse un fallo agudo orgánico.
Los términos “fallo agudo”, “fallo orgánico agudo” o “fracaso orgánico agudo”,
15 se refieren a un síndrome clínico que se caracteriza por un deterioro brusco de
la función de un determinado órgano.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la célula de la
invención para la elaboración de un medicamento para la prevención o el
20 tratamiento de un fallo agudo de un órgano. Preferiblemente, el tejido o el
órgano es de la lista que comprende: riñón, hígado, cerebro, corazón, pulmón,
estómago, intestino, colon, páncreas, vejiga, útero o piel. Más preferiblemente,
el órgano es el riñón.

25 Como consecuencia de los daños causados por isquemia, isquemia-
reperfusión o toxinas en el riñón puede producirse un fallo renal agudo (FRA).
Los términos “fallo renal agudo”, “fracaso renal agudo” o “insuficiencia renal
aguda (IRA)” se refieren a un síndrome clínico que se caracteriza por un
deterioro brusco de la función renal que tiene como consecuencia una
30 disminución del filtrado glomerular y una acumulación de productos
nitrogenados séricos (como, por ejemplo, urea o creatinina), pudiendo también
producirse alteraciones del equilibrio hidroelectrolítico y del equilibrio ácido

base. El FRA puede clasificarse en tres grandes grupos: FRA funcional, FRA parenquimatoso o FRA obstructivo. En el FRA funcional existe una inadecuada perfusión renal que compromete el filtrado glomerular, pero el parénquima glomerular está íntegro. La insuficiencia renal que se produce durante el FRA funcional es reversible tras restaurar el flujo plasmático, pero si persiste la situación que lo ha desencadenado evolucionará hacia un FRA parenquimatoso. En el FRA parenquimatoso la causa del deterioro de la función renal es un daño en las diferentes estructuras anatómicas renales, que da lugar a diferentes síndromes clínicos: el túbulo (necrosis tubular aguda), el glomérulo (necrosis glomerular), el intersticio tubular (necrosis tubular intersticial) o los vasos sanguíneos. En el FRA obstructivo se produce un aumento de la presión en la vía urinaria, que se transmite retrógradamente, comprometiendo el filtrado glomerular normal, como consecuencia de la obstrucción de alguno de los conductos del riñón.

15

Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un FRA.

20 Una de las situaciones más frecuentes de daño causado por isquemia-reperfusión tiene lugar en el transplante de órganos. De hecho, el fallo orgánico agudo es una de las primeras causas por las que se produce el rechazo de órganos transplantados.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del rechazo de un órgano transplantado. Preferiblemente, el tejido o el órgano es de la lista que comprende: riñón, hígado, cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, colon, páncreas, vejiga, útero o piel. Más
30 preferiblemente, el órgano es el riñón.

El FRA asociado al daño causado por isquemia-reperfusión es una de las principales causas por las que se produce el retraso inicial en la función o el rechazo de un riñón transplantado.

- 5 Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del rechazo de un riñón transplantado.

- 10 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la célula de la invención.

- Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la célula de la invención para la prevención o el tratamiento del daño causado por isquemia, isquemia-reperfusión o toxinas en un tejido o un órgano. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la célula de la invención para la prevención o el tratamiento del daño causado por isquemia, isquemia-reperfusión o toxinas en un órgano de la lista que comprende: riñón, hígado, cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, colon, páncreas, vejiga, útero o piel. Una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la célula de la invención para la prevención o el tratamiento del daño causado por isquemia, isquemia-reperfusión o toxinas en el riñón.

- 25 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la célula de la invención para la prevención o el tratamiento de un fallo agudo de un órgano. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la célula de la invención para la prevención o el tratamiento de un fallo agudo de un órgano de la lista que comprende: riñón, hígado, cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, colon, páncreas, vejiga, útero o piel. Una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere a una
- 30

composición farmacéutica que comprende la célula de la invención para la prevención o el tratamiento de un FRA.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición
5 farmacéutica que comprende la célula de la invención para la prevención o el
tratamiento del rechazo de un órgano transplantado. Una realización preferida
de este aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que
comprende la célula de la invención para la prevención o el tratamiento del
rechazo de un órgano transplantado de la lista que comprende riñón, hígado,
10 cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, colon, páncreas, vejiga, útero o
piel. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a una
composición farmacéutica que comprende la célula de la invención para la
prevención o el tratamiento del rechazo de un riñón transplantado.

15 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición
farmacéutica según se ha descrito anteriormente en este documento,
comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una
realización más preferida de la presente invención, la composición
farmacéutica comprende además otro principio activo. En una realización más
20 preferida de la presente invención, la composición farmacéutica comprende
junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, además, otro principio
activo.

Como se emplea aquí, los términos “principio activo”, “sustancia activa”,
25 “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” o “ingrediente
farmacéuticamente activo” se refiere a cualquier componente que
potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente
en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de una
enfermedad, o que afecte a la estructura o función del cuerpo del ser humano u
30 otros animales.

Las composiciones pueden formularse para su administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal y, más preferiblemente, a un mamífero, incluyendo a un humano, por una variedad de vías, incluyendo, pero
5 sin limitarse a parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracapsular, intracardiaca, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular o tópica.

10 La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como, por ejemplo, edad, peso, sexo o tolerancia del animal. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de la composición farmacéuticamente efectiva que produzca el efecto deseado y, en general,
15 vendrá determinada entre otras causas, por las características propias de dicha composición farmacéutica y del efecto terapéutico a conseguir. Los "adyuvantes" o "vehículos" farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos en el estado de la técnica.

20

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para obtener la célula de la invención que comprende:

a. obtener una célula del SFM aislada, y
25 b. transfectar la célula del paso (a) con un ácido nucleico que comprende un polinucleótido, donde dicho polinucleótido presenta una identidad con la SEQ ID NO: 1 seleccionada de la lista consiste en:

30 i) al menos, un 50 %,
ii) al menos, un 60 %,
iii) al menos, un 70 %,

iv) al menos, un 80 %, y

v) al menos, un 90 %.

5 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el polinucleótido comprendido en el ácido nucleico transfectado en el paso (b) del método de la invención es la SEQ ID NO: 1.

10 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el polinucleótido comprendido en el ácido nucleico transfectado en el paso (b) del método de la invención es la SEQ ID NO: 2.

15 En una realización más preferida de este aspecto de la invención, el polinucleótido comprendido en el ácido nucleico transfectado en el paso (b) está unido operativamente a, al menos, una secuencia de control de la lista que comprende:

- a. un promotor que dirija la transcripción de dicho polinucleótido,
- b. una señal de inicio de la transcripción,
- c. una señal de terminación de la transcripción,
- 20 d. una señal de poliadenilación, o
- e. un activador transcripcional.

25 El término "transfectar", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a introducir un ácido nucleico exógeno al interior de una célula eucariota.

El ácido nucleico del paso (b) del método de la presente invención puede ser introducido al interior de la célula del SFM aislada obtenida en el paso (a), por ejemplo, pero sin limitarse, como ácido nucleico desnudo o mediante un vector.

