(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 266 715**

(51) Int. Cl.:
***A61K 35/28*** (2006.01)
***A61K 9/50*** (2006.01)
***C12N 5/10*** (2006.01)
***A61K 48/00*** (2006.01)
***A61P 5/06*** (2006.01)
***A61P 7/04*** (2006.01)
***A61P 3/04*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **03075115 .0**
(86) Fecha de presentación : **28.03.1996**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1304112**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **23.04.2003**

(54) Título: **Implantes que comprenden células estromales aisladas inmunológicamente y su utilización.**

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

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
**01.03.2007**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
**01.03.2007**

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

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

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

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).



Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

## DESCRIPCIÓN

Implantes que comprenden células estromales aisladas inmunológicamente y su utilización.

### Campo de la invención

La presente invención se refiere a implantes que comprenden células estromales aisladas, a receptáculos que comprenden células estromales aisladas transfectadas con ADN exógeno, a su utilización para tratamientos de individuos que sufren estados que pueden ser tratados por administración o suministro de proteínas beneficiosas.

### Antecedentes de la invención

Además de células parentales hemopoyéticas, la médula ósea contiene "células estromales" que son células precursoras de mesénquima (Friedenstein, A. J. y col. *Exp. Hemat*. 4:267-274 (1976) que se incorpora aquí como referencia) que se caracterizan por sus propiedades de adherencia cuando las células de médula ósea se separan y se ponen en cápsulas de plástico. Al cabo de unas cuatro horas, las células estromales se adhieren al plástico y pueden entonces aislarse por separación de las células no-adheridas desde las cápsulas. Estas células de médula ósea que se adhieren íntimamente al plástico se han estudiado exhaustivamente (Castro-Malaspina, H. y col. *Blood* 56:289-301 (1980); Piersma A.H. y col. *Exp. Hematol*. 13:237-243 (1985); Simmons, P.J. y Torok-Storb, B. *Blood* 78:55-62 (1991); Beresford J. N. y col. *J. Cell Sci*. 102: 341-351 (1992); Liesveld, J.L. y col. *Blood* 73: 1794-1800 (1989); Liesveld, J.L. y col. *Exp. Hematol*. 19: 63-70 (1990); y Bennett, J.H. y col. *J. Cell. Sci* 99: 131-139 (1991).

Tal como aquí se emplea, el término "células adherentes" se refiere a células estromales y el término "células no-adherentes" se refiere a células hematopoyéticas precursoras.

Se cree que las células estromales participan en la creación del microentorno de la médula ósea *in vivo*. Cuando se aíslan, las células estromales están inicialmente latentes, pero llega un momento en que comienzan a dividirse de manera que pueden cultivarse *in vitro*. El número de células estromales expandidas se puede establecer y mantener. Las células estromales han sido utilizadas para generar colonias de células fibroblásticas adipocíticas y osteogénicas cuando se cultivan en condiciones apropiadas. Si las células adherentes se cultivan en presencia de hidrocortisona u otras condiciones seleccionadas, se obtienen poblaciones enriquecidas en células hematopoyéticas precursoras u osteogénicas (Carter, R.F y col. *Blood* 79: 356-364 (1992) y Bienzle, D. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 91:350-354 (1994)).

Existen varios ejemplos de utilización de células estronales. La Patente europea EP 0.381.490 describe una terapia génica utilizando células estromales. En particular, se describe un método de tratamiento de hemofilia. Las células estromales han sido utilizadas para producir tejido fibroso, hueso o cartílago cuando se implantan en tejidos seleccionados *in vivo* (Ohgushi, H. y col. *Acte Orthop*. Scand. 60:334-339 (1989), Nakahara, H. y col. *J. Orthop. Res*. 9: 465-476 (1991), Niedzwiedski, T. y col. *Biomaterials* 14: 115-121 (1993); y Wakitani, S. y col., *J. Bone & Surg* 76 A 579-592 (1994). En algunos trabajos, las células estromales se han utilizado para generar hueso o cartílago *in vivo* cuando se implantan subcutáneamente con cerámica porosa (Ohgushi, H. y col. *Acta Orthop. Scand*. 60: 334-339 (1989), intraperitonealmente en una cámara de difusión (Nakahara, H. y col. *J. Orth. Res*,. 9: 465-476 (1991), percutáneamente en un defecto de hueso inducido quirúrgicamente (Niedzwiedski, T. y col. *Biomaterials*, 14: 115-121 (1993), o se han transplantado dentro de gel de colágeno para reparar un defecto quirúrgico en un cartílago de articulación (Wakitani, S. y col. *J. Bone & Surg*. 76 A: 579-592 (1994). Piersma, A. H. y col. Brit. *J. Hematol*. 54: 285-290 (1983) describen que, después de transplante intravenoso de médula de hueso, las células que forman colonia de fibroblastos que construyen el estroma hemopoyético se alojan y permanecen en la médula ósea huésped. Steward y col. (*Blood* 81: 2566-2571 (1993)) han observado recientemente que administraciones inusualmente grandes y repetidas de células de médula completas producían el injerto a largo plazo de precursores hematopoyéticos en ratones que no habían sufrido ablación de médula. Además, Bienzlie y col. (*Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 91: 350-354 (1994) han utilizado, con éxito, cultivos de médula de hueso de largo plazo como células donantes para propagar permanentemente células hematopoyéticas en perros sin ablación de médula. En algunos trabajos, se han utilizado las células estromales ya sea como células que establecían un microentorno para el cultivo de precursores hematopoyéticos (Aklesaria, PNAS USA 84: 7681-7685 (1987) o como una fuente de población enriquecida de células parentales hematopoyéticas (Kiefer, Blood 78(10): 2577-2582 (1991))

### Compendio de la invención

Un aspecto de la presente invención está relacionado con la reivindicación 1.

La presente invención está relacionada asimismo con la reivindicación 7.

### Breve descripción de la figura

La Figura 1 muestra un esquema de las construcciones retrovirales pCMV-lacZ, pCOL1-lacZ y pCOL2-lacZ. Los alojamientos de las construcciones de gen son: LTR-Neo-promotor-Lac Z-LTR.

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

**Descripción detallada de la invención**

Tal como aquí se emplea, "células estromales", "fibroblastos que forman colonia", "células estromales de médula", "células adherentes" y "MSCs" se utilizan intercambiablemente y se refieren a la pequeña fracción de células en la médula ósea que pueden servir como precursoras tipo célula parental de osteocitos, condriocitos y adipocitos y que pueden aislarse de médula ósea por su capacidad de adherirse a cápsulas de plástico. Las células estromales pueden derivar de cualquier animal. En algunos modos de realización, las células estromales derivan de primates, preferiblemente humanos.

Tal como aquí se utiliza, "enfermedades, trastornos y estados caracterizados por un defecto genético" significa enfermedades, trastornos y estados en que genes defectuosos y/o expresión insuficiente de gen están relacionados casualmente a la enfermedad o síntomas. Los individuos que tienen cualquiera de las enfermedades, trastornos y estados, bien conocidos, que se caracterizan por un defecto genético pueden ser determinados por cualquier especialista en esta área. Entre los ejemplos de enfermedades, trastornos y estados caracterizados por defecto en un gen se incluyen, sin que quede limitado solo a ellos, deficiencia de hormona del crecimiento, diabetes, deficiencia en adenina desaminasa, hemofilia A y hemofilia B. Los métodos y medios para diagnosticar estos estados son muy conocidos.

Tal como aquí se utiliza, el término "enfermedad, trastorno o estado, caracterizado por un defecto de hueso, cartílago o pulmón" se refiere a enfermedades, trastornos y estados causados por una mutación genética en un gen que es expresado por células de hueso, células que producen cartílago o células de pulmón, tales que uno de los efectos de tal mutación se manifiesta por una anormal estructura y/o función del hueso, cartílago y pulmones, respectivamente.

Tal como aquí se emplea, el término "enfermedad, trastorno o estado caracterizado por un defecto en la dermis, vasos sanguíneos, corazón y riñón" se refiere a enfermedades, trastornos y estados que son causados por una mutación genética en un gen que es expresado por células de la dermis, vasos sanguíneos, corazón y riñón, de manera que uno de los efectos de tal mutación se manifiesta por una anormal estructura y/o función de la dermis, vasos sanguíneos, corazón y riñón respectivamente. Ejemplos de enfermedades, trastornos y estados caracterizados por un defecto en la dermis incluyen quemaduras, escoriaciones del lecho y úlceras diabéticas.

Tal como aquí se utiliza, "enfermedades, trastornos y estados caracterizados por un defecto en un gen que codifica una proteína secretada" significan enfermedades, trastornos y estados caracterizados por un defecto genético en el gen que es de los genes defectuosos o insuficientemente expresado que codifican una proteína que, normalmente, es secretada.

Tal como aquí se emplea, "enfermedades, trastornos y estados que pueden ser tratados con proteínas beneficiosas" se refiere a enfermedades, trastornos y estados que pueden ser tratados o prevenidos por la presencia de una proteína que alivia, reduce o da lugar a que sea aliviadas, reducidas o prevenidas, las causas y/o síntomas que caracterizan la enfermedad, trastorno o estado. Enfermedades, trastornos y estados que pueden ser tratados con proteínas incluyen enfermedades, trastornos y estados caracterizados por un defecto genético así como los que no se caracterizan por un defecto genético pero que no obstante pueden ser tratados o prevenidos por la presencia de una proteína que alivia, reduce, previene o hace que sean aliviadas, reducidas o prevenidas las causas y/o síntomas que caracterizan la enfermedad, trastorno o estado.

Tal como aquí se emplea, "inmunológicamente aisladas", "inmunológicamente protegidas", "inmunológicamente neutralizadas" y "una forma de aislarlas físicamente del sistema inmune del receptor" significa la encapsulación, la contención u otra separación física de las células implantadas del cuerpo en que están implantadas, de manera que la célula no es expuesta y no puede ser eliminada por el sistema inmune del cuerpo, de forma que las células que están inmunológicamente aisladas se administran de una manera que las aísla físicamente del sistema inmune del receptor. Entre los ejemplos de medios de aislamiento inmunológico se incluyen, sin que quede limitado solo a ellos, tecnologías y dispositivos conocidos tales como microencapsulación, matrices biocompatibles, cámaras de difusión, cartuchos implantables, dispositivos de implante con estructuras de membranas y otros receptáculos con membranas. Se prefiere que las células sean aisladas inmunológicamente manteniéndolas en dispositivos de implante.

Tal como aquí se utilizan, los términos "proteína beneficiosa" y "proteína heteróloga" son intercambiables y se refieren a 1) proteínas que pueden compensar a la proteína codificada por genes defectuosos y/o expresión insuficiente de gen que están ligados casualmente a la enfermedad o síntomas de enfermedades trastornos y estados caracterizados por un defecto genético y 2) proteínas cuya presencia alivia, reduce, previene o da lugar a que sean aliviadas, reducidas o prevenidas, las causas y/o síntomas que caracterizan las enfermedades, trastornos y estados que pueden tratarse con proteínas beneficiosas.

Tal como aquí se emplea "construcción de gen" se refiere a moléculas de ácido nucleico recombinantes extrañas que incluyen secuencias codificantes que codifican proteínas beneficiosas ligadas operativamente a elementos reguladores suficientes para expresión de la secuencia codificante en células estromales.

