



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 353 665**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03728251 .4**

96 Fecha de presentación : **17.03.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1487274**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.2004**

54

Título: **Ingeniería tisular.**

30

Prioridad: **15.03.2002 US 364087 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.03.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.03.2011

73

Titular/es: **Duke University**
Office of Science and Technology
P.O. Box 90083
Durham, North Carolina 27708-0083, US

72

Inventor/es: **McKee, J., Andrew;**
Niklason, Laura, E. y
Counter, Christopher, M.

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 353 665 T3

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

INGENIERÍA TISULAR

DESCRIPCIÓN

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere, en general, a la ingeniería tisular y, en particular, a un método para prolongar el periodo de vida de células adecuado para su uso en ingeniería vascular.

ANTECEDENTES

10 En los Estados Unidos, 1,4 millones de pacientes al año se someten a operaciones que requieren prótesis arteriales (Langer et al, Science 260: 920-926 (1993)). Aproximadamente 100.000 pacientes al año requieren un bypass vascular en arterias de pequeño calibre, pero no tienen ninguna arteria o vena autóloga utilizable para injertos (Niklason, Science 286: 1493-1494 (1999)). Por lo tanto, existe una acuciante necesidad de vasos autólogos para tratar la

15 enfermedad aterosclerótica (Lefkowitz et al, Journal of American Medical Association 285: 581-587 (2001)). Las arterias se han obtenido con éxito mediante ingeniería a partir de células de músculo liso (SMC) humanas neonatales (L'Heureux et al, FASEB J. 12: 47-56 (1998)), y de SMC porcinas y bovinas (Niklason et al, Science 284: 489-493 (1999), Niklason et al, Journal of

20 Vascular Surgery 33: 628-638 (2001)). Sin embargo, estos enfoques aún no se han trasladado al desarrollo de arterias humanas adecuadas para uso clínico.

 La incapacidad de las SMC no neonatales de formar arterias *in vitro* puede deberse a su periodo de vida finito en cultivo. Específicamente, el cultivo arterial *in vitro* requiere de 45 a 60 duplicaciones de la población (PD) de SMC

25 para producir una arteria mecánicamente robusta, mientras que la formación de la monocapa endotelial requiere muchas menos duplicaciones celulares (L'Heureux et al, FASEB J. 12: 47-56 (1998), Niklason et al, Science 284: 489-493 (1999), Niklason et al, Journal of Vascular Surgery 33: 628-638 (2000)). Sin embargo, las SMC humanas no neonatales proliferan *in vitro* durante

30 solamente de 15 a 30 PD antes de la detención terminal del desarrollo en un estado denominado senescencia (Bierman, In Vitro 14: 951-955 (1978), Bonin et al, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 19: 575-587 (1999)). Por lo tanto, el limitado periodo de vida de las SMC humanas representa un obstáculo fundamental al cultivo de vasos sanguíneos autólogos.

35 Recientemente, se han desarrollado muchos enfoques genéticos para

prolongar el periodo de vida de las células somáticas humanas. Por ejemplo, en varias células somáticas humanas normales, la expresión del gen hTERT (Nakamura et al, Cell 92: 587-590 (1998)) (siendo hTERT la subunidad proteica catalítica de transcriptasa inversa de la telomerasa humana) ha demostrado reactivar la telomerasa, la enzima que alarga los telómeros que recubren los extremos del cromosoma (Sedivy, Proceedings of the National Academy of Sciences EE. UU. 95: 9078-9081 (1998)). El periodo de vida celular se prolongó sin inducción de un fenotipo canceroso (Jiang et al, Nature Genetics 21: 111-114 (1999), Morales et al, Nature Genetics 21: 115-118 (1999)), Yang et al, Journal of Biological Chemistry 274: 26141-26148 (1999)).

La presente invención es el resultado de estudios que demuestran que la expresión de genes que prolongan el periodo de vida en células humanas no neonatales (es decir, SMC) prolonga la capacidad de proliferación de estas células. Los enfoques que utilizan la prolongación del periodo de vida hacen posible el cultivo de arterias robustas a partir de células humanas *in vitro*.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a ingeniería tisular. Más específicamente, la invención se refiere a un método para prolongar el periodo de vida de células y al uso de dichas células en la producción de injertos vasculares.

Los objetos y ventajas de la presente invención quedarán claros a partir de la siguiente descripción.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Figuras 1A-1C. La Telomerasa en SMC aumenta el periodo de vida y prolonga los telómeros. Figura 1A. Ensayo TRAP, SMC con hTERT (hT) fueron positivas para actividad telomerasa, según se indicaba mediante productos en forma de escala de 6 pb, mientras que las SMC normales (n) y las SMC vectoriales (v) fueron negativas. Las células HEK que expresaban hTERT (Armbruster et al, Molecular and Cellular Biology 21: 7775-7786 (2001)) sirvieron como control positivo (CTL). HI, controles inactivados por calor; asterisco, control interno de PCR. Figura 1B. Las SMC normales (n) y vectoriales (v) sufrían senescencia a 37 PD, mientras que las SMC con hTERT (hT) crecían hasta al menos 100 PD. Se conserva el tiempo de duplicación de la población. Figura 1C. La hibridación de Southern demuestra la erosión del telómero de SMC

normales y vectoriales, mientras que los telómeros de SMC con hTERT se prolongan durante al menos 80 PD.

Figuras 2A-2D. Las SMC con hTERT (hT) muestran un fenotipo normal, no transformado en comparación con SMC normales (n) y SMC vectoriales (v). Transferencias de Western para la Figura 2A, cadenas pesadas de calponina y miosina de músculo liso (marcadores de diferenciación) y tropoelastina (proteína de la matriz extracelular); Figura 2B, pRb; SC, subconfluente; C, confluyente; Figura 2C, p53; +, células tratadas con irradiación; y Figura 2D, la proteína c-myc.

Figuras 3A-3F. Arterias humanas de ingeniería tisular representativas, 3 mm de diámetro interno. Tinción con hematoxilina y eosina de vasos sanguíneos de SMC normales (Figura 3A) y SMC con hTERT (Figura 3B). La tinción TUNEL de los vasos de SMC normales muestra una muerte celular muy extendida (Figura 3C) en contraste con los vasos de SMC con hTERT (Figura 3D); los núcleos oscuros son positivos. Figura 3E; la inmunotinción vWF revela una monocapa confluyente de HUVEC en la luz (asterisco) de una arteria de SMC con hTERT. Figura 3F; Las transferencias de Western de arterias de SMC con hTERT (n=4) muestran la expresión de marcadores de SMC normales, similar a los vasos obtenidos de SMC normal (n=4). Escala: 0,5 mm en 1A, 1B; 100 µm en 1C-1E.