30

Tal como se utiliza en la presente invención los términos "vector" o "vector de transferencia génica", se refieren a sistemas utilizados en el proceso de

transfección de un ácido nucleico exógeno al interior de una célula, permitiendo de este modo la vehiculación del ácido nucleico al interior de la célula.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la célula del SFM
5 se pone en contacto con un vector de transferencia génica, el cual comprende el ácido nucleico que comprende el polinucleótido del paso (b), de tal manera que el ácido nucleico es introducido en la célula bajo las condiciones apropiadas para que dicho polinucleótido sea expresado en el interior de la célula. El vector puede ser viral o no viral. Existen numerosos vectores virales y
10 no virales para introducir DNA exógeno dentro de las células madre que son bien conocidos para aquellos expertos en la materia. Vectores virales apropiados para poner en práctica esta realización de la invención incluyen, pero no están limitados a los siguientes: vectores adenovirales, vectores adenoasociados, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores
15 alfavirales, vectores herpesvirales y vectores derivados de coronavirus. Vectores de tipo no viral apropiados para poner en práctica esta realización de la invención incluyen, pero no están limitados a los siguientes: *gene gun*, liposomas, poliaminas, péptidos, dendrímeros, glicopolímeros catiónicos, complejos liposoma-polición, proteínas y sistemas de transferencia génica
20 mediados por receptor.

En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, la transfección del ácido nucleico del paso (b) se realiza empleando un vector adenoviral.

25 Preferiblemente, la célula del SMF obtenida en el paso (a) es una célula de mamífero, y más, preferiblemente, de un humano. Aún más preferiblemente, la célula del SMF es un monocito o un macrófago.

30 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas

y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

5

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Muestra el efecto de la administración de los macrófagos modificados genéticamente para sobreexpresar NGAL sobre el daño renal. A. Efecto sobre la expresión del marcador de daño funcional del riñón BUN. B. Efecto sobre la expresión del marcador de daño funcional del riñón creatina. A y B. Datos representados como la media $\pm$ SEM; $p < 0,05$; $n = 5$. C. Efecto sobre el daño histológico analizado en secciones de tejido teñidas con hematoxilina-eosina. Magnificación original x 400.

15

Figura 2. Muestra el efecto de la administración de los macrófagos modificados genéticamente para sobreexpresar NGAL sobre la proliferación y la regeneración renal. A. Efecto sobre la expresión del marcador de proliferación y regeneración renal *Ki67*. B. Efecto sobre la expresión del marcador de proliferación y regeneración renal *creatina*. A y B. Datos representados como la media $\pm$ SEM; $p < 0,05$; $n = 5$. C. Efecto sobre la expresión de los marcadores regenerativos PCNA y Statmina analizada mediante inmunofluorescencia. El PCNA se caracteriza por una tinción nuclear de las células durante la fase G1 tardía y fase S. La Statmina sin embargo es una proteína citosólica que actúa en la transición de la fase G2 a M (ver flechas). Magnificación original x 400.

25

Figura 3. Muestra el efecto de la administración de los macrófagos modificados genéticamente para sobreexpresar NGAL sobre la inflamación. Efecto sobre la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias *TNF- α* (A) e *IL-1* (B). Efecto sobre la expresión de las citoquinas anti-inflamatorias *IL-10* (C) e *IL-4* (D). A-C. Datos representados como la media $\pm$ SEM; $p < 0,05$; $n = 5$.

30

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos
5 ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

10 **EJEMPLO 1. Macrófagos modificados genéticamente para la sobreexpresión de NGAL para inducir la regeneración en un modelo animal de isquemia-reperfusión renal.**

MATERIAL Y MÉTODOS EMPLEADOS

15

Modelo de isquemia-reperfusión renal

Se utilizaron ratas de la cepa Sprague Dawley, machos de un peso aproximadamente de 225-250g (Charles River, Francia). Todas las
20 intervenciones se realizaron bajo la supervisión del comité ético de nuestra institución y siguieron las pautas de la Unión Europea. Las condiciones ambientales se mantuvieron constantes, la temperatura fue de 21-22°C, la humedad relativa del 70% y los ciclos alternativos de luz/oscuridad de 12h. Los animales fueron alimentados con una dieta estándar de pienso AO4 (Panlab,
25 Barcelona) y agua de la red de Barcelona *ad libitum*.

Los animales fueron anestesiados con Isoflurane, se colocaron en posición supina y se mantuvo la temperatura corporal entre 36 y 37°C. Después de
30 realizar una laparotomía media para acceder al riñón apartando cuidadosamente el paquete intestinal, se indujo la isquemia bilateral mediante el clampaje de ambos pedículos arteriovenosos renales durante 45 minutos con un clamp microvascular no-traumático. Posteriormente se inició el período de

reperfusión, con la retirada del clamp y se verificó visualmente con la observación del regreso del flujo sanguíneo al riñón. A continuación se suturó el animal y se administró Buprex subcutáneo (4,16µg/100g de peso). Animales sujetos a una operación *sham* fueron utilizados como controles. Durante todo el

5 proceso de operación, los animales fueron bien hidratados y la temperatura corporal se mantuvo alrededor de 37°C. Durante el tiempo de reperfusión, los animales se estabularon bajo el control de un veterinario. Pasadas 24h de reperfusión, el animal se sacrificó para la extracción de los riñones y de sangre. El tejido fue conservado inmediatamente en formol para las pruebas

10 histológicas o congelado en nieve carbónica y posteriormente almacenado a -80°C.

Grupos de estudio.

- 15 **I/R.-** Animales sometidos a 45 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión.
- I/R NGAL.-** Animales sometidos a I/R pero con inyección de 10×10^6 macrófagos genéticamente modificados para expresar NGAL por animal, mediante punción directa de la vena cava inferior, 1 hora después del inicio del tiempo de reperfusión.
- 20 **I/R bgal.-** Animales sometidos a I/R pero con inyección de 10×10^6 macrófagos con el virus control para expresar la β -Galactosidasa por animal, mediante punción directa de la vena cava inferior, 1 hora después del inicio del tiempo de reperfusión.
- Sham NGAL.-** Animales control, no sometidos a isquemia/reperfusión y con
- 25 administración de 10×10^6 macrófagos modificados genéticamente para expresar NGAL por animal.
- Sham bgal.-** Idem que SHAM NGAL, pero con inyección de macrófagos con el virus control para expresar la β -Galactosidasa.

Cultivo celular de macrófagos primarios derivados de la medula ósea, transfección viral y posterior infusión al animal.

Células derivadas de la medula ósea de ratas Sprague Dawley fueron
5 recogidas mediante la aspiración de los fémures y se cultivaron en Dulbecco's
Modified Eagle Medium (DMEM):F-12 1:1 (volumen/volumen) con
concentración alta de glucosa, 15mM Hepes y glutamina estable,
suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 10%
10 (volumen final) suero bovino fetal inactivado, y 10ng/ml del factor estimulante
de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) (Invitrogen, Barcelona).
Las células se mantuvieron en flascos de teflón, no adherentes, durante 7
días para la maduración a macrófagos.