Tal como aquí se emplea, "moléculas de ácido nuleico recombinante extrañas" se refiere a moléculas de ácido nucleico recombinantes que no están presentes en las células estromales o no son expresadas como proteínas en niveles suficientemente altos en las células estromales hasta ser introducidas en la célula por medios tales, y sin que quede limitado solo a ellos, como transfección clásica ($CaPO_4$ o dextrano DEADE), electroporación, microinyec-

ción, transferencia mediada por liposoma, transferencia mediada químicamente, transferencia mediada por ligando o transferencia de vector viral recombinante.

Tal como aquí se utiliza, "gen heterólogo" se refiere a la secuencia codificante de la construcción de gen.

Tal como aquí se emplea, los términos "material genético exógeno" y "gen exógeno" se emplean intercambiablemente y se refieren a ADN genómico, ADNc, ADN y ARN sintéticos, ARNm y ARN y ADN antisentido que se introduce en la célula de estroma. El material genético exógeno puede ser heterólogo o una copia o copias adicionales del material genético normalmente encontrado en el individuo o animal. Cuando las células se utilizan como componente de una composición farmacéutica en un método para tratamiento de enfermedades, estados o trastornos, humanos, el material genético exógeno que se utiliza para transformar las células puede codificar proteínas seleccionadas como terapéutica utilizada en el tratamiento del individuos y/o para hacer a las células más disponibles para transplantes.

Tal como aquí se emplea "células de estroma transfectadas" se refiere a células de estroma a las que se ha provisto de una construcción de gen a través de cualquiera de las tecnologías utilizadas para introducir moléculas de ácido nucleico extrañas en células, tales como, sin que quede limitado solo a ellas, transfección clásica ($CaPO_4$ o dextrano DEADE), electroporación, microinyección, transferencia mediada por liposoma, transferencia mediada químicamente, transferencia mediada por ligando o transferencia de vector viral recombinante.

Algunos aspectos de la presente invención surgen del descubrimiento de que algunas células estromales, que son introducidas en un paciente se desarrollan en hueso, cartílago y pulmón, mientras que otras permanecen como células precursoras que dan lugar a células hijas que se desarrollan en hueso, cartílago y pulmón. Este descubrimiento permite el tratamiento con éxito de individuos que sufren enfermedades, estados y trastornos asociados con defectos en células de hueso, cartílago pulmón, ya sea por proporcionar a tales individuos células estromales de un donante normal, singeneico semejante o por aislamiento de células estromales del paciente que se cultivan y modifican genéticamente para corregir cualquier defecto genético responsable de las enfermedades, estados y trastornos asociados con defectos en células de hueso, cartílago o pulmón. De manera similar, se cree que las células estromales se desarrollarán también a células de dermis, vasos sanguíneos, corazón y riñones, o producirán células hijas que lo hagan.

El descubrimiento de que células estromales, cultivadas, repueblan tejidos, particularmente tejidos de hueso, cartílago y pulmón, cuando se administran a la corriente sanguínea de un individuo, las hace adecuadas para tratamiento de individuos que sufren enfermedades, estados y trastornos asociados con defectos en células de huesos, cartílagos o pulmones. El descubrimiento de que algunas células estromales cultivadas, aisladas, cuando se administran a la corriente sanguínea de un individuo, actúan como células precursoras que producen células hijas que maduran luego a células diferenciadas hace a la invención particularmente útil porque permite la presencia continuada y a largo plazo de células donadas normales o genéticamente modificadas sin necesidad de una continua re-administración de células. De manera similar, el desarrollo de células estromales a células de dermis, vasos sanguíneos, corazón y riñones, o producción de células hijas, permite el tratamiento de enfermedades que afectan a estos tejidos por medios similares.

Según esto, las células estromales de un donante semejante se pueden administrar por vía intravenosa a individuos que sufren enfermedades en que están implicadas células de hueso, cartílago o pulmón, o células de dermis, vasos sanguíneos, corazón o riñón, con el fin de aumentar o reemplazar las células de hueso cartílago o pulmón, o las células de dermis, vaso sanguíneo, corazón o riñón, del individuo. Las células estromales de un donante semejante se pueden administrar por vía intravenosa a individuos que sufren una enfermedad asociada a expresión de genes defectuosa en células de hueso, cartílago o pulmón, o células de dermis, vasos sanguíneos, corazón o riñón, con el fin de reemplazar las células del hueso, cartílago o pulmón del individuo o las de dermis, vasos sanguíneos o riñón, que no expresan, o lo expresan poco, un gen normal y/o expresan un escenario mutado. Las células estromales pueden ser transfectadas también con genes heterólogos en protocolos de terapia génica. Las células estromales de donante semejante o células estromales del individuo pueden ser separadas y alteradas genéticamente antes de volver a introducir las células en el individuo. Las células se pueden alterar genéticamente para introducir un gen cuya expresión tenga un efecto terapéutico sobre el individuo. Las células estromales de un individuo se pueden alterar genéticamente para reemplazar un gen defectuoso y/o para introducir un gen cuya expresión tenga un efecto terapéutico en el individuo.

Los individuos que sufren de enfermedades y trastornos que afectan a huesos y que se caracterizan por un defecto genético se pueden tratar por suplemento, aumento y/o reemplazamiento de las células del hueso defectuosas o deficientes por células que expresan correctamente un gen normal. Las células pueden derivar de células estromales de un donante semejante normal o de células estromales del individuo que se va a tratar. Si derivan del individuo que va a ser tratado, las células se pueden modificar genéticamente para corregir el defecto. Un ejemplo de una enfermedad o trastorno que afecta al hueso y que se caracteriza por un defecto genético es la osteogénesis imperfecta. Otro ejemplo de una enfermedad o trastorno que afecta al hueso y que se caracteriza por un defecto genético es la osteoporosis. La osteoporosis se considera frecuentemente como una enfermedad multifactorial a la que contribuyen factores del entorno tales como la dieta y el ejercicio. Sin embargo un estudio de la enfermedad en gemelos, familias extensas y grandes poblaciones demuestra que muchos individuos desarrollan la enfermedad principalmente debido a un defecto genético (véase Morrison y col, *Nature* 367:284-287 (1994). A los individuos que padecen osteogénesis imperfecta se les pueden administrar células estromales de un donante semejante normal que reemplacen las células de huesos del individuo que tiene un gen de colágeno mutado. En tales modos de realización, las células normales compensarán las células defectuosas. En algunos modos de realización, las células normales pueden prepararse a partir de las

propias células estromales del individuo, ya que las células con un defecto de colágeno mutado tienen desventaja en el crecimiento comparando con las células normales cuando crecen en cultivo. Por lo tanto, si las células estromales de un individuo con osteogénesis imperfecta se hacen crecer en cultivo, se enriquecerán gradualmente en células normales. Este modo de realización será particularmente eficaz si el individuo es un mosaico para el colágeno mutado de manera que algunas de las células de él o de ella contienen el gen de colágeno mutado y otras no. En un modo de realización alternativo, se aíslan células estromales de un individuo que padece osteogénesis imperfecta y se inserta un gen normal para colágeno I en las células estromales aisladas. Las células transfectadas se vuelven a introducir entonces en el individuo. Unos pocos individuos que sufren de osteoporosis tienen también mutaciones en uno de los dos genes de colágeno I y los mismos modos de realización compensarán las células defectuosas. En la mayoría de los individuos con osteoporosis, se desconocen aún los genes que fallan, pero es probable que se identifiquen pronto. En estos individuos, células normales compensarán el defecto. Además, cuando se identifican y aíslan los genes que fallan, un modo de realización alternativo será el de aíslar células estromales del individuo, insertar una copia o copias normales del gen mutado, y re-introducir las células en el individuo.

Los individuos que sufren enfermedades y trastornos que afectan al cartílago y que se caracterizan por un defecto genético se pueden tratar por suplemento, aumento y/o reemplazamiento de células defectuosas por células que expresan correctamente un gen normal. Las células pueden derivar de células estromales de un donante normal semejante o células estromales del individuo que se va a tratar. Si derivan del individuo que se va a tratar, las células se pueden modificar genéticamente para corregir el defecto. Un ejemplo de una enfermedad o trastorno que afecta al cartílago y que se caracteriza por un defecto genético es la condrodisplasia que da lugar a enanismo severo, a problemas graves con las articulaciones y problemas relacionados. A los individuos que sufren de condrodisplasia se les pueden administrar células estromales de un donante semejante, normal, que reemplacen las células que producen cartílago en el individuo que tiene un gen de colágeno mutado. En estos modos de realización, las células normales compensarán las células defectuosas. En un modo de realización alternativo, las células estromales se aíslan de un individuo que sufre de condrodisplasia y se inserta un gen normal para colágeno II en las células estromales aisladas. Las células transfectadas se vuelven a introducir entonces en el individuo. El modo de realización con el gen de colágeno II será útil para un 20% a 90% de individuos con varios tipos de condrodisplasia grave. Los restantes individuos con condrodisplasia tienen mutaciones en otros genes de colágeno (colágeno X y X1), en otros genes (receptor 3 de factor de crecimiento de fibroblastos), y en genes sin identificar aún. En estos individuos, las células normales compensarán las células defectuosas. También es un modo de realización alternativo aislar células estromales del individuo, insertar una copia o copias normales del gen mutado, y re-introducir las células en el individuo. Otro ejemplo de una enfermedad o trastorno que afecta al cartílago es la osteoartritis. La osteoartritis es una enfermedad heterogénea tanto en términos de etiología como en sus manifestaciones. Algunos individuos desarrollan la degeneración del cartílago en las articulaciones, lo que caracteriza a la osteoartritis por traumatismo o secuelas últimas de infecciones. Unos pocos individuos desarrollan la osteoartritis en múltiples articulaciones debido a mutaciones en el gen para colágeno II similares a las mutaciones en el gen que causa condrodisplasia. Estos individuos pueden, o no, mostrar signos de una condrodisplasia leve. La causa de osteoartritis en otros individuos es desconocida, pero los estudios en familias extensas sugieren que la enfermedad es hereditaria y por tanto causada por mutaciones en genes aún sin identificar. Por lo tanto, los mismos modos de realización que pueden ser útiles para compensar los genes mutados en individuos con condrodisplasia serán útiles también para compensar genes mutados en individuos con osteoartritis.

Los individuos que sufren enfermedades y trastornos que afectan a los pulmones y que se caracterizan por un defecto genético pueden tratarse por suplemento, aumento y/o reemplazamiento de las células defectuosas por células que expresan correctamente un gen normal. Las células pueden derivar de células estromales de un donante normal semejante o células estromales del propio individuo que va a ser tratado. Si derivan del individuo que va a ser tratado, las células se pueden modificar genéticamente para corregir el defecto. Un ejemplo de una enfermedad o trastorno que afecta a los pulmones y que se caracteriza por un defecto genético es la fibrosis quística. Otro ejemplo de enfermedad o trastorno que afecta a los pulmones y que se caracteriza por un defecto genético es una deficiencia en $\alpha$1-antitripsina. A los individuos que sufren fibrosis quística se les puede administrar células estromales de un donante semejante normal que es normal en fibrosis quística para reemplazar o suplementar las células de pulmón del individuo que tiene un gen de fibrosis quística mutado. En estos modos de realización, las células normales compensarán las células defectuosas. En un modo de realización alternativo, las células estromales se aíslan de un individuo que sufre de fibrosis quística y se inserta un gen de fibrosis quística normal en las células estromales aisladas. Las células transfectadas se vuelven a introducir entonces en el individuo.