Figura 4. Curvas de crecimiento de SMC obtenidas de donantes de 82 años de edad. Las SMC obtenidas de la vena safena muestran un periodo de vida prolongado después de la infección con hTERT. Las poblaciones de control y vectorial dejan de replicarse ambas a las 40 PD.

Figura 5. Vaso humano de SMC de 82 años de edad. Resistencia a la rotura < 25 mm de Hg.

Figuras 6A-6D. Vaso obtenido mediante ingeniería tisular, células vasculares ancianas. Figura 6A. Vaso obtenido mediante ingeniería tisular usando SMC vasculares de control y EC de un donante de 47 años de edad. Figura 6B. Vaso cultivado en condiciones idénticas, usando células de un donante de 47 años de edad que expresan hTERT. Figura 6C. Vaso cultivado de un donante de 67 años de edad. Figura 6D. Vaso cultivado de células de un donante de 67 años de edad, que expresan hTERT.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método de producción de injertos vasculares. El método comprende introducir en las células un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto proteico que prolonga el periodo de vida y/o inmortalizador que tiene actividad catalítica de telomerasa, en condiciones tales que la secuencia se exprese y el producto proteico se produzca. Estas células pueden emplearse a continuación en el diseño de injertos vasculares.

Las células para su uso en este método son células constituyentes que comprenden células de músculo liso. Las células adecuadas para su uso en la invención pueden comprender además células epiteliales (de las cuales las células endoteliales (EC) son un subconjunto), fibroblastos, pericitos, cardiomiocitos y células del sistema nervioso. Las células pueden ser células vasculares completamente diferenciadas aisladas de un individuo. Como alternativa, las células pueden obtenerse de células madre o células progenitoras que se cultivan en condiciones tales que se diferencian en células vasculares. Las células para su uso en un método de la invención son células humanas. Ventajosamente, las células son células humanas obtenidas del receptor del injerto. Típicamente, las células son SMC no neonatales obtenidas de un individuo de cualquier edad.

Las células pueden recogerse de un paciente de una biopsia de una rama arterial o venosa periférica. La biopsia puede realizarse en cualquier punto del cuerpo del paciente que permita acceso a la vasculatura periférica; la parte superior del brazo y la parte inferior de la pierna son dos ejemplos. La técnica quirúrgica usada puede ser la descrita para la biopsia de la arteria temporal (Albertini et al, Dermatologic Surgery 25: 501-508 (1999)). Puede usarse ultrasonido Doppler u otro medio para formar imágenes de la vasculatura (tal como angiografía por sustracción digital) para ubicar el segmento de vaso periférico de interés. Bajo anestesia local, la piel, la grasa cutánea, y otras fascias pueden diseccionarse para dejar al descubierto al vaso sanguíneo. El segmento del vaso puede cerrarse por sutura en ambos lados, y a continuación cortarse (Albertini et al, Dermatologic Surgery 25: 501-508 (1999)). Como se ha descrito (Ross, Journal of Cellular Biology 50: 172-186 (1971), (Niklason et al, Science 284: 489-493 (1999), Niklason et al, Journal of Vascular Surgery 33: 628-638 (2001)), el vaso puede procesarse a

continuación para el aislamiento de EC vasculares, SMC y cualquier otro tipo de células vasculares, si fuera necesario, tales como fibroblastos adventicios.

En el caso de las EC, el vaso sanguíneo puede cortarse axialmente a través de una pared (en condiciones estériles en una placa de cultivo tisular),
5 dejando expuesta la luz interna. Esta luz recubierta de EC puede rasparse ligeramente para obtener EC que pueden usarse a continuación para establecer cultivos de EC en matraces estériles. Cuando se buscan SMC, la luz y la íntima pueden retirarse raspando, y la capa media expuesta se invierte boca abajo. Si está presente, una capa externa adventicia (que contiene
10 fibroblastos) puede retirarse. Con la adición de medio de cultivo de SMC, las SMC pueden migrar desde la pared del vaso sanguíneo a la superficie de cultivo tisular. Después de 7 días, el tejido del vaso puede retirarse del cultivo, dejando solamente SMC vasculares. De esta manera, pueden establecerse cultivos de EC y SMC de un donante humano para su uso en la invención.

15 Un ejemplo de un medio de cultivo de EC incluye, aunque sin limitación, EGM-2 (BioWhittaker, Walkersville, MD) que carece de alícuotas suplementarias de ácido ascórbico e hidrocortisona, pero suplementado con $150 \mu\text{g ml}^{-1}$ de heparina. Un ejemplo de medio de cultivo de SMC incluye, aunque sin limitación, medio SMGM-2 (BioWhittaker) suplementado con suero
20 fetal bovino al 10-20%, prolina, glicina y ácido ascórbico a $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ y alanina a $20 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Las células madre y progenitoras, también adecuadas para su uso en la invención, pueden aislarse de una biopsia tisular y las células clasificarse (por ejemplo, mediante técnicas de citometría de flujo/fluorescencia), en caso
25 necesario, y a continuación dirigirse a linajes vasculares mediante condiciones de cultivo específicas incluyendo, aunque sin limitación, suplementos del medio (factores de crecimiento, vitaminas), sustratos de crecimiento, entorno de tensión-estrés mecánico, medio acondicionado mediante otros cultivos celulares, y/o co-cultivo con otros tipos de células. Un ejemplo reciente de este
30 enfoque implica purificar células ECadherin⁻/flkl⁺ a partir de células madre embrionarias humanas, ECadherin⁺ indiferenciadas, y a continuación dirigir estas progenitoras a linajes de células vasculares (Yamashita et al, Nature 408: 92-96 (2000)). Además, las células progenitoras endoteliales pueden aislarse de la sangre circulante de un receptor de injerto, y mantenerse como
35 progenitoras o dirigirse a un linaje de células endoteliales mediante las

condiciones de cultivo (Asahara et al, Science 275: 964-967 (1997)).