Posteriormente, los macrófagos fueron separados mediante adherencia
15 diferencial. Las células se mantuvieron en una atmósfera con 5% CO₂ en aire,
a 37°C.

Para la transfección viral, 10x10⁶ células fueron transfectadas con un
adenovirus para sobreexpresar el NGAL (Ad-NGAL; producido y purificado por
20 Viraquest, USA). Como virus control utilizamos un vector similar para la
expresión de β-Galactosidasa (Ad-bgal), que fue producido en células HEK 293
y purificado por gradiente de cloruro de cesio. El título de cada virus fue
determinado mediante análisis en placa en células HeLa. La eficiencia de cada
transfección fue medida mediante la determinación de proteína por ELISA en el
25 sobrenadante del cultivo celular. La transfección viral se estableció con una
multiplicidad de infección (MOI) de 50. A las 48 horas post-transfección, los
macrófagos fueron recogidos en un tubo y se mantuvieron en PBS hasta su
posterior infusión en el animal.

Marcadores de daño funcional del riñón.

Nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina en plasma fueron analizados como marcadores de función renal utilizando un ADVIA 2400 (Siemens Medical
5 Diagnostics) del Hospital Clínico de Barcelona.

Análisis histológico.

Las muestras fueron incluidas en parafina, cortadas en secciones de 4µm, y
10 teñido con hematoxilina y eosina (H&E). Evaluación del daño histológico fue determinado mediante microscopía convencional.

Inmunofluorescencia de los marcadores regenerativos PCNA y Statmina.

15 Todas las muestras se fijaron en formaldehído al 4% y posteriormente se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 4µm que fueron lavados en xilol, y deshidratados mediante alcoholes de graduación decreciente, con lavado en PBS y posterior bloqueo de uniones inespecíficas con suero de cabra durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron las muestras con
20 PCNA (Santa Cruz Biotechnology) y Statmina (Calbiochem) para detectar la regeneración en el tejido renal. Las muestras se incubaron con anticuerpos fluorescentes secundarios para revelar la tinción con PCNA y Statmina en el tejido (rabbit anti-goat IgG conjugado con Alexa Fluor 488 para Statmina y goat anti-mouse IgG conjugado con Alexa Fluor 568 para PCNA; Molecular Probes)
25 durante dos horas a temperatura ambiente en oscuridad. Los cortes fueron montados con mowiol (Calbiochem) y las imágenes se obtenían mediante un microscopio confocal láser Leica TCS NT (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) a una magnificación original de x400.

RT-PCR a tiempo real.

El RNA de las muestras de riñón fue extraído mediante el reactivo TRIzol de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Barcelona). Se extrajo
5 el RNA total de las células con el RNeasy mini Kit de Qiagen (Madrid) acorde a las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de RNA fueron calculadas por determinación de absorbancia a 260 nm. La integridad del RNA así
10 obtenido se examinó mediante análisis de las bandas de RNA ribosomal 18S y 28S detectado y analizado en el Bioanalyzer del Hospital Clínico Barcelona (Agilent).

La expresión de los genes analizados se midió mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real normalizada con el gen constitutivo (o *housekeeping*, en inglés) de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Las RT-PCRs a tiempo real
15 se llevaron a cabo en un Termociclador Bio-Rad (iCycler iQ Real-Time PCR detection System, Bio-Rad, Barcelona) y las amplificaciones se hicieron en reacciones de 20 µl con el RT-PCR Kit con SYBR-Green en dos pasos (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante. Los primers fueron los siguientes:
20 *Ki-67*: directo, SEQ ID NO: 5; inverso, SEQ ID NO: 6; *PCNA*: directo, SEQ ID NO: 7; inverso, SEQ ID NO: 8; *NGAL*: directo, SEQ ID NO: 9; inverso, SEQ ID NO: 10; *TNF-α*: directo, SEQ ID NO: 11; inverso, SEQ ID NO: 12; *GAPDH*: directo, SEQ ID NO: 13; inverso, SEQ ID NO: 14. Los datos de las demás
25 citoquinas (*IL-1*, *IL-10*, *IL-4*) fueron obtenidas usando primers pre-validados de Qiagen (Barcelona, España) con los números de referencia QT00181657, QT00106169 y QT00160678, respectivamente.

ELISA de NGAL.

El sobrenadante de las células fue recogido, centrifugado y guardado a -80°C
30 hasta su uso. La placa de ELISA de 96 pocillos se preincubó con Anti-mouse Lipocalin-2/NGAL (R&D Systems, Madrid), mediante la adición de 1µl de la solución madre del anticuerpo, diluido en 99µl de tampón carbonato 1:100

durante 18 horas a 4°C. Tras lavado de la placa, se bloquearon las uniones inespecíficas durante 1h a temperatura ambiente.

5 Se añadieron 50µL de cada muestra a la placa de ELISA y se mantuvieron 1 hora a temperatura ambiente., .Trás otro lavado, se añadieron 100 µl de un anticuerpo de detección biotiniliado, Anti-Mouse Lipocalin-2/NGAL (R&D Systems, Madrid), obtenido tras dilución de 1µl de la solución madre en 99 µl de tampón de dilución 1:100. El anticuerpo biotinilado se incubó durante 1h a temperatura ambiente.

10

Posteriormente se añadieron 100 µl de avidina HRP-conjugada (Zymed, Invitrogen, Barcelona), obtenida tras dilución de 1µl de la solución madre en 1999 µl de tampón de dilución 1:2000. Se incubó durante 1h a temperatura ambiente, para reconocer la unión del anticuerpo biotiniliado.

15

Finalmente se aplicó el agente colorante (OPD tablets, Dako, Barcelona) para medir la absorbancia a 492 nm.

Analisis estadístico.

20

Los datos se muestran como media +/- el error estándar de la media (SEM), y los valores de $p > 0,05$ se consideraron significativos. Las diferencias estadísticas entre grupos se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA), y en caso de significancia se aplicó la t-Student.

25

RESULTADOS OBTENIDOS.

Efecto de la administración de los macrófagos modificados genéticamente para sobreexpresar NGAL sobre el daño renal.

30

Como se observa en la figura 1A, el nitrógeno ureico en sangre (BUN), marcador de daño renal funcional, se incrementa significativamente en el grupo

de isquemia-reperfusión. Sin embargo, al administrar macrófagos genéticamente modificados para sobreexpresar NGAL se observa un descenso significativo de este parámetro de daño. En ninguno de los grupos a los que se administró macrófagos transfectados con el virus control (Sham bgal; I/R bgal) se pudo detectar ningún efecto protector respecto a sus respectivos controles (Sham; I/R). Los datos se muestran como media $\pm$ SEM, y los valores de $p > 0,05$ se consideraron significativos. Las diferencias estadísticas entre grupos se analizaron con un análisis ANOVA, y en caso de significancia se aplicó la t-Student.