En algunos aspectos, los individuos que padecen enfermedades de huesos, cartílago y pulmones así como los que sufren enfermedades de la dermis, vasos sanguíneos, corazón y riñón, se pueden tratar por células estromales aisladas, haciendo que éstas se expandan en número y administrar sistémicamente las células estromales rejuvenecidas expandidas. Algunas de las células estromales rejuvenecidas se desarrollarán para dar células normales de hueso, cartílago, pulmón, dermis, vasos sanguíneos, corazón o riñón. Las células estromales normales se expanden más rápidamente que las defectuosas y la población rejuvenecida expandida reflejará una mayor proporción de células normales. La Tabla 1 describe medios útiles para cultivar los cultivos rejuvenecidos expandidos de células estromales aisladas.

Además de reemplazar células que son defectuosas con células reparadas o células normales de donantes semejantes normales, estas células se pueden utilizar también para expresar las proteínas deseadas que son secretadas. Es decir, las células estromales se pueden aislar, proveerlas de un gen para una proteína deseada e introducirlas en un individuo dentro del cual se producirá la proteína deseada, y ejercer, o producir de otra manera, un efecto terapéutico. Este aspecto se refiere a terapia génica en la que se administran a un individuo proteínas terapéuticas.

Según algunos aspectos aquí descritos, las células estromales transfectadas aisladas inmunológicamente se pueden utilizar como terapia con células para tratar enfermedades, trastornos y estados caracterizados por un defecto genético y/o enfermedades, trastornos y estados que se pueden tratar con proteínas, En particular, las construcciones de gen que comprenden genes heterólogos que codifican proteínas beneficiosas son introducidas en células estromales. Las células estromales transfectadas se aíslan entonces inmunológicamente y se implantan en un individuo que se beneficiará cuando la proteína es expresada y secretada por la célula en el cuerpo.

Las células estromales inmunológicamente aisladas son útiles en particular en composiciones terapéuticas de células, porque además de ser huéspedes adecuados para expresar genes heterólogos y producir proteínas heterólogas, las células estromales se comportan favorablemente cuando se aíslan inmunológicamente. Las células estromales aisladas inmunológicamente poseen una muy alta viabilidad cuando se implantan en lugares que carecen de un suministro de sangre vascular directo. Además, las células estromales se pueden obtener fácil y cómodamente, se expanden rápidamente en cultivo, lo que les hace una buena fuente de un suministro adecuado de células útiles para terapia con células inmunológicamente aisladas.

Las construcciones de gen que comprenden secuencias de nucleótido que codifican proteínas heterólogas se pueden introducir en células estromales. Es decir, las células se alteran genéticamente para introducir un gen cuya expresión tiene efecto terapéutico en un individuo. Según algunos aspectos aquí descritos, las células estromales de un individuo, o de otro individuo, o de un animal no-humano, se pueden alterar genéticamente para reemplazar un gen defectuoso y/o para introducir un gen cuya expresión tiene efecto terapéutico en el individuo.

Las células estromales son útiles para preparar células transfectadas que pueden aislarse inmunológicamente y expresar genes heterólogos beneficiosos proporcionando los medios para corregir defectos genéticos y/o para producir proteínas terapéuticas. Las células estromales se pueden aislar con relativa facilidad y las células estromales aisladas se pueden cultivar para incrementar el número de células disponibles. Las células estromales se pueden transfectar, aislarse inmunológicamente e implantarse con un alto grado de viabilidad en puntos que carecen de suministro directo de sangre tales como lugares subcutáneos. En algunos modos de realización las células estromales pueden inmortalizarse tal como por virus SV40 o proteínas con propiedades transformadoras.

Los individuos que sufren enfermedades y trastornos genéticos pueden tratarse por suplemento, aumento y/o reemplazamiento de genes defectuosos o deficientes, proporcionándoles células estromales inmunológicamente aisladas que contienen construcciones de gen que incluyen copias de funcionamiento normal de los genes deficientes. Este aspecto de la invención se refiere a terapia génica en la que al individuo se le proporcionan genes en los que es deficiente en cuanto a presencia y/o función. Los genes proporcionados en la terapia celular compensan el gen defectuoso del individuo. Estos genes preferiblemente codifican proteínas que son secretadas.

Las células estromales son transfectadas y aisladas inmunológicamente. En algunos modos de realización, las células estromales son transfectadas con genes para los que el individuo que se va a tratar sufre de ausencia completa de una copia no-mutada del gen, o sufre de una ausencia o insuficiente expresión de una forma no-mutada de la proteína. Las células estromales son transfectadas con una copia no-mutada del gen en una forma expresable. Es decir, la proteína codificada por el gen transfectado será expresada por las células estromales, preferiblemente como una proteína secretada. Entre los ejemplos de enfermedades, estados o trastornos, en que los genes defectuosos, o de expresión de gen insuficiente, están ligados causalmente a la enfermedad o síntomas, se incluyen, sin que quede limitado a ellos, deficiencia de hormona del crecimiento, diabetes, deficiencia de adenina desaminasa, hemofilia A, hemofilia B. Otras enfermedades genéticas que se pueden tratar utilizando métodos de la invención incluyen: deficiencia en $\alpha_1$-antitripsina, enfermedad de Fabray, hipercolesterolemia familiar, enfermedad de Gaucher, Síndrome de Lesch-Nyhan, enfermedad de orina siruposa de Maple, deficiencia en ornitina transcarbamilasa, fenilacetonuria, enfermedad de Sandhoff, síndrome de Tay-Sachs y enfermedad de von Willebrand. Por introducción de genes normales en forma expresable que codifican hormona del crecimiento, insulina, adenina desaminasa o factor de coagulación de la sangre apropiado, a individuos que sufren de deficiencia de hormona del crecimiento, diabetes, deficiencia en adenina desaminasa y hemofilia, respectivamente, se les pueden proporcionar los medios de compensar defectos genéticos y eliminar, aliviar o reducir algunos o todos los síntomas asociados con tales enfermedades. Las Tablas IV y V contienen listas parciales de enfermedades, estados y trastornos que pueden ser tratados utilizando la presente invención.

Además de reemplazar los genes que son defectuosos por genes funcionales, también se pueden expresar las proteínas deseadas en forma secretada, ejerciendo con ello un efecto biológicamente activo terapéutico o profiláctico. Estas proteínas son preferiblemente secretadas por las células. Es decir, las células estromales pueden ser aisladas, ser provistas de un gen para una proteína deseada, aislarse inmunológicamente y ser introducidas en un individuo dentro del cual se producirá la proteína deseada que ejercerá, o producirá de otra manera, un efecto terapéutico. Este aspecto de la invención se refiere a terapia génica en que las proteínas terapéuticas son administradas a un individuo. Según estos aspectos de la invención, las células estromales aisladas son vectores para introducción de genes terapéuticos en el individuo como huéspedes para tales genes cuando las células son administradas al individuo.

En estos modos de realización, las células estromales son transfectadas con genes que codifican proteínas que tendrán un efecto terapéutico cuando son expresadas en el individuo que se va a tratar. En vez de administrar la proteína terapéutica directamente y en una serie de intervalos de tiempo, la presente invención proporciona un medio de administración de una proteína terapéutica de manera continua por administración de células que producen la proteína. Las células estromales son transfectadas con un gen que codifica la proteína en forma expresable. Es decir, la proteína

codificada por el gen transfectado será expresada por las células estromales, preferiblemente como una proteína secretada. Entre los ejemplos de proteínas terapéuticas se incluyen, sin que quede limitado solo a ellas, el factor de obesidad (Considine, R.V. y col. *J. Clin. Invest*., 1995, 95, 2986-2988; Arner, P. N. *Engl. J. Med*. 1995 333, 382; Emorine, L. y col. *Trends. Pharmacol. Sci*, 1994, 15, 3; Flier, J.S., *Cell*, 1995, 80, 15; Lowell, B.B. y col., *J. Clin. Invest*, 1995, 95, 923; y Rink, T.J. y col., *Nature*, 1994, 372, 406), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrofagos, factor estimulante de colonias de granulocitos, eritropoyetina, proteína antagonista de receptor de interleucina-2 e interleucina 1. Las Tablas IV y V contienen listas parciales de enfermedades, estados y trastornos que pueden tratarse utilizando la presente invención, contiene los nombres de las proteínas que pueden suministrarse a través de la construcción de gen según la invención.

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

La construcción de gen se proporciona preferiblemente como un vector de expresión que incluye la secuencia de codificación para una proteína heteróloga ligada operativamente a secuencias reguladores esenciales de manera que, cuando el vector es transfectado a la célula, la secuencia codificante será expresada por la célula. La secuencia codificante está ligada operativamente a los elementos reguladores necesarios para la expresión de esa secuencia en las células. La secuencia de nucleótido que codifica la proteína puede ser ADNc, ADN genómico, ADN sintetizado o un híbrido de ellos o una molécula de ARN tal como ARNm.

La construcción de gen incluye la secuencia de nucleótido que codifica la proteína beneficiosa ligada operativamente a los elementos reguladores y puede permanecer presente en la célula como una molécula citoplásmica que funciona, una molécula episomal que funciona o puede integrarse en el ADN cromosómico de la célula. El material genético exógeno se puede introducir en las células, donde permanece como material genético separado en la forma de un plasmidio. Alternativamente, el ADN lineal que puede integrarse en el cromosoma se puede introducir en la célula. Cuando se introduce el ADN en la célula, se pueden añadir los reactivos que promueven la integración de ADN en cromosomas. Las secuencias de ADN que son útiles para promover la integración se pueden incluir también en la molécula de ADN. Alternativamente, se puede introducir ARN en la célula.

Los elementos reguladores necesarios para expresión de genes incluyen: un promotor, un codón de iniciación, un codón de parada, y una señal de poliadenilación. Es necesario que estos elementos sean operables en las células estromales o en las células que surgen de las células estromales después de la infusión en el individuo. Además, es necesario que estos elementos estén ligados operativamente a la secuencia de nucleótido que codifica la proteína de manera que la secuencia de nucleótido pueda ser expresada en las células estromales y así pueda ser producida la proteína. Los codones de iniciación y el codón de parada se consideran generalmente como parte de una secuencia de nucleótido que codifica la proteína. Sin embargo, es necesario que estos elementos sean funcionales en las células estromales o células que surgen de células estromales. De manera análoga, los promotores y las señales de poliadenilación utilizadas deben ser funcionales dentro de las células estromales o células que surgen de las células estromales. Entre los ejemplos de promotores útiles para la práctica de la presente invención se incluyen, sin que quede limitado a ellos, promotores que son activos en muchas células, tales como promotor de virus citomegálico, promotores de SV40 y promotores retrovirales. Otros ejemplos de promotores útiles para la práctica de la presente invención incluyen, sin que quede limitado solo a ellos, promotores específicos para tejidos, es decir, promotores que funcionan en algunos tejidos pero no en otros; también promotores de genes expresados normalmente en células estromales con o sin secuencias potenciadoras específicas o generales. En algunos modos de realización, se utilizan promotores que expresan constitutivamente genes en células estromales con o sin secuencias potenciadoras. Las secuencias potenciadoras se proporcionan en tales modos de realización cuando son apropiadas o deseables.