Pueden emplearse muchas secuencias codificantes para prolongar el periodo de vida y/o immortalizar células humanas normales. Los ejemplos de secuencias codificantes incluyen material genético de tipo silvestre o alterado otorgado por virus incluyendo, aunque sin limitación, virus de simio 40 (que codifica un antígeno T grande y otros productos), virus del papiloma humano (que codifica las proteínas E6 y E7 y otros productos), adenovirus (que codifica la proteína E1A y otros productos), y virus Epstein-Barr. Las secuencias codificantes adecuadas para su uso en la invención también incluyen genes celulares normales que muestran transcripción y/o función alterada, tales como *myc*, *c-jun*, *c-ras*, *v-src*, *Mdm2*, el gen que codifica p53, y el gen que codifica p21 (Katakura et al, Methods in Cell Biology, Mather JP, ed, 57: 69-91 (1998), Sedivy, Proceedings of the National Academy of Sciences EE. UU. 95: 9078-9081 (1998)). Las secuencias codificantes adecuadas para su uso en la presente invención incluyen además secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína que tiene actividad catalítica de telomerasa. Ventajosamente, la secuencia de ácido nucleico codifica la subunidad proteica catalítica de transcriptasa inversa de telomerasa humana (hTERT) (Número de entrada de ADN del GENBANK; AH007699; Número de entrada de proteína del GENBANK; BAA74724), o una parte o variante funcional de la misma. Los ejemplos de dichas partes/variantes se dan en las Patentes de Estados Unidos N° 5.770.422, 5.917.025, 6.093.809, 6.166.178, 6.261.836, 5.309.867 y 6.337.200. Cualquiera de las anteriores secuencias de ácido nucleico puede prepararse químicamente o de forma recombinante usando técnicas convencionales.

Las secuencias codificantes de la invención pueden prolongar el periodo de vida de las células en las que se introducen sin inducir un fenotipo tumorigénico (según se define mediante inestabilidad genómica, crecimiento celular en ausencia de mitógenos, falta de inhibición por contacto y/o crecimiento independiente del anclaje). Estas células se vuelven constituyentes de injertos celulares.

Pruebas recientes han demostrado la utilidad de las anteriores secuencias en la prolongación del periodo de vida y/o la immortalización de células vasculares humanas. Para immortalizar o prolongar el periodo de vida de EC, los informes han descrito el uso con éxito de telomerasa (Yang et al,

Journal of Biological Chemistry 271: 26141-26148 (1999)), virus de simio 40 (Ades et al, Journal of Investigative Dermatology 99: 683-690 (1992)), virus del papiloma humano (Rhim et al, Carcinogenesis 19: 673-681 (1998)), sobreexpresión de E2F (Spyridopoulos et al, Circulation 98: 2883-2890 (1998)), y Bcl-2 (Schechner et al, Proceedings of the National Academy of Sciences EE. UU. 97: 9191-9196 (2000)). Los enfoques descritos para prolongar el periodo de vida o inmortalizar SMC han descrito el uso de virus del papiloma humano (Perez-Reyes et al, Proceedings of the National Academy of Sciences EE. UU. 89: 1224-1228 (1992), Bonin et al, Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 19: 575-587 (1999)) y virus de simio 40 (en SMC bovinas) (Westerman et al, Proceedings of the National Academy of Sciences EE. UU. 93: 8971-8976 (1996)).

Una o más secuencias codificantes de la invención (por ejemplo, una secuencia codificante de hTERT) pueden estar presentes en una construcción de expresión, ventajosamente en unión operativa con un promotor. La construcción también puede incluir uno o más genes resistentes a un fármaco (por ejemplo, higromicina). El gen resistente a un fármaco puede estar unido de forma operativa al mismo promotor que promueve la expresión de la secuencia que prolonga el periodo de vida. Se prefieren promotores con alta tasa de transcripción, tales como cualquier promotor viral (por ejemplo, SV40) o un promotor inducible por tetraciclina (véase a continuación). Además, las construcciones de la invención pueden incorporar sitios de enzima de restricción para corte y empalme de genes, genes de resistencia a un fármaco bacteriano (tales como para resistencia a ampicilina), por ejemplo, para facilitar la preparación a gran escala de la construcción en bacterias, y otras secuencias (por ejemplo, repeticiones terminales largas en (LTR) 3' y 5', y secuencias de empaquetamiento de ψ) que facilitan la compatibilidad de la construcción con líneas celulares de empaquetamiento de vector viral apropiadas (si fuera aplicable). Dichas construcciones pueden diseñarse mediante técnicas de ácido nucleico convencionales y/o obtenerse en el mercado. Los ejemplos incluyen los vectores pFB y pFB-neo, compatibles con líneas celulares de empaquetamiento del virus de leucemia murina de Moloney (Stratagene, La Jolla, CA).

Las construcciones de la invención pueden incorporar además material genético cadena arriba que hace que la transcripción de material genético

cadena abajo (tal como una de las secuencias que prolongan el periodo de vida descritas anteriormente) sea reprimible, inducible, o escindible. Como ejemplo de construcciones de transducción reprimible, puede usarse el sistema transactivador controlado por tetraciclina (tTA) cadena arriba de, por ejemplo, el gen hTERT, proporcionando transcripción de hTERT solamente en ausencia de tetraciclinas (Baron et al, Nucleic Acids Research 25: 2723-2729 (1997)). Como ejemplo de un sistema inducible, puede usarse el sistema de tTA inverso (rtTA), proporcionando transcripción de, por ejemplo, hTERT solamente cuando una tetraciclina está presente (Gossen et al, Science 268: 1766-1769 (1995)).

Además, estos promotores pueden modificarse, dando como resultado un aumento o disminución de la fuerza de transcripción en aproximadamente 4 órdenes de magnitud en cualquier dirección (Baron et al, Nucl. Acids Res. 25: 2723 (1997); Grossen et al, Science 268: 1766 (1995)). En el caso de una construcción escindible, puede usarse un enfoque tal como el sistema Cre-Lox para permitir la expresión de la construcción hasta que se añade recombinasa Cre para retirar este material genético de los genomas celulares (Westerman et al, Proceedings of the National Academy of Sciences EE. UU. 93: 8971-8976 (1996)). Una construcción escindible que contiene material genético que prolonga el periodo de vida (que codifica para el antígeno T grande del virus de simio 40) ha demostrado inmortalizar de forma reversible SMC vasculares bovinas (Westerman et al, Proceedings of the National Academy of Sciences EE. UU. 93: 8971-8976 (1996)).

Las construcciones de expresión de la invención pueden introducirse en SMC, EC, o cualquier otro tipo de célula, para proporcionar células constituyentes de tejido vascular (por ejemplo, arteria, vena, arteriola, vénula o capilar), usando cualquiera de diversos enfoques, que pueden variar con la naturaleza de la construcción empleada.

Un enfoque es utilizar vectores virales para introducir construcciones, como se ha descrito anteriormente. Pueden diseñarse numerosos vectores virales que carecen de genes que normalmente posibilitan la replicación (tales como los genes gag y pol, para retrovirus), de modo que estos virus puedan infectar de forma estable a las células diana (conduciendo a la expresión de la construcción genética) pero no replicarse posteriormente. Estos vectores virales “incompetentes para la replicación” pueden producirse con alto rendimiento usando células de empaquetamiento, que alojan a los genes

necesarios para la replicación que faltan en los virus, permitiendo de este modo la producción a alto nivel de virus incompetentes para la replicación. Los vectores que pueden usarse incluyen, aunque sin limitación, vectores retrovirales, lentivirales, adeno-asociados, y adenovirales (Pasi, British Journal of Haematology 115: 744-757 (2001), Somia et al, Nature Reviews. Genetics 1: 91- 99 (2000)).