10

Como se observa en la figura 1B, la creatinina en sangre, marcador de daño renal funcional, se incrementa significativamente en el grupo de isquemia-reperfusión. Sin embargo, al administrar macrófagos genéticamente modificados para sobreexpresar NGAL se observa un descenso significativo de este parámetro de daño. En ninguno de los grupos a los que se les administró macrófagos transfectados con el virus control (Sham bgal; I/R bgal) se pudo detectar ningún efecto protector respecto a sus respectivos controles (Sham; I/R). Los datos se muestran como media $\pm$ SEM, y los valores de $p > 0,05$ se consideraron significativos. Las diferencias estadísticas entre grupos se analizaron con un análisis ANOVA, y en caso de significancia se aplicó la t-Student.

20

El análisis histológico de cortes del tejido renal (figura 1C) revela que el área más afectada se encuentra en la médula del riñón. A las 24 horas de perfusión se observa edema intersticial grave, infiltración de células, necrosis, y la deposición de material proteico en el lumen tubular. Sin embargo, el tratamiento con macrófagos previamente modificados para sobreexpresar el NGAL preserva la integridad del tejido renal. Los macrófagos tratados con el virus control no tienen este efecto protector y se observa un grado de daño parecido a las 24 horas de perfusión. En la figura 1C se muestran fotos representativas de los tres grupos principales (Sham; I/R; I/R NGAL).

25

30

Efecto de la administración de los macrófagos modificados genéticamente para sobreexpresar NGAL sobre la proliferación y la regeneración.

5 En la figura 2A se muestra la expresión de Ki-67, marcador de proliferación celular y regeneración que se expresa durante todas las fases del ciclo celular, excepto G0. Los resultados de la RT-PCR a tiempo real muestran que a las 24 horas de reperfusión no se expresa Ki-67 en las células epiteliales tubulares del riñón y por lo tanto no hay regeneración en este tiempo en que las células
10 probablemente están muriendo por apoptosis inducida por la isquemia-reperfusión. Al contrario, al administrar macrófagos sobreexpresando el NGAL detectamos un aumento significativo de la proliferación celular en el tejido y por lo tanto una avanzada regeneración al tiempo de 24 horas de reperfusión. Los macrófagos tratados con el virus control no tuvieron la capacidad de inducir la
15 proliferación en el tejido renal lo que nos indica que es el NGAL el responsable de promover la regeneración renal. Los datos se muestran como media +/- SEM, y los valores de $p > 0,05$ se consideraron significativos. Las diferencias estadísticas entre grupos se analizaron con un análisis ANOVA, y en caso de significancia se aplicó la t-Student.

20

En la figura 2B se muestra la expresión de PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), marcador de proliferación celular y regeneración que tiene un pico de expresión en la fase S del ciclo celular, y por lo tanto en células mitóticamente activas. Los resultados de la RT-PCR a tiempo real muestran que solo se
25 encuentra sobreexpresado en el grupo de macrófagos sobreexpresando NGAL. Los datos se muestran como media +/- SEM, y los valores de $p > 0,05$ se consideraron significativos. Las diferencias estadísticas entre grupos se analizaron con un análisis ANOVA, y en caso de significancia se aplicó la t-Student.

30

La figura 2C muestra el perfil de regeneración mediante inmunofluorescencia de PCNA y Statmina. Recientemente, la Statmina se ha descubierto como

nuevo marcador de proliferación en la reparación tras un insulto agudo por isquemia renal. Es una fosfoproteína citosólica y está asociada a la inducción de proliferación y la reentrada de células en el ciclo celular. El PCNA sin embargo interactúa con diversas moléculas, y afecta al metabolismo celular, a los mecanismos de reparación del DNA y a su síntesis. Detectamos mediante microscopía confocal que el tratamiento con macrófagos sobreexpresando la NGAL efectivamente inducen tanto la expresión de PCNA como de Statmina a un nivel muy alto. Estas observaciones confirman el papel clave de la NGAL en la inducción de la regeneración renal. Al contrario, cuando administramos macrófagos transfectados con el virus control, no se detecta ningún efecto sobre la proliferación celular y los niveles de expresión de PCNA y Statmina se parecen al grupo de 24 horas de perfusión.

Efecto de la administración de los macrófagos modificados genéticamente para sobreexpresar NGAL sobre la inflamación.

La figura 3 muestra los resultados de RT-PCR que indican la expresión de citoquinas tanto pro- como antiinflamatorias tras el tratamiento con macrófagos genéticamente modificados con Ad-NGAL. Los resultados muestran una disminución de citoquinas proinflamatorias, representadas por TNF- α e IL-1, cuando administramos macrófagos tratados con el virus portador de NGAL (en los animales del grupo I/R NGAL) comparado con los niveles de inflamación a las 24 horas de perfusión en los animales no tratados (I/R) o tratados con el virus control (I/R bgal). Al contrario, las citoquinas antiinflamatorias, representadas por IL-10 e IL-4, muestran un aumento tras el tratamiento con macrófagos que sobreexpresan NGAL. Por lo tanto podemos deducir un efecto protector y antiinflamatorio con el tratamiento de macrófagos genéticamente modificados y el papel clave de NGAL en estos procesos. Los datos se muestran como media $\pm$ SEM, y los valores de $p > 0,05$ se consideraron significativos. Las diferencias estadísticas entre grupos se analizaron con un análisis ANOVA, y en caso de significancia se aplicó la t-Student.

REIVINDICACIONES

1. Célula del Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF) aislada modificada genéticamente caracterizada porque comprende un polinucleótido exógeno que
5 presenta una identidad con la SEQ ID NO: 1 seleccionada de la lista que consiste en:
- a. al menos, un 50 %,
 - b. al menos, un 60 %,
 - 10 c. al menos, un 70 %,
 - d. al menos, un 80 %, y
 - e. al menos, un 90 %,
2. Célula del SMF modificada genéticamente según la reivindicación 1
15 caracterizada porque comprende el polinucleótido exógeno con la SEQ ID NO: 1.
3. Célula del SMF modificada genéticamente según la reivindicación 1
20 caracterizada porque comprende el polinucleótido exógeno con la SEQ ID NO: 2.
4. Célula del SMF modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el polinucleótido exógeno está unido operativamente a, al menos, una secuencia de control de la lista que
25 comprende:
- a. un promotor que dirija la transcripción de dicho polinucleótido,
 - b. una señal de inicio de la transcripción,
 - c. una señal de terminación de la transcripción,
 - 30 d. una señal de poliadenilación, o
 - e. un activador transcripcional.

5. Célula del SMF modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde el polinucleótido exógeno codifica una secuencia aminoacídica que presenta una identidad con la SEQ ID NO: 3 seleccionada de la lista que consiste en:

5

- a. al menos, un 50 %,
- b. al menos, un 60 %,
- c. al menos, un 70 %,
- d. al menos, un 80 %, y
- e. al menos, un 90 %,

10

6. Célula del SMF modificada genéticamente según la reivindicación 5 donde el polinucleótido exógeno codifica la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3.

15

7. Célula del SMF modificada genéticamente según la reivindicación 5 donde el polinucleótido exógeno codifica la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4.