Según algunos modos de realización, los genes deseados para transfección en células estromales se ligan operativamente al promotor de pro-colágeno humano I, promotor de pro-colágeno humano II, y promotor de pro-colágeno humano III. En algunos modos de realización, los genes se ligan a fragmentos de 5' relativamente cortos del gen de COL1A1 o COL2A1 que comprende el promotor junto con algunas de las secuencias de 5' traducidas y/o sin traducir del gen. En algunos modos de realización, el gen que se va a transfectar se liga operativamente a una secuencia que contiene un fragmento Sphl-HindIII de 1,9 kb del terminal 5' de COL1A1 humano. El fragmento contiene desde -476 pb a +1440 pb de gen de COL1A1 y, por tanto, incluye el promotor (476 pb), exon 1 (222 pb) y la mayor parte del intron 1 (1223 pb de un total de 1453 pb). En algunos modos de realización, el gen que se transfecta se liga operativamente a una secuencia que contiene un fragmento de terminal 5' del COL2A1 humano. En algunos modos de realización, el fragmento contiene -4,0 kb del promotor de COL2A1 y el gen de COL2A1 completo, el uno o más exones e introns secuencialmente desde exon 1 a exon 15 y desde intron 1 a intron 14. Algunas construcciones pueden designarse como se señala en la Patente estadounidense. copendiente número de serie 08/184.260 registrada el 18 de enero de 1994 titulada "Métodos de inserción dirigida de ADN en el genoma", que se incorpora aquí como referencia.

Ejemplos de señales de poliadenilación útiles para la práctica de la presente invención incluyen, sin que quede limitado solo a ellas, señal de poliadenilación de colágeno humano I, señal de poliadenilación de colágeno humano II, y señal de poliadenilación de SV40.

Para expresar material genético exógeno en un vector de expresión que ha de ser expresado, los elementos reguladores deben ligarse operativamente a la secuencia de nucleótido que codifica la proteína. Con el fin de hacer máxima

la producción de proteína, se puede seleccionar secuencias reguladoras que sean bien adecuadas para expresión del gen en las células deseadas. Además, se pueden seleccionar codones de forma que sean bien adecuados para expresión del gen en las células deseadas. Además, se pueden seleccionar codones de manera que sean lo más eficazmente transcritos en la célula. Cualquier especialista en esta técnica puede producir material genético exógeno como vectores de expresión que sean funcionales en las células deseadas.

Se contempla también que se pueden seleccionar elementos reguladores para promocionar expresión específica de la proteína en tejidos. Así por ejemplo, se pueden proporcionar promotores específicos de manera que el gen heterólogo sea expresado solamente en tejidos donde se implanten las células estromales inmunológicamente aisladas.

La proteína heteróloga incluye preferiblemente una secuencia de señal que dirige el transporte y secreción de la proteína heteróloga en la célula estromal. Las secuencias de señal son generalmente procesadas y separadas al secretarse la proteína madura desde la célula.

Además de proporcionar células con material genético que 1) corrige los defectos genéticos en las células, 2) codifica las proteínas, que por otra parte no están presentes en suficientes cantidades y/o estado funcional, para que el material genético corrija los defectos genéticos del individuo, y/o 3) codifica proteínas que son útiles como terapia en el tratamiento o prevención de una particular enfermedad, estado o trastorno o síntomas asociados con ellas, el material genético se puede introducir también en las células estromales utilizadas en la presente invención para proporcionar un medio para terminar selectivamente con tales células, si tal terminación se hiciera deseable. Estos medios de insertar dirigidamente células para destrucción pueden ser introducidos en células estromales que han de ser por otra parte genéticamente modificadas así como también aquellas a las que no ha de introducirse ningún otro material genético exógeno.

Las células estromales aisladas se proveen de material genético que las vuelve específicamente susceptibles a la destrucción. Por ejemplo, las células estromales pueden ser provistas con genes que codifican un receptor que puede ser insertado dirigidamente con un agente citotóxico. Se puede introducir en las células una forma expresable de un gen que puede utilizarse para inducir muerte selectiva de células. En este sistema, las células que expresan la proteína codificada por el gen son susceptibles de ser insertadas dirigidamente para matar las células en condiciones específicas o en presencia o ausencia de agentes específicos. Por ejemplo, se puede introducir una forma expresable de un gen de timidina quinasa de virus de herpes (tk de herpes) en las células y ser utilizado para inducir la muerte selectiva de células. Cuando se introduce el material genético exógeno, que incluye gen de tk de herpes, en el individuo, se producirá tk de herpes. Si es deseable o necesario matar las células implantadas, se puede administrar fármaco gagciclovir al individuo y que el fármaco cause la muerte selectiva de cualquier célula que produzca tk de herpes. Según esto, se puede proporcionar un sistema que permita la destrucción selectiva de las células implantadas.

Cualquier especialista en esta técnica puede identificar individuos que sufren enfermedades genéticas tales como las enumeradas en las Tablas IV y V que incluyen deficiencia de hormona del crecimiento, diabetes, deficiencia de adenina desaminasa y hemofilia, por utilización de procedimientos de diagnóstico convencionales de rutina.

Las células estromales se pueden obtener por separación de células de médula ósea de un donante y colocación de las células en un recipiente estéril con una superficie de plástico u otra superficie apropiada con la que las células se pongan en contacto. Las células estromales se adherirán a la superficie de plástico al cabo de 30 minutos a 3 días. Después de al menos 30 minutos, preferiblemente aproximadamente 4 horas, las células no adheridas se pueden separar y descartar. Las células adheridas son células estromales que están inicialmente sin dividir. Al cabo de aproximadamente 2-4 días sin embargo, las células comienzan a proliferar y pueden ser cultivadas para incrementar su número utilizando técnicas convencionales de cultivo de células.

Según modos de realización preferidos, se cultivan células estromales en medio suplementado con 2-20% de suero de ternera fetal o medio sin suero con o sin suplementos adicionales.

Las células estromales aisladas se pueden transfectar utilizando técnicas muy conocidas fácilmente asequibles a cualquier especialista en esta área. Los genes extraños se pueden introducir en células estromales por los métodos convencionalmente empleados para introducir construcciones de gen en una célula que expresará las proteínas codificadas por los genes. En algunos modos de realización, las células son transfectadas por transfección de precipitación de fosfato de calcio, transfección de dextrano DEAE, electroporación, microinyección, transferencia mediada por liposoma, transferencia mediada químicamente, transferencia mediada por ligando o transferencia por vector viral recombinante.

En algunos modos de realización, se utilizan vectores de adenovirus recombinantes para introducir ADN con las deseadas secuencias en la célula estromal. En algunos modos de realización, se utilizan vectores de retrovirus recombinantes para introducir ADN con las deseadas secuencias en la célula estromal. En algunos modos de realización, se emplean técnicas de transfección como la convencional con $CaPO_4$, dextrano DEAE o mediada con vehículo de lípido, para incorporar el deseado ADN a las células que se dividen. Se pueden emplear técnicas convencionales de selección de resistencia a antibióticos para identificar y seleccionar células transfectadas. En algunos modos de realización, el ADN se introduce directamente en las células por microinyección. De manera similar, se pueden utilizar técnicas bien conocidas de electroporación o técnicas de bombardeo con partículas para introducir ADN extraño en células estromales aisladas. Habitualmente es co-transfectado o ligado un segundo gen al gen terapéutico. El segundo gen es, frecuentemente, un gen de resistencia a antibiótico seleccionable. Las células transfectadas se pueden seleccionar

por crecimiento de las células en un antibiótico que matará las células que no han captado el gen seleccionable. En la mayoría de los casos, donde los dos genes están sin ligar y co-transfectados, las células que sobreviven al tratamiento antibiótico tienen en ellas ambos genes y expresan a ambos.

Después de aislar las células estromales, las células se pueden administrar al aislarlas o después de haber sido cultivadas. Las células estromales aisladas administradas al aislarlas se administran al cabo de aproximadamente una hora después del aislamiento. Generalmente, la administración de las células estromales se puede hacer inmediatamente después de aisladas, en situaciones en que el donante es una persona mayor y el receptor es un niño. Se prefiere que las células estromales sean cultivadas antes de las administraciones. Las células estromales aisladas se pueden cultivar desde 1 hora a más de 1 año. En algunos modos de realización preferidos, las células estromales aisladas se cultivan antes de su administración durante un período de tiempo suficiente para que se conviertan de no cíclicas a células replicantes. En algunos modos de administración las células estromales aisladas se cultivan durante 3-30 días, preferiblemente 5-14 días, más preferiblemente 7 10 días. En algunos modos de realización, las células de estroma aisladas se cultivan durante 4 semanas a un año, preferiblemente 6 semanas a 10 meses, más preferiblemente 3 a 6 meses.

Cuando las células se transfectan, o bien 1) se transfectan primero células estromales no-cíclicas, aisladas, y después se administran como células no-cíclicas, 2) se transfectan primero células estromales no cíclicas, aisladas, luego se cultivan durante un período de tiempo suficiente para convertirlas de no-cíclicas a células replicantes y luego se administran, 3) las células de estroma no-cíclicas, aisladas, se cultivan primero durante un período de tiempo suficiente para convertirlas de no-cíclicas a células replicantes, luego se transfectan, y después se administran, o 4) se cultivan primero las células de estroma no-cíclicas, aisladas, durante un período de tiempo suficiente para convertirlas de no-cíclicas a células replicantes, entonces se transfectan, luego se cultivan y después se administran. En algunos modos de realización, las células estromales se aíslan, se transfectan e inmediatamente se administran. Es preferible que las células estromales se cultiven antes de la transfección y/o administraciones. Las células estromales aisladas se pueden cultivar en cultivos de 3-30 días, en algunos modos de realización 5-14 días, en algunos modos de realización 7-10 días antes de la transfección. Las células estromales transfectadas se pueden cultivar en cultivos de 3-30 días, en algunos modos de realización 5-14 días, en algunos modos de realización 7-10 días antes de la administración. Las células estromales aisladas se pueden cultivar en cultivos de 3-30 días, en algunos modos de realización 5-14 días, en algunos modos de realización 7-10 días antes de la transfección y a la transfección, cultivarse adicionalmente durante 3-30 días, en algunos modos de realización 5-14 días, en algunos modos de realización 7-10 días antes de la administración. En algunos modos de realización, las células estromales aisladas se cultivan durante 4 semanas a un año, en algunos modos de realización 6 semanas a 10 meses, en algunos modos de realización 3-6 meses, antes de la transfección. Las células estromales transfectadas se pueden cultivar durante 4 semanas a 1 año, en algunos modos de realización 6 semanas a 10 meses, en algunos modos de realización 3-6 meses antes de la administración. En algunos modos de realización, las células estromales aisladas se cultivan durante 4 semanas a 1 año, en algunos modos de administración 6 semanas a 10 meses, en algunos modos de administración 3-6 meses antes de la transfección y a la transfección, se cultivan además 4 semanas a un año, en algunos modos de realización 6 semanas a 10 meses, en algunos modos de realización 3-6 meses antes de la administración.

Las células estromales aisladas se pueden transfectar utilizando técnicas bien conocidas fácilmente asequibles para los especialistas en esta área. En algunos modos de realización, los vectores de adenovirus recombinante se utilizan para introducir ADN con las secuencias deseadas en la célula estromal. En algunos modos de realización, se emplean técnicas de transfección por medio de $CaPO_4$ convencional, dextrano DEAE o mediada por vehículo de lípido para incorporar el ADN deseado a las células que se dividen. Se pueden emplear técnicas convencionales de selección de resistencia a antibióticos para identificar y seleccionar células transfectadas. En algunos modos de realización, se introduce el ADN directamente en las células por microinyección. De forma similar, se pueden emplear las conocidas técnicas de electroporación o bombardeo con partículas para introducir ADN extraño en células estromales aisladas.