También pueden usarse métodos de suministro no viral. Dichos métodos para transducir construcciones genéticas en células incluyen, aunque sin limitación, el uso de construcciones encapsuladas en liposomas, construcciones encapsuladas en polímeros, transferencia mediada por receptor de dichas construcciones encapsuladas, construcciones complejadas con polímeros, construcciones incorporadas mediante electroporación, construcciones incorporadas mediante precipitación con fosfato cálcico, y construcciones desnudas (Templeton et al, Gene Therapy: therapeutic mechanisms and strategies, Nueva York (2000), Pasi, British Journal of Haematology 115: 744-757 (2001)).

Las células modificadas genéticamente mediante vectores que contienen construcciones, como se ha descrito anteriormente, pueden mantenerse en cultivo y seleccionarse, por ejemplo, para la presencia de resistencia a fármacos. Para determinar una concentración de fármaco suficiente para seleccionar cultivos para resistencia al fármaco, células normales pueden exponerse a diferentes concentraciones de fármacos, a continuación cultivarse, por ejemplo, durante al menos 2 semanas para determinar una “dosis letal” mínima, que evita concentraciones de fármaco innecesariamente altas.

Los vasos sanguíneos obtenidos mediante ingeniería pueden construirse mediante diversos métodos (por ejemplo, véase Niklason et al, Science 284: 489-493 (1999)) usando células constituyentes preparadas como se ha descrito anteriormente. Estos enfoques incluyen (1) sembrar células constituyentes en geles tubulares de colágeno desnaturalizado, (2) cultivar láminas de células constituyentes, y a continuación enrollar estas láminas de forma concéntrica en un tubo, y (3) cultivar células constituyentes en un armazón tubular sintético degradable en condiciones de estrés pulsátil. Dichas técnicas pueden extenderse a cultivos celulares en armazones biológicos de origen *in vivo* (por ejemplo, colágeno porcino fibrilar (no desnaturalizado)) u origen *in vitro* (por ejemplo, matriz extracelular de tejido vascular humano sometido a ingeniería

tisular descelularizado) (Niklason et al, Science 284: 489-493 (1999)).

Los vasos sanguíneos obtenidos mediante ingeniería tisular de acuerdo con la invención pueden usarse como injertos vasculares, y como tales, pueden implantarse usando técnicas quirúrgicas convencionales usadas actualmente en procedimientos tales como revascularizaciones coronarias y periféricas.

Algunos aspectos de la invención pueden describirse con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLO 1

Detalles experimentales

Células. SMC aórticas humanas aisladas de un varón de 2 años de edad (BioWhittaker) se recibieron en el pase 5 y la PD 6. Las células se propagaron en SMGM-2 (BioWhittaker) con suero fetal bovino al 10-20%, prolina, glicina y ácido ascórbico a $50 \mu\text{g ml}^{-1}$, y alanina a $20 \mu\text{g ml}^{-1}$. Las SMC se infectaron usando retrovirus anfotrópicos que contienen el plásmido pBABE-Hygro-hTERT (hTERT) o pBABE-Hygro (Vector) (Hahn et al, Nature 400: 464-468 (1999)). Las células infectadas se seleccionaron de forma continua a $60 \mu\text{g ml}^{-1}$ de higromicina. Las células renales embrionarias humanas (HEK) que expresaban hTERT se describieron anteriormente (Armbruster et al, Molecular and Cellular Biology 21: 7775-7786 (2001)). Se cultivaron HUVEC en EGM-2 (excluyendo hidrocortisona y ácido ascórbico; BioWhittaker) suplementado con FBS al 10% y $150 \mu\text{g ml}^{-1}$ de heparina (GIBCO-BRL). Las venas safenas excedentes (que en caso contrario se desechaban) se recogieron de pacientes que experimentaban procedimientos de revascularización.

Actividad telomerasa y visualización de telómeros. Como se ha descrito (Armbruster et al, Molecular and Cellular Biology 21: 7775-7786 (2001)), $1,0 \mu\text{g}$ de lisados se aislaron de SMC y se ensayó su actividad telomerasa, después de lo cual los productos de PCR radiomarcados resultantes se separaron en un gel de poliacrilamida al 12%, que a continuación se secó y se expuso a una pantalla de phosphorimager como se ha descrito (Kim et al, Nucleic Acids Research 25: 2595-2597 (1997)). Como controles de especificidad, lisados por duplicado se inactivaron por calor durante 2 minutos a 85°C . Para visualizar los fragmentos de restricción de telómeros, $1 \mu\text{g}$ de ADN genómico se digirió con *HinF1* y *RsaI*, y a continuación se resolvió en un gel de agarosa al 0,5%. El gel se secó durante 30 minutos a 64°C , se hibridó con una sonda marcada con ^{32}P (CCCTAA)₃ a 37°C durante una noche, se aclaró 3 veces en 15X SSC, y a

continuación se expuso a una pantalla de phosphorimager como se ha descrito (Counter et al, EMBO J. 11: 1921-1929 (1992)).

Cultivo y endotelización de vasos sanguíneos. Biorreactores de vasos sanguíneos, sistemas de flujo pulsátil, y mallas de PGA (3 mm de diámetro interno, 8 cm de longitud) se prepararon como se ha descrito (Niklason et al, Science 284: 489-493 (1999), Niklason et al, Journal of Vascular Surgery 33: 628-638 (2000)). Para cada vaso sanguíneo obtenido mediante ingeniería, se sembraron SMC en armazones de PGA tubulares (SMC normales: 11×10^6 células, pase 10 PD 20; SMC con hTERT: 8×10^6 células, pase 11, PD 32, o 9 PD después de la infección). Los biorreactores se llenaron con medio de cultivo y las mallas se pulsaron internamente mediante tubos de silicona (165 pulsos por minuto, 1% de distensión radial), con humidificación y CO₂ al 10% a 37°C. Los vasos de SMC con hTERT se cultivaron sin selección con higromicina, debido a que los experimentos preliminares mostraban que la higromicina inhibía parcialmente la síntesis de proteínas, a pesar de la presencia del gen de resistencia. Los vasos sanguíneos se endotelizaron retirando los tubos de silicona internos, inyectando $3,6 \times 10^6$ HUVEC en el pase 2, y dejando que las células se adhirieran durante 16 horas con rotación periódica.