20 8. Célula del SMF modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde dicha célula es un monocito o un macrófago.

9. Composición farmacéutica que comprende la célula del SMF modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

25

10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9 que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

11. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó
30 10 que además comprende otro principio activo.

12. Uso de la célula del SMF modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la elaboración de un medicamento.
- 5 13. Uso de la célula del SMF modificada genéticamente según la reivindicación 12 para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del daño causado por isquemia, isquemia-reperfusión o toxinas en un tejido o un órgano.
- 10 14. Uso de la célula del SMF modificada genéticamente según la reivindicación 12 para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un fallo agudo de un órgano.
- 15 15. Uso de la célula del SMF modificada genéticamente según la reivindicación 12 para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del rechazo de un órgano transplantado.
- 20 16. Uso de la célula del SMF modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 donde el órgano es de la lista que comprende: riñón, hígado, cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, colon, páncreas, vejiga, útero o piel.
17. Uso de la célula del SMF modificada genéticamente según la reivindicación 16 donde el órgano es el riñón.
- 25 18. Método de obtención de la célula del SMF modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende:
- a. obtener una célula del SFM aislada, y
 - b. transfectar la célula del paso (a) con un ácido nucleico que
- 30 comprende un polinucleótido, donde dicho polinucleótido presenta una identidad con la SEQ ID NO: 1 seleccionada de la lista consiste en:

- 5 i) al menos, un 50 %,
 ii) al menos, un 60 %,
 iii) al menos, un 70 %,
 iv) al menos, un 80 %, y
 v) al menos, un 90 %.

10 19. Método de obtención de la célula del SMF modificada genéticamente según la reivindicación 18 donde el polinucleótido del paso (b) es la SEQ ID NO: 1.

 20. Método de obtención de la célula del SMF modificada genéticamente según la reivindicación 18 donde el polinucleótido del paso (b) es la SEQ ID NO: 2.

15 21. Método de obtención de la célula del SMF modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20 donde el polinucleótido del paso (b) está unido operativamente a, al menos, una secuencia de control de la lista que comprende:

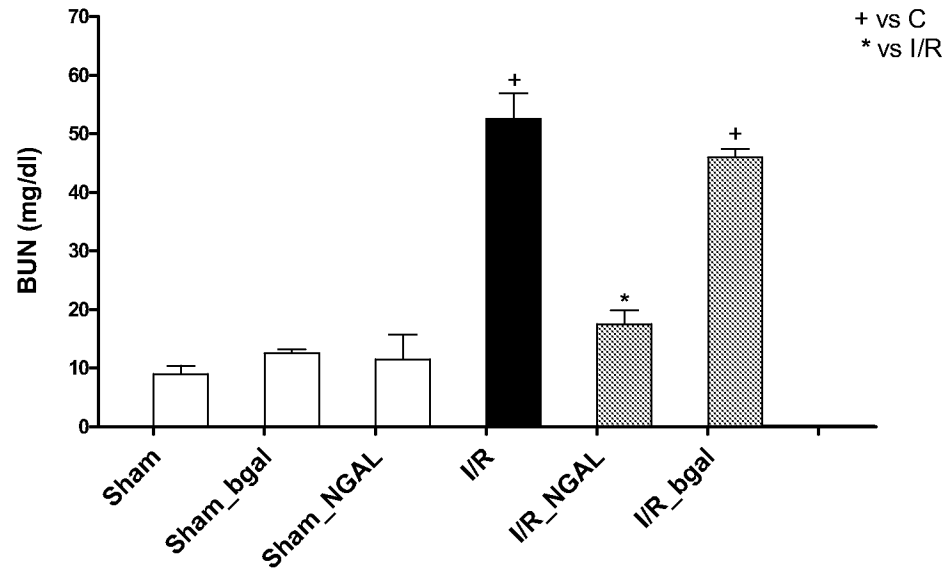
- 20 a. un promotor que dirija la transcripción de dicho polinucleótido,
 b. una señal de inicio de la transcripción,
 c. una señal de terminación de la transcripción,
 d. una señal de poliadenilación, o
 e. un activador transcripcional.

25 22. Método de obtención de la célula del SMF modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21 donde la transfección del ácido nucleico del paso (b) se realiza empleando un vector adenoviral.

30 23. Método de obtención de la célula del SMF modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22 donde la célula del SFM aislada en el paso (a) es un monocito o un macrófago.

FIG.1

A.



B.

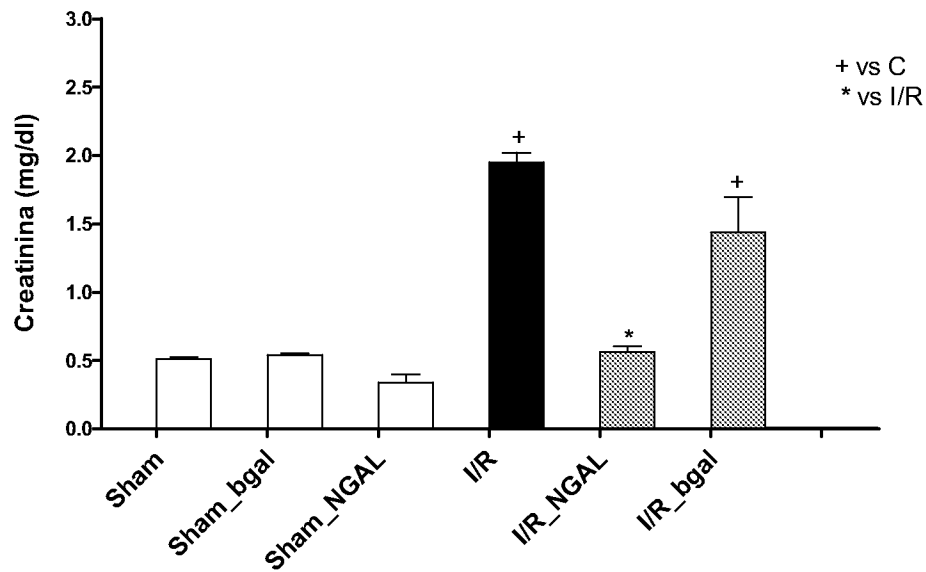


FIG.1

C.