Para la administración de células estromales, se separan las células estromales aisladas de las placas de cultivo, se lavan con solución salina y se centrifugan hasta aglomerarlas y se vuelven a suspender en una solución de glucosa que es infundida en el paciente. En algunos modos de realización, se lleva a cabo ablación de médula ósea antes de la infusión con el fin de hacer espacio en el hueso a las células introducidas. La ablación de la médula ósea se puede llevar a cabo por radiación con rayos X del individuo que está siendo tratado, administrando fármacos tales como ciclofosfamida o por una combinación de rayos X y administración de fármaco. En algunos modos de realización la ablación de la médula ósea se produce por administración de radioisótopos conocidos por destruir las células de hueso metastáticas, tales como, por ejemplo, estroncio radiactivo, samario$^{135}$, holmio$^{165}$ (Véase Applebaum, F.R. y col. (1992) *Blood* 80(6): 1608-1613, que se incorpora aquí como referencia).

Si la ablación de la médula ósea precede a la administración de células estromales, la administración de células estromales deberá ir acompañada por la administración de células no-adherentes que comprenden precursores de células sanguíneas necesarias para la supervivencia. Estas células no adherentes se pueden aprovechar de la propia muestra utilizada como material de partida en el aislamiento de células estromales y almacenarse, o pueden derivar de una muestra diferente. En algunos modos de realización preferidos, las células no-adherentes son proporcionadas por el paciente/receptor. Antes de iniciar los procedimientos que generan ablación de médula ósea, se obtiene y almacena una muestra de médula ósea del paciente/receptor. Se puede utilizar la muestra entera o se pueden aislar células no-adherentes y ser utilizadas para administrarlas en unión de células estromales aisladas. Las células no-adherentes

administradas conjuntamente con la administración de células estromales se pueden administrar por separado antes o después de la administración de las células estromales o pueden mezclarse con las células estromales aisladas antes de la administración.

La ablación de la médula ósea es opcional. En algunos modos de realización, se produce una ablación parcial, pero no completa, de la médula ósea En algunos modos de realización las células estromales se administran sin ablación de médula ósea.

Se administran por infusión entre $10^7$ y $10^{13}$ células por 100 kg de peso corporal. En algunos modos de realización, se infunden intravenosamente entre 1-5 x $10^5$ y 1-5 x $10^{12}$ células por 100 kg de peso corporal. En algunos modos de realización, se infunden intravenosamente entre aproximadamente 1 x $10^9$ y 5 x $10^{11}$ células por 100 kg de peso corporal. En algunos modos de realización, se infunden intravenosamente 2 x $10^{11}$ células por 100 kg de peso corporal.

En algunos modos de realización, se proporciona una sola administración de células. En algunos modos de realización, las administraciones son múltiples en el transcurso de 3-7 días consecutivos. En algunos modos de realización, se realizan 3-7 administraciones en el curso de 3-7 días consecutivos. En algunos modos de administración, se hacen 5 administraciones en el curso de 5 días consecutivos.

En algunos modos de realización, se hace una sola administración de entre $10^7$ y $10^{13}$ por 100 kg de peso corporal. En algunos modos de realización, se proporciona una sola administración de entre aproximadamente 1-5 x $10^{12}$ células por 100 kg de peso corporal. En algunos modos de realización se hace una sola administración de entre aproximadamente 1 x $10^9$ y 5 x $10^{11}$ células por 100 kg de peso corporal. En algunos modos de realización, se proporciona una sola administración de 4 x $10^9$ células por 100 kg de peso corporal. En algunos modos de realización se hace una sola administración de 2 x $10^{11}$ células por 100 kg de peso corporal.

En algunos modos de realización, se hacen administraciones múltiples de entre $10^7$ a $10^{13}$ células por 100 kg de peso corporal. En algunos modos de realización se realizan administraciones múltiples de entre aproximadamente 1-5 x $10^8$ y 1-5 x $10^{12}$ células por 100 kg de peso corporal. En algunos modos de realización se realizan administraciones múltiples de entre aproximadamente 1x$10^9$ y 5 x $10^{11}$ células por 100 Kg de peso corporal, en el curso de 3-7 días consecutivos. En algunos modos de realización, se hacen administraciones múltiples de 4 x $10^9$ por 100 kg de peso corporal en el curso de 3-7 días consecutivos, En algunos modos de realización se hacen administraciones múltiples de 2 x $10^{11}$ células por 100 kg de peso corporal en el transcurso de 3-7 días consecutivos. En algunos modos de realización se hacen 5 administraciones de 3-5 x $10^9$ células en el curso de 5 días consecutivos. En algunos modos de realización, se hacen 5 administraciones de 4 x $10^9$ en el curso de 5 días consecutivos. En algunos modos de realización se proporcionan 5 administraciones de 1-3 x $10^{11}$ células en el curso de 5 días consecutivos. En algunos modos de realización, se hacen 5 administraciones de 2 x $10^{11}$ en el curso de 5 días consecutivos.

Las células estromales en cámaras de difusión están descritas por Benayahu, D. y col. (1989) en *J. Cell Physiol* 140: 1-7 y Mardon, H. J. y col. (1987) *Cell Tissue Res*. 250:157-165.

Después de introducir la construcción de gen en las células estromales, las células se pueden aislar inmunológicamente inmediatamente o después de haber sido cultivadas. Las células estromales se pueden implantar después de haber sido aisladas inmunológicamente. Las células estromales se pueden aislar inmunológicamente por cualquiera de los métodos conocidos utilizando materiales de partida y/o dispositivos fácilmente asequibles. Las células estromales se pueden microencapsular empleando muchos de esos protocolos de microencapsulación entre los que se incluyen, por ejemplo, los descritos en la Patente estadounidense número 4.391.909, Patente estadounidense 4.806.355, Patente estadounidense número 4.942.129 y Patente estadounidense número 5.334.640.

Las células estromales se pueden administrar en cámaras con membranas difundibles o ser encapsuladas en microesferas. En otro modo de realización, las células estromales están contenidas en fibras huecas tales como las comercializadas por Amicon, Inc. (Beverly MA). Estas fibras se utilizan, por ejemplo, para hacer cartuchos para diálisis. Uno de los extremos se puede empujar desde debajo de la piel y reducirse en tamaño si se tienen que disminuir las dosificaciones de la proteína producida por las células. El área de la superficie de las fibras es muy alta. Además, las células en la fibra pueden hacerse salir y ser reemplazadas periódicamente. Las fibras huecas están descritas en las páginas 50-51 de Amicon, Inc. Publication No. 323.

De manera similar, la incorporación de células estromales transfectadas a matrices biocompatibles permitirá la secreción de proteína beneficiosa para el individuo mientras se mantienen las células en un estado inmunológicamente aislado. En la Patente estadounidense número 4.902.295 y Patente estadounidense número 4.997.443, por ejemplo, se dan ejemplos de estas matrices biocompatibles. En algunos modos de realización, las células estromales transfectadas se aíslan inmunológicamente por introducción de las mismas en sistemas de implante de tejidos que son estructuras de membrana. Es decir, las células se mantienen en receptáculos que incluyen al menos una membrana porosa. Las células dentro de la estructura de membrana se aíslan inmunológicamente mientras que las proteínas beneficiosas pueden quedar disponibles para los individuos haciéndolas pasar a través de la membrana. Los dispositivos de implante que son estructuras de membrana incluyen, sin que quede limitado a ellos, los descritos en la Patente estadounidense número 5.314.471 y Patente estadounidense número 5.344.454. Según un modo de realización de la invención, se proporciona un dispositivo de implante que comprende dos estructuras de anillo. Cada estructura de anillo comprende un anillo de plástico circular y una membrana millipore de 3 micras que cubre el área del círculo. Las células estromales

transfectadas se disponen entre las dos estructuras de anillo que están conectadas entre sí en la circunferencia. El dispositivo de implante construido se implanta preferiblemente subcutáneamente.

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

Las células inmunológicamente aisladas se pueden implantar subcutánea o intraperitonealmente. Alternativamente, se pueden unir, o implantarse de otra manera, adyacentes a órganos y tejidos a los que la proteína beneficiosa se suministra preferiblemente. En los modos de realización preferidos, los dispositivos de implante se implantan subcutánea o intraperitonealmente.

La invención es particularmente útil para tratar aquellas enfermedades, trastornos y estados que requieren cantidades de proteínas relativamente pequeñas, lo más preferiblemente proteína secretada. Entre los ejemplos se incluyen: factor de crecimiento, factor de obesidad y factor IX, cada uno de los cuales requiere muy pequeña cantidad de proteína para su función. Las Tablas IV y V contienen listas parciales de enfermedades, estados y trastornos que pueden ser tratados utilizando la presente invención.

Es preferible que las células estromales se cultiven antes del aislamiento inmunológico. Las células estromales se pueden cultivar desde 1 hora a más de 1 año. En algunos modos de realización preferidos, las células estromales se cultivan durante un período de tiempo suficiente para permitirlas convertirse de no-cíclicas a células replicantes. En algunos modos de realización, las células de estroma se cultivan durante 3-30 días, preferiblemente 5-14 días, más preferiblemente 7-10 días. En algunos modos de realización, las células estromales se cultivan durante 4 semanas a 1 año, preferiblemente 6 semanas a 10 meses, más preferiblemente 3-6 meses.

En los modos de realización preferidos, las células son, o bien 1) células estromales no-cíclicas, aisladas, que se transfectan primero y luego se aíslan inmunológicamente, implantándose entonces como células no-cíclicas, 2) células estromales no cíclicas, aisladas, que son primero transfectadas, luego cultivadas durante un período de tiempo suficiente para convertirlas de no-cíclicas a células replicantes, aisladas entonces inmunológicamente y luego implantadas, 3) células estromales no-cíclicas, aisladas, que son primero cultivadas durante un período de tiempo suficiente para convertirlas de no-cíclicas a células replicantes, transfectadas entonces, aísladas luego inmunológicamente y entonces implantadas, ó 4) células estromales no-cíclicas, aisladas, que se cultivan primero durante un período de tiempo suficiente para convertirlas de no-ciclicass a células replicantes, transfectadas entonces, luego cultivadas, aisladas inmunológicamente y después implantadas. En algunos modos de realización, las células estromales se aíslan, se transfectan, se aíslan inmunológicamente y se implantan. Es preferible que las células estromales se cultiven antes y después de la transfección. Las células estromales aisladas se pueden cultivar en cultivos de 3-30 días, en algunos modos de realización 5-14 días, en algunos modos de realización 7-10 días antes de la transfección. Las células estromales transfectadas se pueden cultivar en cultivos de 3-30 días, en algunos modos de realización 5-14 días, en algunos modos de realización 7-10 días antes de la administración. Las células estromales aisladas se pueden cultivar en cultivos de 3-30 días, en algunos modos de realización 5-14 días, en algunos modos de realización 7-10 días antes de la transfección y, a la transfección, cultivarse adicionalmente 3-30 días, en algunos modos de realización 5-14 días, en algunos modos de realización 7-10 días antes de la administración. En algunos modos de realización, las células estromales aisladas se cultivan durante 4 semanas a un año, en algunos modos de realización 6 semanas a 10 meses, en algunos modos de realización 3-6 meses, antes de la transfección. Las células estromales transfectadas se pueden cultivar durante 4 semanas a 1 año, en algunos modos de realización 6 semanas a 10 meses, en algunos modos de realización 3-6 meses antes de la implantación. En algunos modos de realización, las células estromales aisladas se cultivan durante 4 semanas a un año, en algunos modos de reaización 6 semanas a 10 meses, en algunos modos de realización 3-6 meses antes de transfección y, a la transfección, se cultivan además durante 4 semanas a 1 año, en algunos modos de administración 6 semanas a 10 meses, en algunos modos de administración 3-6 meses antes de la implantación.