Ensayos mecánicos y cálculos. La mecánica de los vasos se cuantificó usando un ensayo de estiramiento circunferencial, similar al descrito anteriormente (Seliktar et al, Annals of Biomedical Engineering 28: 351-362 (2000), Donovan et al, Journal of Vascular Surgery 12: 531-537 (1990)). Se insertaron dos alambres a través de la luz de un segmento de vaso, al que se aplicó una tensión en aumento. Se tomaron imágenes del vaso en distensión usando una videocámara digital de alta resolución con un tamaño de píxel de 10 μm (XL1, Canon), y el radio externo se cuantificó usando Adobe Photoshop y NIH Image. La tensión de la pared de la circunferencia se calculó a partir de $\sigma = F / (2l (r_e - r_i))$, donde σ es la tensión, l es la longitud del segmento del vaso, r_e es el radio externo, r_i es el radio interno, y F es la fuerza de estiramiento. El área de la pared (A) de cada imagen de sección transversal se usó para calcular r_i , a partir de $A = \pi (r_e^2 - r_i^2)$, y para calcular el grosor promedio de la pared. La resistencia a la rotura teórica (presión, P) se calculó a partir de la ecuación del vaso de presión de pared gruesa para tensión en circunferencia (Pagani et al, Circulation Research 44: 420-429 (1979)):

$$\sigma = P \frac{\left(r_i^2 + \frac{4(r_i r_e)^2}{(r_i + r_e)^2} \right)}{(r_e^2 - r_i^2)} \quad (1)$$

- Análisis de transferencia de Western.* Para transferencias de pRb, se sembraron cultivos celulares por duplicado a idéntica densidad, y a continuación se recogieron y se solubilizaron a los 3 días (subconfluente) o a los 7 días (confluente) (Jiang et al, Nature Genetics 21: 111-114 (1999), Morales et al, Nature Genetics 21: 115-118 (1999)). Para transferencias de p53, uno de dos cultivos subconfluentes por duplicado se sometió a irradiación a 6 Gy durante 1,2 minutos (Morales et al, Nature Genetics 21: 115-118 (1999)). Después de 4 horas, las células se solubilizaron para la transferencia.
- Las transferencias con lisados de sedimentos de células cultivadas y muestras de vasos se realizaron mediante técnicas convencionales usando anticuerpos primarios para β -actina, calponina, tropoelastina (Sigma), SM-MHC (Biomedical Technologies), pRb hiper-fosforilado (Cell Signaling Technology), p53 y c-myc (Santa Cruz) (Wang et al, Nature 405: 755-756 (2000)).
- Imunotinción. Muestras de vasos se fijaron en formalina, se deshidrataron, y se incluyeron en parafina. Se desparafinaron secciones de 5 μ m y a continuación se inmunotñeron para detectar la presencia de antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA; DAKO) (Niklason et al, Science 284: 489-493 (1999)), roturas en la cadena de ADN (Apoptag Apoptosis Detection Kit, Intergen), o factor de Von Willebrand (vWF; DAKO) según las instrucciones del fabricante.

Análisis de la densidad celular (ADN). Como se ha descrito (Niklason et al, Science 284: 489-493 (1999)), las muestras de vasos se pesaron y se liofilizaron para obtener pesos en húmedo y en seco, respectivamente. Las muestras se incubaron en papaína (1 ml; 0,7 μ g ml⁻¹) a 60°C durante una noche. 2 ml de colorante Hoechst (Polysciences) se añadieron a cada muestra, que a continuación se analizó en un espectrofluorímetro (excitación λ_{365} , emisión λ_{458}) calibrado para patrones de ADN de timo de ternero.

Análisis de colágeno. Como se ha descrito (Niklason et al, Science 284: 489-493 (1999)), las muestras digeridas con papaína (véase anteriormente) se incubaron en HCl 6 N a 115°C durante 18 h, se neutralizaron, se hicieron

reaccionar con p-dimetilaminobenzaldehído y cloramina-T, y a continuación se cuantificaron a λ_{555} . Se usó una proporción de peso de 1:10 de hidroxiprolina:colágeno. Para todas las comparaciones, se calculó un test t de Student usando Microsoft Excel.

5 Resultados

SMC normales aisladas de tejido aórtico de un niño donante se infectaron de forma estable con un vector retroviral de control o uno que codifica hTERT, después de lo cual se seleccionaron poblaciones policlonales para resistencia al marcador de higromicina del vector. La actividad telomerasa se restauró en los cultivos de SMC que expresan hTERT (SMC con hTERT), pero no en controles no infectados o vectoriales, dado que solamente el extracto de SMC con hTERT produjo productos en forma de escala sensibles al calor de 6 pb cuando se incuban con un cebador telomérico (Figura 1A).

La reactivación de la actividad telomerasa también detenía el acortamiento del telómero y prolongaba el periodo de vida de SMC con hTERT. Específicamente, el análisis de Southern mostraba que los fragmentos de restricción terminales que contienen el telómero de SMC no infectadas o de control se reducían con el tiempo, deteniéndose a una longitud de ~6 kpb, consecuente con la longitud de telómeros de otras células senescentes (Figura 1C) (Harley et al, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 59: 307-315 (1994)). Por consiguiente, estas células tenían un periodo de vida finito, alcanzando la senescencia a ~PD 37. Por el contrario, los telómeros de SMC con hTERT aumentaban con el tiempo. Las SMC con hTERT proliferaban durante 100 PD, más de dos veces el periodo de vida de los cultivos de SMC de control, y durante el tiempo suficiente para, teóricamente, generar una arteria *in vitro* (Figura 1B).

Las SMC con hTERT eran fenotípicamente indistinguibles de las SMC normales. Las SMC con hTERT conservaban una morfología de colina y valle normal y cuerpos celulares estriados más allá de las 100 PD, comparable con las SMC en pase temprano. Las SMC con hTERT de pase tardío también mostraban un fenotipo diferenciado similar a las SMC de control, conservando la expresión de proteínas características de SMC tales como calponina (marcador de diferenciación intermedia), cadenas pesadas de miosina de músculo liso (SM-MHC; marcado de diferenciación avanzada), y tropoelastina (proteína de la matriz extracelular) (Figura 2A). La telomerasa es activada en la