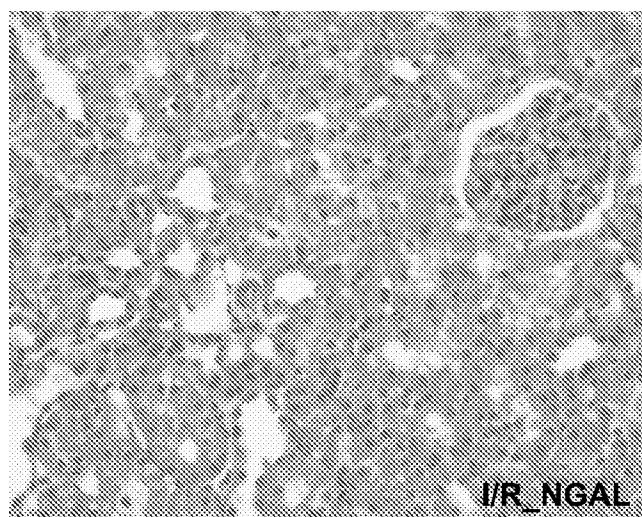
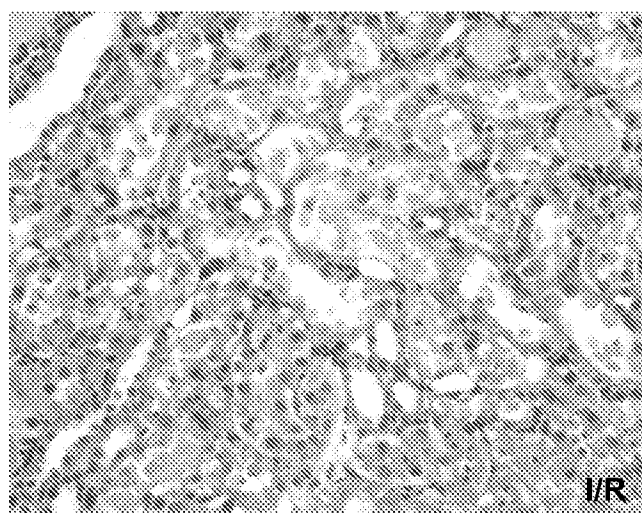
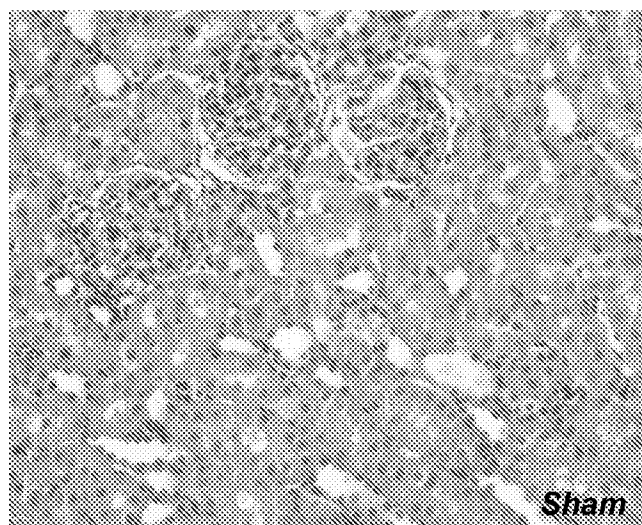
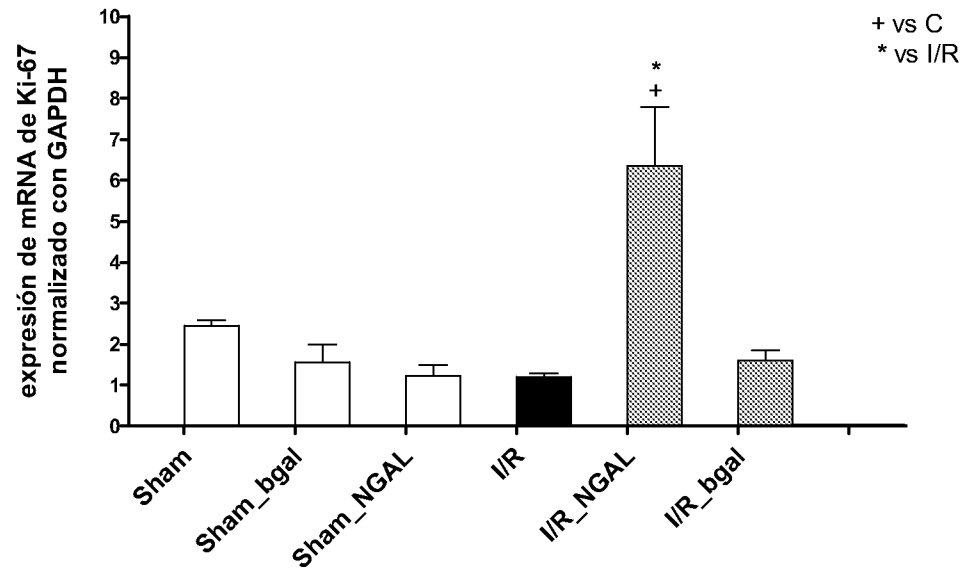


FIG.2

A.



B.

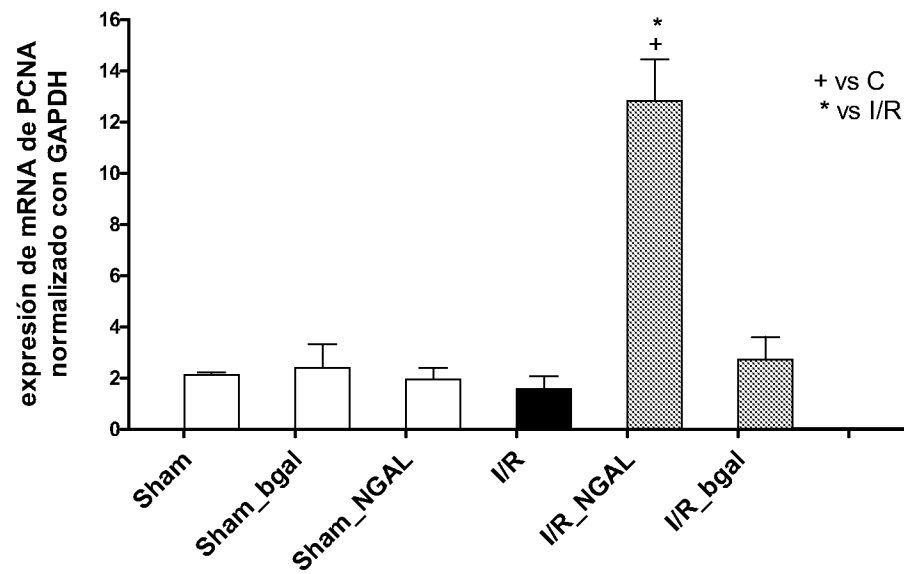


FIG.2
C.