Como se ha establecido antes, la muestra de médula ósea para transplante puede derivar de un donante semejante. Los especialistas en esta técnica pueden identificar fácilmente los donantes semejantes utilizando técnicas y criterios convencionales.

Las muestras de médula ósea para transplante se puede obtener de donantes semejantes por técnicas convencionales. En algunos modos de realización, se lleva a cabo ablación de médula ósea antes de la infusión con el fin de hacer espacio en el hueso para las células introducidas. La ablación de médula ósea se puede realizar por radiación con rayos X del individuo que se va a tratar, administración de fármacos tales como ciclofosfamida o por combinación de rayos X y administración de fármaco. En algunos modos de realización, la ablación de la médula ósea es producida por administración de radioisótopos conocidos por ser destructores de células óseas metastáticas, por ejemplo estroncio radiactivo, samario$^{135}$ u holmio$^{165}$ (Véase Applebaum, F.R. y col. 1992 *Blood* 80(6)-1608-1613.

La ablación de médula ósea es opcional. En algunos modos de realización, se produce una ablación de médula ósea parcial, pero no completa, antes del transplante de médula ósea. En algunos modos de realización, la médula ósea se administra sin ablación de médula ósea.

Se prefiere que el número de células utilizadas en el transplante de médula ósea para tratamiento de enfermedad de huesos y cartílagos sobrepase al normalmente usado para otros tratamientos. Se administran por infusión entre 3 a 10 veces la dosificación de médula de hueso normal por 100 kg de peso corporal.

En algunos modos de realización, se proporciona una sola administración de células. En algunos modos de realización las administraciones son múltiples. En algunos modos de realización se llevan a cabo administraciones múltiples en el curso de 3-7 días consecutivos. En algunos modos de realización, se proporcionan 3-7 administraciones en el curso de 3-7 días consecutivos. En algunos modos de realización se proporcionan 5 administraciones en el curso de 5 días consecutivos.

En algunos modos de realización, se proporciona una sola administración de $10^7$ a $10^{13}$ células por 100 kg de peso corporal, En algunos modos de administración, se proporciona una sola administración de entre aproximadamente 1-5 x $10^8$ y 1-5 x $10^{12}$ células por 100 kg de peso corporal. En algunos modos de realización se hace una sola administración de entre aproximadamente 1 x $10^9$ y 5 x $10^{11}$ células por 100 kg de peso corporal. En algunos modos de realización, se proporciona una sola administración de 4 x $10^9$ células por 100 kg de peso corporal. En algunos modos de realización se hace una sola administración de 2 x $10^{11}$ células por 100 kg de peso corporal.

En algunos modos de realización, se realizan administraciones múltiples de entre $10^7$ y $10^{13}$ células por 100 kg de peso corporal. En algunos modos de realización se hacen administraciones múltiples de entre aproximadamente 1-5 x $10^8$ y 1-5 x $10^{12}$ células por 100 kg de peso corporal. En algunos modos de realización se hacen administraciones múltiples de entre aproximadamente 1x$10^9$ y 5 x $10^{11}$ células por 100 Kg de peso corporal, en el curso de 3-7 días consecutivos. En algunos modos de realización, se proporciona administraciones múltiples de 4x$10^9$ células por 100 kg de peso corporal en el curso de 3-7 días consecutivos. En algunos modos de realización, se hacen administraciones múltiples de 2 x $10^{11}$ células por 100 kg de peso corporal en el curso de 3-7 días consecutivos. En algunos modos de realización se hacen 5 administraciones de 3-5 x $10^9$ células a lo largo de 5 días consecutivos. En algunos modos de realización, se hacen 5 administraciones de 4 x $10^9$ en el transcurso de 5 días consecutivos. En algunos modos de realización se proporcionan 5 administraciones de 1-3 x $10^{11}$ células en el curso de 5 días consecutivos. En algunos modos de realización, se proporcionan 5 administraciones de 2x$10^{11}$ células en el curso de 5 días consecutivos.

**Ejemplos**

Ejemplo 1

(Que no forma parte de la invención)

Se utilizaron células de una línea de ratón transgénico que expresa un mini-gen humano para colágeno I de una manera específica para tejido, con el fin de ver si las células mesenquimales precursoras de médula ósea que se expanden en cultivo pueden servir como precursoras a largo plazo de huesos y otros tejidos conjuntivos después de infusión intravenosa a ratones irradiados. El gen marcador consistió en un mini-gen borrado internamente en cuanto a la cadena pro$\alpha$1(I) humana de procolágeno I que causa la síntesis de cadenas pro$\alpha$1(I) acortadas (Khillan, J.S. y col. *J. Biol. Chem*. 266: 23373-23379 (1991; Pereira, R. y col. *J. Clin. Invest*. 91:709-716 (1983); y Sokolov, B.P. y col. Biochemistry 32:9242-9249 (1993)).

Las células que expresan el gen se obtuvieron de una línea de ratones transgénicos en los cuales el número de copias del mini-gen humano en relación al gen endógeno de ratón era de 100 a 1, y los niveles de estado estacionario de ARNm del minigen humano respecto al ARNm del gen endógeno de ratón era de aproximadamente 0,5:1 en la mayoría de los tejidos.

Las células de donante de médula parcialmente enriquecida en precursoras mesenquimales se prepararon utilizando protocolos convencionales (Friedenstein, A.J. y col. *Exp. Hemat* 4 267-274 (1976); Castro Malaspina H. y col. *Blood* 56: 289-301 (1980); Piersma A.H. y col. *Exp. Hematol*. 4: 237-243 (1985); Simmons P.J. y Torok-Storb B., *Blood* 78: 55-62 (1991); Beresford J.N. y col. *J. Cell. Sci*. 102: 341-351 (1992); Liesveld J. L. y otros, *Blood* 73: 1794-1800 (1989); Liesveld J.L. y col. *Exp. Hematol*. 19: 63-70 (1990); y Bennett, J.H. y col. *J. Cell. Sci* 99: 131-139 (1991)

Brevemente, se cortaron los extremos de huesos largos de ratones transgénicos y se extrajo la médula empleando una jeringuilla a presión llena de $\alpha$-MEM (Sigma) que contenía 10% de suero bovino fetal (Atlanta Biologicals. Se cultivaron aproximadamente $10^7$ células nucleadas en matraces de cultivo de plástico de 175 $cm^2$ en 25 ml de $\alpha$-MEM que contenía 10% de suero bovino fetal. Al cabo de 4 horas, se descartaron las células no-adherentes por reemplazamiento del medio. Al cabo de dos a tres días aparecieron focos que contenían 2 a 4 células tipo fibroblasto y los focos crecieron hasta formar colonias casi confluentes en aproximadamente 1 semana. El rendimiento fue de aproximadamente $10^7$ células por matraz después de digestión con tripsina. Según la microscopía de contraste de fase, la mayoría de estas células eran tipo fibroblastos, pero se vieron también unos cuantos macrofagos y adipocitos.

Aproximadamente $10^5$ de las células cultivadas no-adherentes se mezclaron con 6x$10^5$ células no-adherentes obtenidas por incubación de médula de ratones normales durante 4 horas en matraces de 175 $cm^2$ en las mismas condiciones utilizadas para el aislamiento inicial de las células adherentes. La mezcla de aproximadamente 7x$10^5$ células en 0,2 a 0,4 ml de $\alpha$-MEM y 10% de suero bovino fetal se inyectó en la vena caudal de cada ratón receptor.

Se prepararon ratones de ocho semanas de edad de la misma estirpe FVB/N para recibir las células de donante por irradiación con irradiador de $Cu^{137}$ (Atomic Energy of Canada, Ltd). La unidad tenía un ritmo de dosis de 116 cG/minuto con una configuración de haz opuesto paralelo. Cada animal recibió 9,0 Gy en dos fracciones con 4 horas de intervalo (4,5 Gy + 4,5 Gy) (O'Hara, M.D. y col. *Exp. Hemat* 19: 878-881 (1991). Una a dos horas después de

la segunda fracción de radiación, se inyectó intravenosamente la mezcla de células adherentes marcadas y células normales no-adherentes. Los ratones irradiados de control que no recibieron la infusión de células murieron al cabo de 10 a 13 días del fallo de la médula.

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

Los ensayos de ratones irradiados al cabo de un día indicaron solo cantidades traza de células de donante en la médula, bazo, hueso, pulmón o cerebro (Tabla 1). Niveles ligeramente más altos se vieron a los siete días. A los 30 días y 150 días, la progenie de las células de donante alcanzaban a 2,0 a 12% de las células de la médula, bazo y pulmón (Tabla 1). A los 150 días, alcanzaron también el 1,5 a 5,0% de las células en cartílago xifoide que se diseccionó libre de cualquier tejido mineralizado o fibroso bajo el microscopio. Aunque los valores medios parecían mostrar una disminución entre 1 y 5 meses, no había decrecimiento estadísticamente significativo en los valores combinados para médula, bazo, hueso y pulmón entre estos dos períodos de tiempo (Tabla 1). Los ensayos con ratones no-irradiados revelaron solo muy bajos niveles de las células de donante en los mismos puntos de tiempo (<0,0001 a 0,05%). El ensayo de PCR *in situ* de secciones de tejidos de pulmón demostró que la progenie de las células de donante estaban uniformemente distribuidas en el parénquima tanto de alveolos como de bronquios.

Para confirmar que la progenie de las células de donante estaban presentes en el cartílago, se aislaron condrocitos de cartílago xifoide y articular por digestión a 37ºC durante toda la noche con colagenasa bacteriana (Sigma) de 0,5 mg/ml en DMEM. Los ensayos de PCR indicaron que la progenie de las células de donante alcanzaba el 2,5% de los condrocitos aislados.

Para determinar si las células de donante llegaban a ser células mesenquimales funcionales en los tejidos en los que se propagaban, se ensayaron tejidos de los ratones receptores por RT-PCR en cuanto a la expresión del mini-gen humano para colágeno I contenido en las células del donante. En 3 ratones ensayados a los 150 días, el mini-gen se expresaba en hueso, un tejido en que en que más de la mitad de la proteína se sintetizaba en colágeno I. La expresión en el hueso fue confirmada por un ensayo similar sobre las células de hueso aisladas del fémur y cultivadas durante 1 semana. La expresión del mini-gen para colágeno I era más variable en médula, bazo y pulmón, tejidos en los que la velocidad de la síntesis de colágeno I es inferior que en hueso. Como era de esperar, el mini-gen no se expresaba en cartílago, un tejido en el que aproximadamente la mitad de la proteína se sintetiza en colágeno II pero en el que no hay síntesis de colágeno I. Tampoco el mini-gen para colágeno I se expresaba en cultivos de condrocitos de los ratones receptores que contenían el gen marcador y que sintetizan colágeno II pero no colágeno I.