mayoría de las células cancerosas (Shay et al, European Journal of Cancer 33: 787-791 (1997)) y se sabe que la expresión forzada de hTERT en células humanas normales contribuye al proceso tumorigénico (Hahn et al, Nature 400: 464-468 (1999), Elenbaas et al, Genes & Development 15: 50-65 (2001), Rich et al, Cancer Research 61: 3556-3560 (2001)), aumentando la posibilidad de que la expresión de hTERT en SMC podría, teóricamente, predisponer a las células a un fenotipo transformado. Se determinó, por lo tanto, si las SMC con hTERT muestran fenotipos transformados. Las células normales desfosforilan la proteína de retinoblastoma (pRb) para impedir la entrada en la fase S, mientras que muchas células tumorales escapan a este bloqueo manteniendo a pRb hiperfosforilada de forma constitutiva (Lundberg et al, European Journal of Cancer 35: 531-539 (1999)). En las SMC con hTERT a altas densidades celulares, la pRb hiperfosforilada se regulaba negativamente, similar a SMC normales y vectoriales (Figura 2B). Las células normales también regulan positivamente la proteína p53 para detener la proliferación en respuesta al daño en el ADN, mientras que muchas células tumorales pierden esta respuesta (Lundberg et al, European Journal of Cancer 35: 531-539 (1999)). El daño al ADN por irradiación ultravioleta (UV) estimulaba la regulación positiva de p53 en SMC con hTERT similar a controles (Figura 2C). Estos resultados indican que las SMC con hTERT conservan reguladores del ciclo celular normal en respuesta a la inhibición por contacto y al daño al ADN, los cuales ambos son distintivos de un fenotipo no transformado. Finalmente, aunque recientemente se describió que c-myc se activaba en una única línea celular que expresa hTERT (Wang et al, Nature 405: 755-756 (2000)), las SMC con hTERT de pase tardío no mostraban expresión de la proteína c-myc alterada (Figura 2D). De este modo, mediante múltiples criterios las SMC con hTERT se comportan de forma idéntica a sus contrapartidas no infectadas y no muestran signos de transformación.

Para determinar el impacto de hTERT en la ingeniería tisular vascular humana, se cultivaron vasos sanguíneos usando un sistema biométrico como se ha descrito anteriormente (Niklason et al, Science 284: 489-493 (1999), Niklason et al, Journal of Vascular Surgery 33: 628-638 (2000)). Se sembraron SMC normales o con hTERT en un armazón tubular de ácido poliglicólico (PGA) degradable, y se cultivaron con presión pulsátil en biorreactores. Los vasos humanos se cultivaron a partir de SMC normales (n = 4) y SMC con

hTERT (n = 4). Después de 7 semanas, los vasos sanguíneos de SMC con hTERT se sembraron luminalmente con células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) durante 16 horas. La adhesión y el fenotipo de HUVEC se verificó mediante la presencia luminal de células positivas para Factor de Von Willebrand (vWF) (Figura 3E). Los vasos sanguíneos de SMC normales no se sembraron con HUVEC, dado que son extremadamente frágiles y no podían ser manipuladas.

El aspecto físico e histológico de los vasos de hTERT mejoraba dramáticamente en comparación con los vasos de SMC de control (Figuras 3A y 3B). El grosor de la pared de los vasos de hTERT era significativamente mayor que los controles ($P < 0,01$), y era similar al de la arteria nativa (Tabla 1). Los vasos de hTERT también tenían una mayor densidad celular y resistencias a la rotura significativamente mayores que los vasos de control (356 ± 64 mm de Hg para hTERT, frente a 59 ± 55 mm de Hg para los controles, $P < 0,0005$). Un mayor grosor de pared y mayor celularidad probablemente otorgaban una mayor resistencia a los vasos de hTERT, dado que los contenidos de colágeno de los vasos de hTERT y de control eran similares (Tabla 1). De este modo, la expresión de hTERT permitió el cultivo de arterias que eran arquitectónica y mecánicamente bastante superiores a las obtenidas de SMC de control.

Tabla 1 Características físicas de vasos sanguíneos humanos obtenidos mediante ingeniería tisular.

	Vasos humanos obtenidos mediante ingeniería:		Vena Safena humana
	SMC normales†	SMC hTERT†	
Grosor de la pared (μm)	181 $\pm$ 75	360 $\pm$ 76 (P < 0,01)	370 $\pm$ 100*
Densidad celular (10^6 célula/ml)	118 $\pm$ 26	135 $\pm$ 42	164 $\pm$ 62‡
Resistencia a la rotura (mm de Hg)	59 $\pm$ 55	356 $\pm$ 64 (P < 0,0005)	168 $\pm$ 307**
Colágeno (% en peso seco)	5,1 $\pm$ 2,2	7,4 $\pm$ 1,5	48 $\pm$ 3,2‡
Los valores son la media $\pm$ Desviación Estándar. Los valores P reflejan comparaciones entre vasos de SMC normales y con hTERT			
† n = 4.‡ n = 3 * Donovan et al, Journal of Vascular Surgery 12: 531-537 (1990)			
**L'Heureux et al, FASEB J. 12: 47-56 (1998).			

La apoptosis o necrosis de SMC en vasos obtenidos mediante ingeniería se evaluó mediante marcado del extremo libre por desoxinucleotidil transferasa dUTP terminal (TUNEL; Figuras 3C y 3D). Los vasos de SMC con hTERT tenían el 11 $\pm$ 3% de núcleos positivos, frente al 53 $\pm$ 22% de núcleos positivos para los controles (P < 0,05). Esto es consecuente con la capacidad de las SMC con hTERT para evitar la senescencia replicativa. La inmunotinción para detectar el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) mostraba que los vasos de SMC con hTERT tenían una menor proliferación celular que los vasos de SMC normales después de 7 semanas de cultivo (6,6 $\pm$ 2,9% frente a 27 $\pm$ 26% núcleos positivos; P no significativa). Un marcado de PCNA disminuido puede ser el resultado de la proliferación temprana de SMC con hTERT seguida de quiescencia mediada por contacto. Esto contrasta con vasos de control, en los que la muerte de SMC en curso puede haber estimulado la remodelación de las restantes células competentes para la replicación. El fenotipo de SMC con hTERT en vasos obtenidos mediante

ingeniería después de 7 semanas de cultivo se comparó con SMC de control (Figura 3F). Las SMC con hTERT y normales expresaban niveles similares de calponina, SM-MHC, y tropoelastina en tejidos obtenidos mediante ingeniería. Estos resultados indican que las SMC con hTERT conservan la viabilidad celular y el fenotipo diferenciado durante periodos de cultivo prolongados.

EJEMPLO 2

Para determinar la viabilidad de la expresión de hTERT en SMC vasculares obtenidas de donantes humanos ancianos, se obtuvieron segmentos de vena safena desechada del quirófano en el Duke University Medical Center. Se obtuvieron cultivos puros de SMC usando técnicas de explante convencionales de un donante de 53 años de edad y uno de 83 años de edad. Después de la infección el día 21 de cultivo, las poblaciones de SMC sub-cultivadas se mantuvieron como poblaciones de Control, Vectorial, y hTERT, y se realizó un seguimiento de la cinética de crecimiento durante 150 días (Figura 4). La prolongación del periodo de vida de SMC ancianas mediante hTERT era similar a la observada para SMC de 2 años de edad, lo que indicaba la viabilidad de este enfoque para células vasculares ancianas.