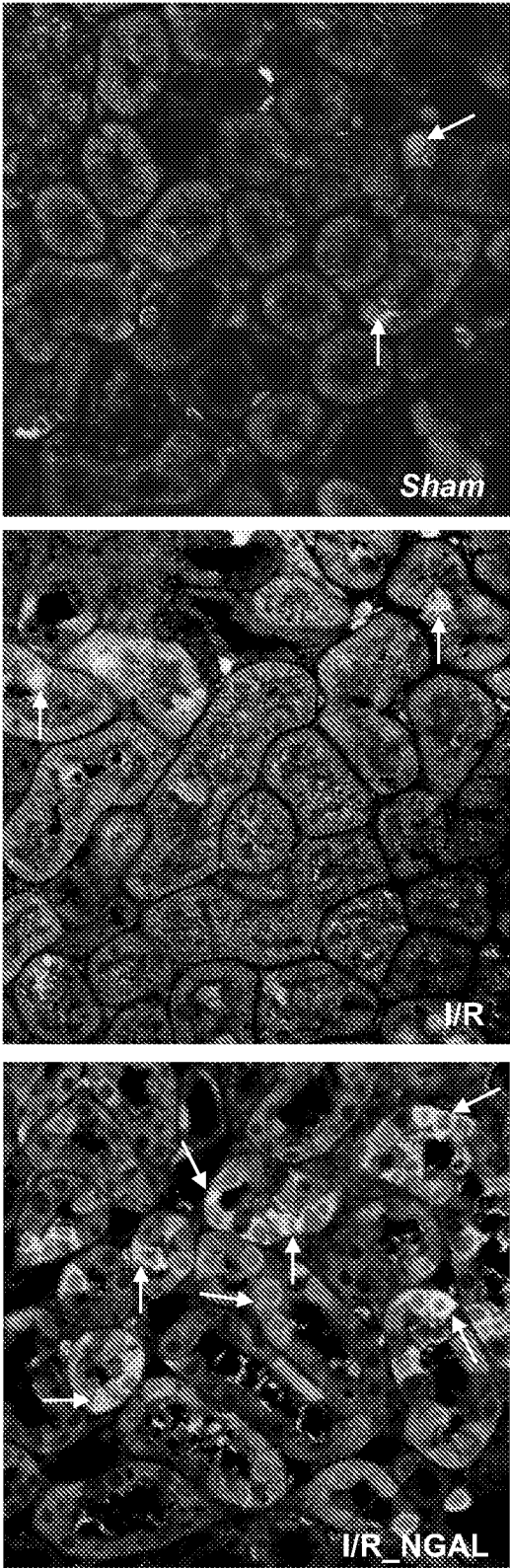
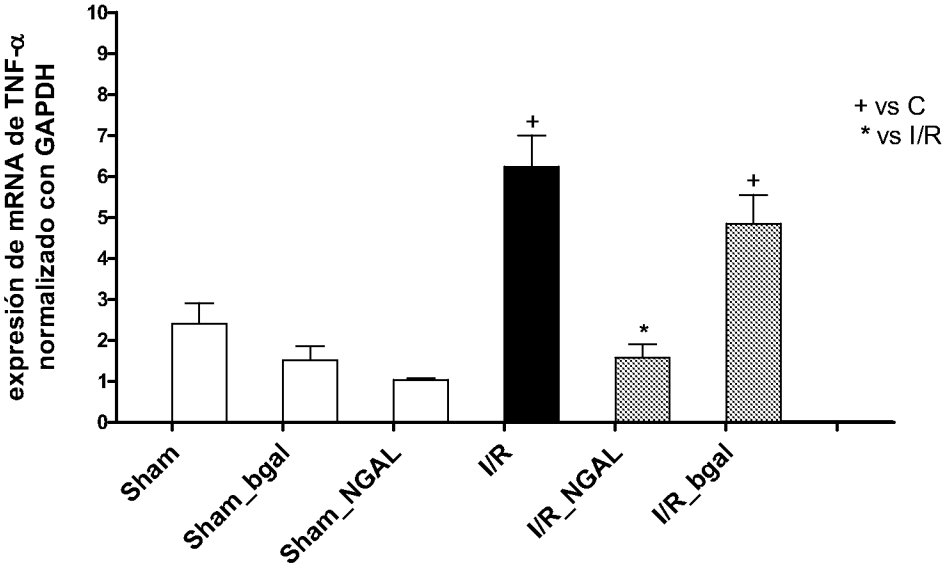


FIG.3

A.



B.

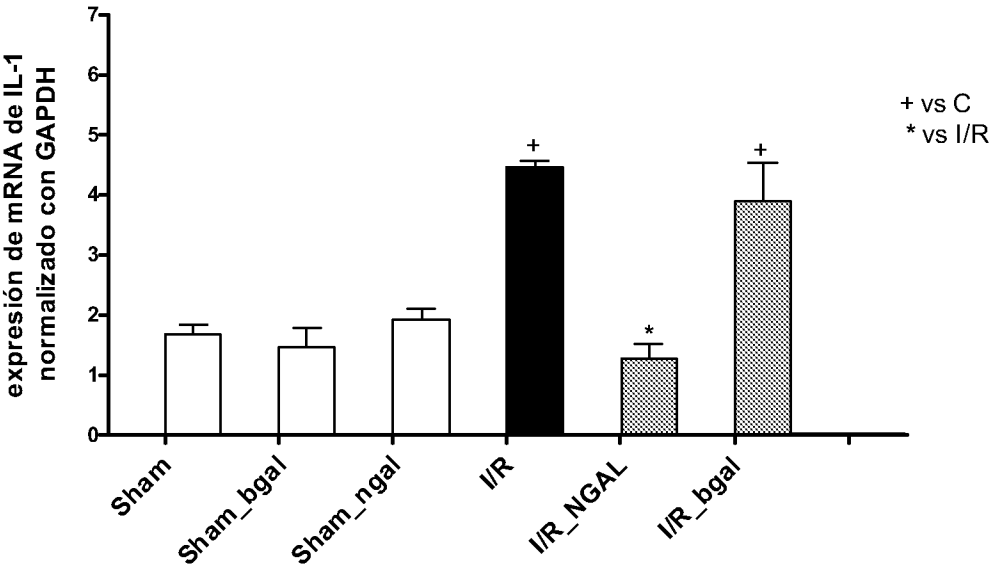
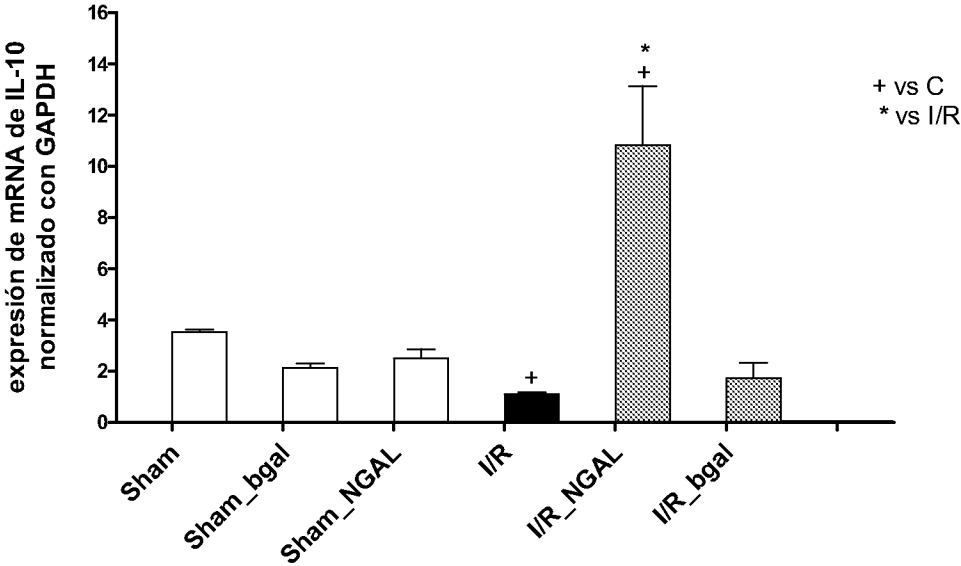
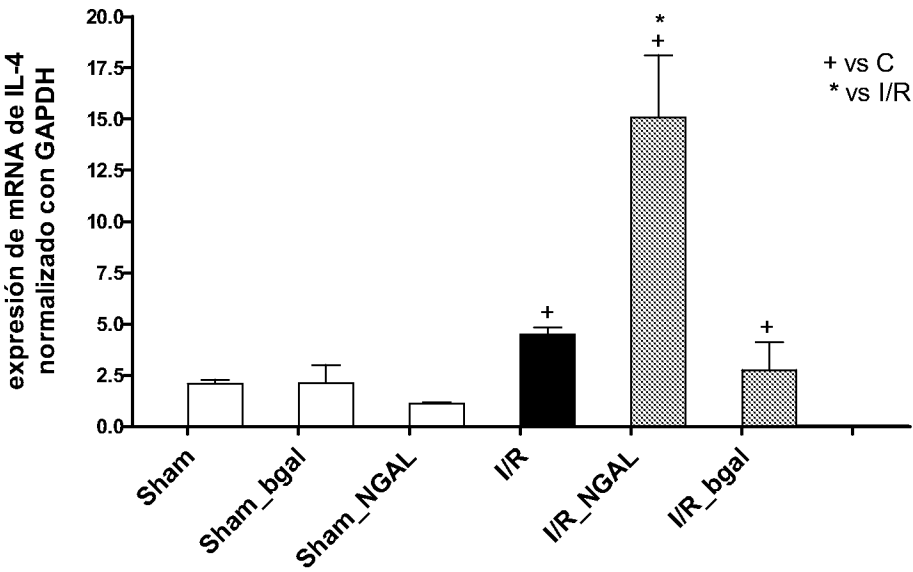