Trabajos anteriores han mostrado que los ensayos de las células con marcadores citoquímicos o para ARNm indican que las células sintetizaban colágeno I, colágeno III, fibronectina, fosfatasa alcalina y osteopontina, pero no tenían los rasgos característicos de macrófagos, granulocitos, linfocitos T, linfocitos B o células endoteliales. Los resultados demuestran aquí que, después de inyección intravenosa en ratones irradiados, los cultivos expandidos de células adherentes se propagan eficazmente en diversos tejidos conjuntivos. Los resultados demuestran también que las células sirven como verdaderas células precursoras para estos tejidos, ya que expresaban el gen marcador para colágeno I de una forma específica para el tejido, y se incorporaban difusamente al parénquima mesénquimal de pulmón.

Ejemplo 2

*Condiciones para aislamiento y cultivo de MSCs*

Se estudiaron las condiciones para cultivo de MSCs, de manera que se expandieran pero también que retuvieran el fenotipo como el de las células progenitoras. La Tabla I muestra que el co-cultivo de MSCs con piezas de hueso incrementaba el número de células obtenidas al cabo de 1 semana. Al mismo tiempo, el co-cultivo con hueso reducía los niveles de fosfatasa alcalina (APasa) en las células, una observación que sugiere que las células no se habían diferenciado en osteoblastos. Había además una reducción en los niveles de ácido fosfatasa resistente a tartrato (TRAP), una observación que sugiere que las células no se habían diferenciado en osteoclasas. Efectos similares se observaron con los cultivos secundarios de las MSCs. Por tanto, los resultados sugieren que el co-cultivo con piezas de hueso, puede proporcionar condiciones mejoradas para expansión de MSCs. También, el medio de piezas de hueso cultivadas puede ser una fuente importante de citocinas y factores de crecimiento para expansión de MSCs en cultivo.

En experimentos relacionados, se ha encontrado que se pueden mantener cultivos secundarios de MSCs durante largos períodos de tiempo. Las MSCs pueden pasar en cultivo durante más de 4 meses por tripsinización y re-cultivado en placa. Las células son notablemente estables en cultivos en fase estacionaria. En un experimento, los cultivos estacionarios permanecieron viables más de 4 meses con re-alimentación aproximadamente una vez por semana. En otro experimento, las células permanecieron viables cuando se dejaron toda la noche en una incubadora sin re-alimentación durante 1 mes.

*Transfección estable de MSCs con un vector de retrovirus*

Para obtener virus para infección de MSCs, se modificó el vector retroviral LNCZ (Miller, A. D. y Rosman, G.J. (1989) *Bio-Tecniques* 7, 980-990 que se incorpora aquí como referencia) de manera que el promotor para citomegalovirus (pCMV) dirigía la expresión del gen lacZ (Fig. 1). El vector se transfectó establemente a una línea celular de empaquetamiento murínica anfotrópica (PA317). Se aislaron clones productores de virus constitutivos por selección con G418, y el sobrenadante de los clones se utilizó para infección de MSCs. Se infectaron MSCs de cultivos primarios (de 3 días) durante tres días sucesivos con sobrenadante fresco de la línea productora con la concentración más alta. El teñido de las células 5 días más tarde indicaba que aproximadamente 15-20% de las células expresaban típicamente el gen lacZ, Se colocaron varios cultivos de las células infectadas bajo selección con G418 (concentración activa 0,44 (g/ml) durante 5 días. La mayoría de las células recuperadas continuó expresando el gen lacZ. Se construyeron también modificaciones de LNCZ para que la expresión del gen lacZ fuese dirigida por el promotor del gen de COL1A1 y el promotor del gen COL2A1 (pCOL2A). La expresión del gen lacZ se obtuvo con éxito en cultivos primarios de MSCs con ambas construcciones.

*Reemplazamiento de células de huesos en ratones transgénicos con MSCs normales*

Se infundieron MSCs de ratones normales en ratones transgénicos que expresaban altos niveles del gen de COL1A1 mutado (Tablas II y III). Un mes más tarde de la infusión de MSCs normales en ratones con osteoimperfecta (OI) (Tabla II), la progenie de las células del donante ascendía a 10 a 45% de las células de hueso en ratones receptores que habían sido irradiados con la dosis máxima tolerada de rayos X (700 centi-Grays o cGy). Valores similares se obtuvieron con ratones irradiados con la mitad de la dosis máxima tolerada de rayos X (350 cGy). Sin embargo, la reducción de la dosis a un cuarto (175 cGY) redujo los valores en cuatro ratones a 0%, 5% 10% y 40%. Resultados similares se obtuvieron cuando a los ratones transgénicos con osteoimperfecta (OI) se les infundió un gran número de células de médula completa de la que no se habían separado las MSCs (Tabla III)

En cinco ratones receptores, en los cuales se examinó la síntesis de cadenas de pro$\alpha$1(1) (Tablas II y II), el reemplazamiento de las células de hueso del receptor por MSCs normales del donante iba acompañado por un incremento en la relación de cadenas de pro$\alpha$1(1) normales a cadenas de pro$\alpha$1(1) mutadas en el hueso. De aquí que el reemplazamiento por células normales fuera acompañado por los cambios esperados en el nivel de proteína.

Ejemplo 3

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

Se aíslan MSCs de ratones y se cultivan bajo las condiciones descritas por Pereira, R.F. y col. (1995) *Proc Natl. Acad. Sci. USA 92*, 4857-4861.

Se infectaron MSCs con vectores retrovirales o se transfectaron con ADN desnudo para obtener clones que expresan los genes para hormona humana del crecimiento (hGH, la proteína de obesidad humana (Ob), o el gen del factor IX humano. Dado que el gen lacZ ha sido introducido con éxito en MSCs de ratón con vector retroviral, se utilizan variantes del mismo vector. Al mismo tiempo, se transfectan establemente con electroporación (Andreason, G.L. y Evans, G.A. (988) *Bio-Tecniques* 6: 650-660 y Toneguzzo, F. y col. (1986) *Mol. Cell. Biol*. 6, 703-706, lipofectamina e inyección nuclear (Mercer, W.E. y col. (1992) en "Antisense Strategies", *Ann. N.Y. Acad. Sci. Biol*. 660, 209-218, que se incorpora aquí como referencia) de manera que se pueden emplear genes endógenos más grandes. Además, se evitan algunas de las desventajas potenciales de los retrovirus utilizando metodología de introducción alternativa.

Las condiciones normales para aislamiento y cultivo son: obtención de médula completa de las tibias y fémures de ratones FVB/N de 6 a 10 semanas de edad, cortando los extremos de los huesos y extruyendo la la médula con una jeringuilla que contiene 1 a 2 ml de $\alpha$MEM enfriado con hielo y 10% de suero bovino fetal (FBS). Las células de médula reunidas se dispersan por sacudida suave y se cuentan en un contador automático (Coulter modelo ZM). Se cultivan de $5x10^6$ a $5x10^7$ células nucleadas en 25 ml de $\alpha$MEM y 10% de FBS en matraces de cultivo de 75 $cm^2$. Al cabo de 4 horas o 3 días, las células no-adherentes se separan por reemplazamiento del medio. Las células adherentes se expanden como cultivos primarios durante 10 a 12 días con una re-alimentación aproximadamente cada 4 días. Las células se recuperan por digestión con 0,25% de tripsina y EDTA 1 a 5 mM durante 5 minutos a 37ºC seguido de rascado suave. Las células se diluyen con $\alpha$MEM con 10% de FBS y se vuelven a cultivar en placa a una densidad de $3x10^4$ a $1x10^5$ células por cada 9,5 $cm^2$, en placas de 6 pocillos. En estas condiciones, el tiempo de duplicado de las células es de 19 a 22 horas. Los cultivos secundarios se re-alimentan aproximadamente cada 4 días, y se pasan por tripsinización y se vuelven a cultivar en placa bajo las mismas condiciones.

*Preparación de construcciones de gen*

Se utiliza LNCX de vector de retrovirus como construcción parental. Se utilizan lugares convenientes de clonación en la construcción para preparar las construcciones modificadas pRSV-lacZ, pCMV-lacZ, pCOL1-/LacZ y pCOL2-lacZ (Figura 1). El promotor de pCOL1 es un fragmento de 1,4 kb que contiene 476 pb del promotor, el primer exon y la mayor parte del primer intron del gen de COL1A1 humano. El promotor ha mostrado que, en ratones transgénicos, expresa una forma sin promotor del gen de COL2A1 de una manera altamente específica para tejido y específica de desarrollo (Sokolov, B.P. y col. (1995) *J. Biol. Chem*. 270, 9622-9629). El promotor de COL2A1 es un fragmento

de 1 kb del gen humano de COL2A1 (Ala-Kokko, L. y col. (1991) *J. Biol.Chem*. 266, 14175-14178) que confiere especificidad de expresión en tejido (Bradham, D.M. y col. (1994) *J. Cell Physiol*. 158, 61-68). El gen de lacZ es reemplazado por el gen de hGH (Nichols Laboratories); el gen de OB (Considine, R.V. y col. (1995) *J. Clin. Invest*. 95, 2986-2988) o el gen de factor IX humano (Genetic Therapy, Inc.).

*Utilización de vector de retrovirus*

*Líneas celulares productoras de retrovirus*

Para establecer líneas celulares productoras, se utilizaron células PA317 murínicas de empaquetamiento de retrovirus anfotrópicas. Las células se transfectaron a una confluencia de 20% en cápsulas de 100 mm por el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio (Promega) utilizando 15 $\mu$g de ADN de plasmidio que se linearizó por digestión con ScaI que corta en la región pBR322 del vector de retrovirus. Al día siguiente de la transfección se añadió G418 (GIBCO/BRL) al medio a una concentración activa de 1 mg/ml. Aparecieron colonias resistentes a neomicina a los 7 a 10 días de la selección y se aislaron por clonación con anillos, mecánicamente. Los clones se expandieron y los clones individuales se ensayaron en cuanto a su capacidad de expresar lacZ por teñido directo de pocillos duplicados. La concentración del virus producida por células positivas se ensayó por una sola adición de 50 $\mu$l de medio a células de tumor humano HT-1080 crecidas a una confluencia del 20% en microplacas de valoración de 6 pocillos con 3 ml de medio por pocillo y en presencia de 4 $\mu$g/ml de polibreno. La concentración se ensayó por determinación del número de células HT-1080 que se teñían positivamente para expresión del gen lacZ. Típicamente, la concentración era $1x10^5$ a $1x10^6$.

*Infección por retrovirus de MSCs de ratón*

Se prepararon cultivos primarios de MSCs de ratón como se ha descrito antes. Al cabo de tres días se descartaron las células de médula no-adherentes y se añadió medio fresco. Se infectaron entonces las células con el retrovirus en la presencia de 4 $\mu$g/ml de polibreno por adición de ¼ en volumen de medio sobrenadante fresco de las células productoras transfectadas establemente que tenían la concentración más alta de producción de virus. La infección se repitió dos días sucesivos más Se tiñeron entonces las células directamente para expresión de lacZ o se dividieron en cápsulas mayores y se colocaron bajo selección con 0,4 mg/ml de G418 (concentración activa). Aproximadamente 15 a 20% de cultivos primarios eran positivos para lacZ y la mayoría de las células que sobrevivieron a la selección de G418 eran positivas para lacZ.