Los vasos se obtuvieron mediante ingeniería a partir de SMC de control de 82 años de edad en la PD 20, usando técnicas como se ha descrito en el Ejemplo 1. Los vasos resultantes (n = 2) eran extremadamente frágiles y se rompían a < 25 mm de Hg. La celularidad de los vasos era muy baja (Figura 5), similar a la observada en vasos obtenidos mediante ingeniería a partir de SMC de control de 2 años de edad. Se espera que la expresión de hTERT en células vasculares ancianas mejore significativamente las propiedades de vasos obtenidos mediante ingeniería a partir de células ancianas.

Los vasos obtenidos mediante ingeniería se cultivaron a partir de células vasculares ancianas, SMC y EC. Los vasos de control se obtuvieron mediante ingeniería como se ha descrito anteriormente, usando EC y SMC no infectadas. Vasos de hTERT emparejados se cultivaron como se ha descrito, sin selección por higromicina durante el cultivo como se ha descrito. Los ejemplos de vasos cultivados a partir de células de 47 años de edad y 67 años de edad se muestran en la Figura 6. Los vasos obtenidos mediante ingeniería cultivados a partir de células que expresan hTERT eran significativamente más resistentes, con una mayor celularidad y morfología tisular mejorada, en comparación con vasos de control. Estos resultados demuestran la viabilidad del cultivo de vasos

a partir de células que expresan hTERT. Estos resultados también demuestran las mejoras significativas otorgadas por la sobre-expresión de hTERT en células vasculares ancianas que se usan para ingeniería tisular.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de un injerto vascular que comprende:
 - 5 i) introducir en células constituyentes obtenidas de un ser humano, comprendiendo dichas células constituyentes células de músculo liso, una construcción que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto proteico que prolonga el periodo de vida o inmortalizante que tiene actividad catalítica de telomerasa, en condiciones tales que dicha secuencia de ácido nucleico se exprese y, de este modo, se produzca dicho producto proteico, y
 - 10 ii) modificar mediante ingeniería dichas células resultantes de la etapa (i) en dicho injerto vascular.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichas células
15 constituyentes comprenden además células seleccionadas entre el grupo constituido por células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos, pericitos, cardiomiocitos y células del sistema nervioso.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichas células
20 constituyentes comprenden además células endoteliales no neonatales.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de ácido nucleico es un gen celular de origen natural que muestra transcripción o función alterada.
25
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de ácido nucleico codifica una subunidad proteica catalítica de transcriptasa inversa de la telomerasa.
- 30 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicha transcriptasa inversa de la telomerasa es transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT).
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho producto
35 proteico no induce un fenotipo tumorigénico.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de ácido nucleico está presente en dicha construcción en unión operativa con un promotor funcional en dichas células constituyentes.
- 5 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho promotor es un promotor con alta tasa de transcripción.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho promotor es un promotor viral o un promotor inducible por tetraciclina.
- 10 11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha construcción es escindible.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicha construcción es escindible mediante recombinación específica de sitio.
- 15 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicha construcción es escindible mediante recombinasa Cre.
- 20 14. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha construcción se introduce en dichas células constituyentes de forma transitoria.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicha introducción transitoria se realiza usando un vector adenoviral.
- 25 16. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha etapa (ii) comprende sembrar células resultantes de la etapa (i) en un soporte tubular y cultivar dichas células de modo que se forme dicho injerto vascular.
- 30 17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicho soporte tubular es un gel de colágeno desnaturalizado, un armazón sintético degradable o no degradable, un armazón de colágeno fibrilar o un armazón de matriz extracelular.
- 35 18. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha etapa (ii)

comprende cultivar células resultantes de la etapa (i) de modo que se produzca una lámina celular y enrollar dicha lámina para formar dicho injerto vascular.

5 19. Un injerto vascular aislado que comprende células de músculo liso obtenidas de un ser humano y que comprende una molécula recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto proteico que prolonga el periodo de vida o inmortalizante que tiene actividad catalítica de telomerasa.

10 20. El injerto de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicho producto proteico es hTERT.

15 21. El injerto vascular de acuerdo con la reivindicación 19 ó 20, para su uso en un método de tratamiento de un paciente con enfermedad aterosclerótica que comprende sustituir una parte enferma o dañada de la vasculatura de dicho paciente con dicho injerto.

20 22. Uso de un injerto vascular de acuerdo con la reivindicación 19 ó 20, en la fabricación de un medicamento para tratar a un paciente con enfermedad aterosclerótica, en el que el medicamento es para sustituir una parte enferma o dañada de la vasculatura de dicho paciente.

25 23. El uso de acuerdo con la reivindicación 22, en el que dicha secuencia de ácido nucleico se escinde antes de dicha sustitución.