FIG.3

C.



D.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2010/070334

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, A61P

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

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

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, EBI (UniProt, Euro Patents, Japan Patents, US Patents, PDB, EMBL All, EMBL human, EMBL Mouse).

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MISHRA, J., <i>et al.</i> Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. Journal of the American Society of Nephrology : JASN. December-2004. Vol. 15, n° 12, pages 3073-3082. ISSN 1046-6673. See the whole document.	1-23
Y	KLUTH, D.C., <i>et al.</i> Gene transfer into inflamed glomeruli using macrophages transfected with adenovirus. Gene therapy. February-2000. Vol. 7, n° 3, pages 263-270. ISSN 0969-7128. See abstract, results (first paragraph) and materials and methods.	1-23
Y	VINUESA, E., <i>et al.</i> Lipocalin-2-induced renal regeneration depends on cytokines. American journal of physiology. Renal Physiology. November-2008. Vol. 295, n° 5, pages F1554-F1562. ISSN 0363-6127. See abstract and results.	1-23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search

03.August.2010 (03.08.2010)

Date of mailing of the international search report

(11/08/2010)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

B. Pérez Esteban

Telephone No. +34 91 349 84 84

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2010/070334

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KITAMURA, M. Adoptive transfer of nuclear factor-kappaB-inactive macrophages to the glomerulus. Kidney international. February-2000. Vol. 57, n° 2, pages 709-716. ISSN 0085-2538. See abstract and methods (2° paragraph).	1-23
A	WO 2006066587 A1 (ANTIBODYSHOP A/S) 29.06.2006, See the whole document.	
A	ROUDKENAR, M.H., <i>et al.</i> Neutrophil gelatinase-associated lipocalin acts as a protective factor against H(2)O(2) toxicity. Archives of medical research. August-2008. Vol. 39, n° 6, pages 560-566. ISSN 0188-4409. See the whole document.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2010/070334

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006066587 A	29.06.2006	CA 2591113 A AU 2005318689 A EP 1831699 AB KR 20070108158 A CN 101163971 A JP 2008524610 T NZ 555926 A US 2009170143 A AT 448484 T EP 2128625 A EP 20090154624 DK 1831699 T SI 1831699 T ES 2336345 T	29.06.2006 29.06.2006 12.09.2007 08.11.2007 16.04.2008 10.07.2008 28.11.2008 02.07.2009 15.11.2009 02.12.2009 20.12.2005 15.03.2010 31.03.2010 12.04.2010
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2010/070334

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 5/0786 (2010.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ ES 2010/070334

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

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

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61P

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

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, EBI (UniProt, Euro Patents, Japan Patents, US Patents, PDB, EMBL All, EMBL human, EMBL Mouse).

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
Y	MISHRA, J., <i>et al.</i> Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. Journal of the American Society of Nephrology : JASN. Diciembre-2004. Vol. 15, n° 12, páginas 3073-3082. ISSN 1046-6673. Ver todo el documento.	1-23
Y	KLUTH, D.C., <i>et al.</i> Gene transfer into inflamed glomeruli using macrophages transfected with adenovirus. Gene therapy. Febrero-2000. Vol. 7, n° 3, páginas 263-270. ISSN 0969-7128. Ver resumen, resultados (primer párrafo) y materiales y métodos.	1-23
Y	VINUESA, E., <i>et al.</i> Lipocalin-2-induced renal regeneration depends on cytokines. American journal of physiology. Renal Physiology. Noviembre-2008. Vol. 295, n° 5, páginas F1554-F1562. ISSN 0363-6127. Ver resumen y resultados.	1-23

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

03.Agosto.2010 (03.08.2010)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

11-AGOSTO-2010 (11/08/2010)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

B. Pérez Esteban

N° de teléfono +34 91 349 84 84

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2010/070334

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
Y	KITAMURA, M. Adoptive transfer of nuclear factor-kappaB-inactive macrophages to the glomerulus. <i>Kidney international</i> . Febrero-2000. Vol. 57, n° 2, páginas 709-716. ISSN 0085-2538. Ver resumen y métodos (2° epígrafe).	1-23
A	WO 2006066587 A1 (ANTIBODYSHOP A/S) 29.06.2006, Ver todo el documento.	
A	ROUDKENAR, M.H., <i>et al.</i> Neutrophil gelatinase-associated lipocalin acts as a protective factor against H(2)O(2) toxicity. <i>Archives of medical research</i> . Agosto-2008. Vol. 39, n° 6, páginas 560-566. ISSN 0188-4409. Ver todo el documento.	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2010/070334

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 2006066587 A	29.06.2006	CA 2591113 A	29.06.2006
		AU 2005318689 A	29.06.2006
		EP 1831699 AB	12.09.2007
		KR 20070108158 A	08.11.2007
		CN 101163971 A	16.04.2008
		JP 2008524610 T	10.07.2008
		NZ 555926 A	28.11.2008
		US 2009170143 A	02.07.2009
		AT 448484 T	15.11.2009
		EP 2128625 A	02.12.2009
		EP 20090154624	20.12.2005
		DK 1831699 T	15.03.2010
SI 1831699 T	31.03.2010		
ES 2336345 T	12.04.2010		

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 5/0786 (2010.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)