Fig. 1A

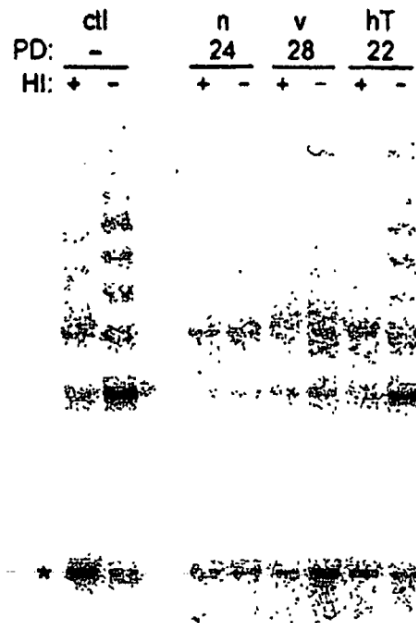


Fig. 1B

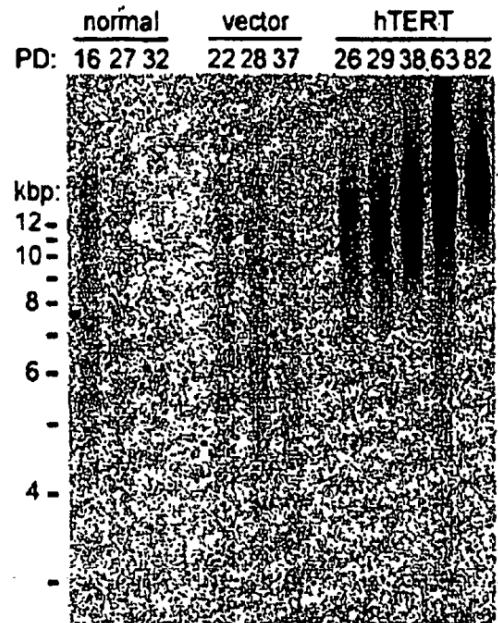


Fig. 1C

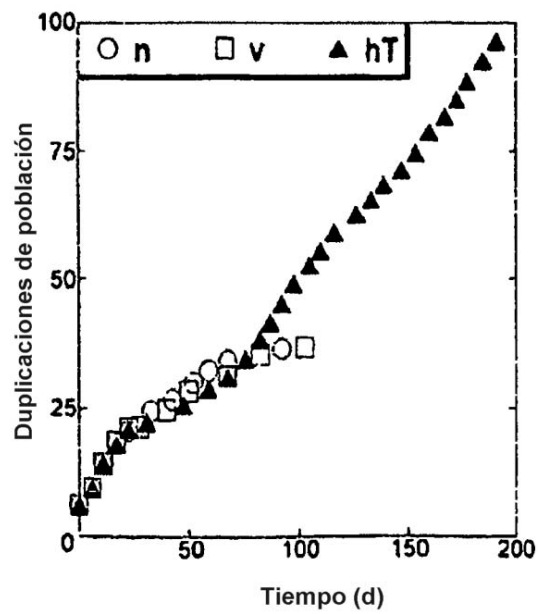


Fig. 2A

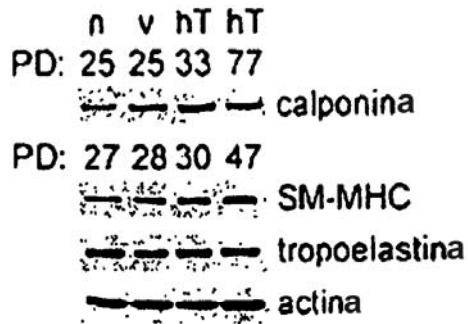


Fig. 2C



Fig. 2B

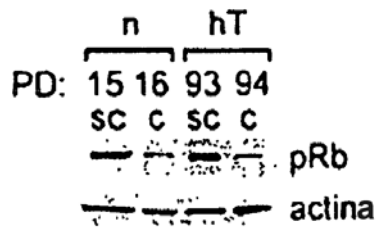


Fig. 2D

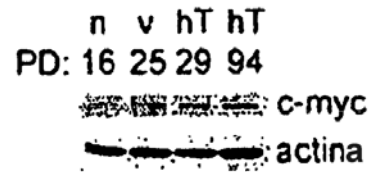


Fig. 3A

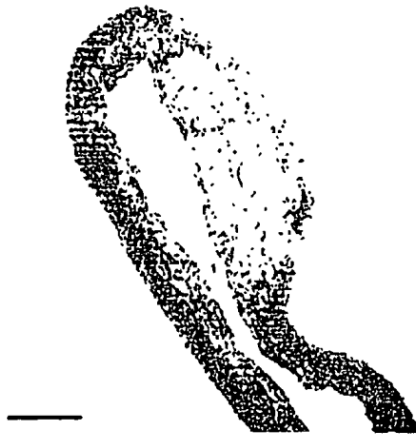


Fig. 3B



Fig. 3C



Fig. 3D



Fig. 3E



Fig. 3F

normal	hTERT	
		calponina
		SM-MHC
		tropoelastina

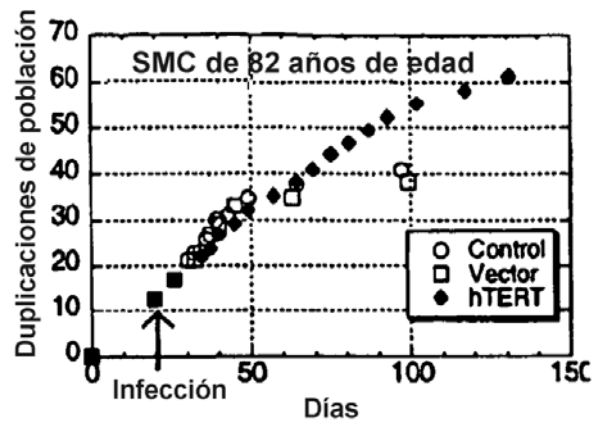


Fig. 4: Curvas de crecimiento de SMC obtenidas de un donante anciano. Las SMC obtenidas de una vena safena humana muestran un periodo de vida prolongado después de la infección con hTERT. Las poblaciones de control y vectorial dejan de replicarse ambas a las 40 PD.

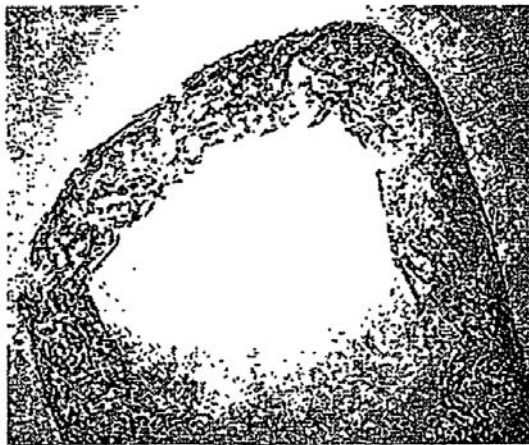


Fig. 5: Vasos humanos de SMC de 82 años de edad
Resistencia a la rotura < 25 mm de Hg.

Fig. 6A

Fig. 6B

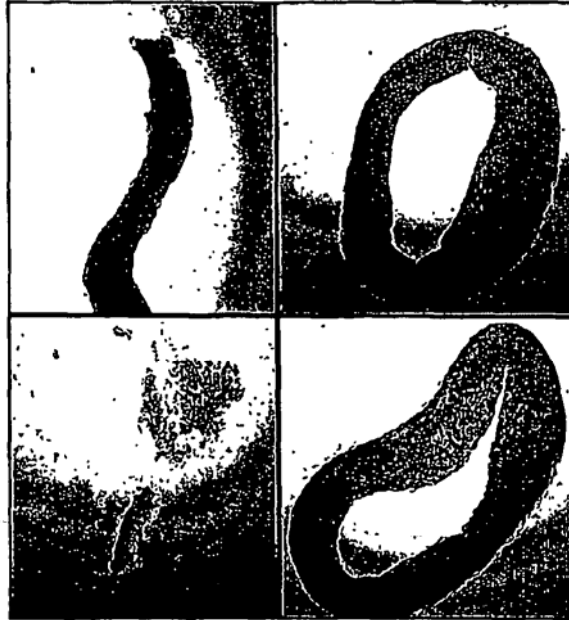


Fig. 6C

Fig. 6D