*Transfección con lipofectamina*

Se hicieron crecer cultivos primarios de MSCs durante 10 días en $\alpha$-MEM que contenía 10% de FBS. Después de tripsinización y ligero rascado, las células se sembraron en una placa de 6 pocillos a una densidad de $10^5$ células por pocillo. Las células se hicieron crecer durante 2 días, se lavaron entonces 2 veces con PBS y se incubaron con complejo ADN-lipofectamina. El complejo ADN-lipofectamina se había preparado como sigue: se mezclaron 6 $\mu$l de lipofectamina (GIBCO/BRL) con 1 $\mu$g de ADN de LINCZ en 200 $\mu$l de $\alpha$-MEM, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y se añadieron a un pocillo de una placa de 6 pocillos que contenía MSCs en 800 $\mu$l de $\alpha$-MEM. Después de 6 horas de incubación a 37ºC, el complejo ADN-lipofectamina fue reemplazado por 2 ml de $\alpha$-MEM que contenía 10% de FBS. Se tiñeron las células para lacZ o se colocaron bajo selección de G418 después de18 horas de incubación en medio que contenía FBS. Se obtuvieron clones positivos, pero el crecimiento era lento, aparentemente debido a que la densidad celular era demasiado baja después de la selección con G418. Para resolver esta situación, se pueden emplear tres estrategias diferentes: (a) cultivarse en placa las células a densidades más altas; (b) colocar inserciones de cultivo de células de co-cultivo sobre clones supervivientes de manera temprana en el proceso de selección y colocarse MSCs frescas o piezas de hueso en las inserciones (véase Tabla 1), a base diaria, para proporcionar los necesarios factores celulares para estimular el crecimiento; (c) en el momento en que la selección con G418 ha matado muchas de las células no-transfectadas, volver a sembrar los cultivos con MSCs que han sido infectadas con una variante de LNCX del retrovirus (Figura 1) en que el gen de lacZ es reemplazado con un gen seleccionable para timidina quinasa. Por tanto, las MSCs establemente transfectadas con retrovirus se utilizan para proporcionar las necesarias citocinas, factores de crecimiento, y las interacciones celulares requeridas para el crecimiento inicial de las MSCs transfectadas durante la selección con G418. Entonces se pueden separar las células infectadas con el retrovirus por selección negativa con gangciclovir.

*Métodos de administración*

*Inyecciones en el núcleo*

Las inyecciones en el núcleo son muy eficaces como medio de transfectar algunas células. Se cultivaron en placa células empleando cápsulas de 60 mm que contenían una cubierta deslizante de 22 x 22 mm marcada con un círculo para delinear el área para microinyección. Las células se incubaron durante 5 días en un medio que contenía 0,1% de CS para inducir la detención del crecimiento antes de la microinyección. En estas condiciones, entre 8 y 15% de las células incorporaron timidina [$^3$H] durante un marcado continuo de 24 horas entre los días 5 y 6. La microinyección se llevó a cabo utilizando un microscopio invertido Zeiss Axiovert equipado con un microinyector Epprendorf y micromanipulador empleando femto-puntas capilares de vidrio comerciales (Eppendorf). Todas las células dentro del área delineada de la cubierta de corredera (normalmente 150-200) se microiyectaron en el núcleo con ADN a

concentraciones que varían de 0,01-1,0 g/$\mu$l en tampón Tris mM (pH 7,6). Las células inyectadas se expandieron y se ensayaron como se ha descrito antes.

*Electroporación*

Se tratan MSCs.con tripsina al 0,25% y EDTA 1 a 5 mM durante 5 minutos a temperatura ambiente y se recogen entonces por rascado. Las células se aglomeran por centrifugación a 4.000 x g durante 10 minutos, y después se lavan dos veces por volver a suspender el aglomerado en PBS enfriado con hielo (pH 7,4). Las MSCs se vuelven a suspender a 2 x $10^6$ células por 0,8 ml y se coloca una parte alícuota en una cubeta de electroporación (0,4 cm de hueco). Las células se incuban 10 minutos sobre hielo, se añade ADN a la suspensión (5-50 $\mu$g) y las células se enfrían durante 10 minutos adicionales. Se electropora entonces la suspensión de células utilizando un instrumento (BioRad Gene Pulser; modelo 1652076) a una resistencia de campo determinada empíricamente que produce el mayor porcentaje de células que retienen el ADN añadido exógenamente. Para determinar la resistencia de campo apropiada para MSCs, se han realizado valoraciones que varían de 0,25-2,5 kv/cm. La eficacia de la electroporación se siguió por introducción del gen lacZ (vector LNCZ) y tiñendo entonces las células 48 a 72 horas después de la electroporación.

*Ensayos*

*hGH*

Se sigue la expresión del gen hGH por ensayo del medio desde clones de células crecidas en placas de microvaloración de 6 pocillos con un ensayo de inmunoabsorbente unido a enzima con un estuche (kit) disponible comercialmente (GIBCO/BRL). En este ensayo se añaden 0,1 ml de tampón con 2 veces de diluyente por pocillo de la placa de microvaloración. Al cabo de 5 minutos, se añade 0,1 ml de muestra de ensayo y la placa se incuba a 37ºC durante 30 minutos. Se lavan los pocillos 5 veces y se añaden 0,2 ml de anticuerpo primario por pocillo. Se incuban las muestras a 37ºC durante 30 minutos y se lavan 5 veces. Se añaden entonces 0,2 ml de tampón substrato que contiene substrato de o-fenilendiamina. Las muestras se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos y la reacción se detiene por adición de 0,1 ml de ácido sulfúrico 2N. Se ensaya la absorbancia de la muestra a 490 nm.

*Proteína Ob*

Se ensayan células para expresión del gen de OB con un radioinmunoensayo de proteína de medio celular. Se provocó en conejos el anticuerpo primario para proteína OB humana frente a proteína recombinante frente a conejos sintetizada en un sistema de expresión de *E. coli*. y se purificó hasta homogeneidad. La proteína humana es altamente homóloga a la de ratón y por tanto los anticuerpos anti-humano reaccionarán cruzadamente con la proteína de ratón. Si no lo hacen, el ADNc corto del ratón (619 nt) es expresado en *E. coli*, es purificada la proteína y se preparan los anticuerpos. Alternativamente, se compran péptidos sintéticos con la secuencia de ratón y se utilizan los mismos para preparar anticuerpos. Para el ensayo, se radio-marcó proteína Ob humana recombinante con yodo$^{125}$ por el método de Bolton-Hunter seguido de purificación por filtración por gel utilizando Sephadex G-25. La actividad específica obtenida era -30 Ci/$\mu$g. Se pre-incubaron muestras de ensayo (0,2 ml) con antisuero primario (dilución 1:2000) en solución salina tamponada con fosfato que contenía 0,1% de Triton X-100 durante 16 horas, a 4ºC, en un volumen total de 0,4 ml. Se añadió entonces proteína Ob-I$^{125}$ (-30.000 cpm portados en 100 $\mu$l) y se continuó la incubación durante 24 horas adicionales. La proteína Ob unida (12± 1%; unión no específica 1,4± 0,1%) se inmunoprecipitó por adición de 0,1 ml de suero IgG de oveja anti-ratón (Antibodies, Inc., Davis CA), 0,1 ml de suero de conejo normal (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD), y 0,1 ml de polietilen glicol al 10%. Se centrifugaron los tubos durante 15 minutos (2200 rpm) y el marcador sin unir se decantó y el aglomerado se contó en un contador gamma Packard 5000 (Downers Grove, IL). La concentración de proteína Ob en muestras desconocidas se calculó utilizando un modelo logístico de cuatro parámetros sin pesada de Rodbard. El límite de detección de este ensayo es 0,39 ng/ml. La varianza de intraensayos es 11,6% a 12 ng//ml con una varianza de interensayos de 20,8% a 13,1 ng/ml

*Factor IX humano*

Se ensayó la expresión del gen para factor IX con un ELISA comercialmente disponible (American Bioproducts Company) en condiciones similares a las utilizadas para ensayo de hGH (anterior). Como ha sido publicado por Smith y col. (74), la curva normalizada variaba de 1-50 ng/l-1 y el límite de sensibilidad era 1ng/ml. En el ensayo no hubo reacción cruzada con factor IX de ratón.

Ejemplo 4

(Que no forma parte de la invención)

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

Experimentos con ratones OI transgénicos han demostrado que MSCs cultivadas pueden servir como precursoras tipo célula parental de hueso, cartílago y otros tejidos mesénquimales después de infusión sistémica. Por tanto, MSCs que expresan hGH, la proteína Ob o el factor IX se infunden en ratones irradiados y no-irradiados para evaluar la expresión sostenida de los genes *in vivo*.

*Infusión de MSCs*

Inicialmente, las MSCs se infunden en ratones en condiciones tales como las descritas en la Tabla II (ratones de tres semanas: irradiación de 300 o 700 Grays; inyección intraperitoneal; 1 x $10^6$ MSCs; y $2x10^8$ células de médula completa). Además, se compara la infusión intravenosa con la intraperitoneal; y se emplean niveles más bajos de irradiación con rayos X. También se infunden las células en embriones por seccionado de cesárea. En las pruebas preliminares, se inyectaron 50 $\mu$l de 5 x $10^4$ES en el amnios de siete embriones de 13 días; 6 de 7 nacieron como crías viables. Por lo tanto, es factible la inyección intrauterina de MSCs.

*Curvas de crecimiento*

Una expresión eficaz *in vivo* de hGH incrementará la tasa de crecimiento de ratones y la expresión de la proteína Ob inducirá la sensación de hambre. Se hace seguimiento, por lo tanto, del peso y tamaño de los ratones tratados y de compañeros de camada de control.

*Ensayos de expresión de genes*

Se obtiene sangre desde el plexo retro-orbital de ratones a 1 semana, 1 mes, 3 meses, 5 meses, 10 meses y 20 meses desde la infusión de las MSCs. Se ensayan hGH y factor IX por ELISA, y la proteína Ob se ensaya con un ensayo radioinmune. Además, si se obtienen incrementos de factor IX humano mensurables con ELISA, se emplea el procedimiento descrito por Smith, T.A.G. y col. (1993) *Nature Genet*. 5.397-402, que se incorpora aquí como referencia, para ensayo de factor IX humano biológicamente activo. En este procedimiento, se capturó primero el factor IX humano en un pocillo de microvaloración con el anticuerpo monoclonal, BGIX1, y se activó entonces por factor XIa. El factor IX activo, en combinación con factor VIII, convertía el factor X a Xa. El factor Xa penetraba en el substrato cromogénico, S2765, produciendo un producto amarillo. Las placas de microvaloración recubiertas con BGIX 1 y el Factor VIII se compraron en Elcatech, Inc. (Winston-Salem, NC). El factor Xia se compró en Enzyme Research Labs, Inc (South Bend, IN). El Factor X, solución en fosfolípido, S-2765, y el inhibidor de trombina 1-2581, se compraron en Kabi Pharmacia Hepar, Inc. (Franklin, OH). Se prepararon cuatro tampones: A), Tris 50 mM, NaCl 150 mM, BSA al 1%, pH 7,5; B), Tris 150 mM, $CaCl_2$ 5 mM, 10 mg/ml de gelatina, pH 7,6; C) Tris 50 mM, $CaCl_2$ 10 mM, pH 7,5; D) Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8,4. La mezcla de reacción Factor VIII/X se preparó reciente por mezclado de cantidades iguales de los siguientes materiales de reserva: factor VIII, 5U $ml^{-1}$ en tampón A; factor X, 1 U $ml^{-1}$ en tampones; 1-2581, 34 (g/ml en tampón A; $CaCl_2$, 25 mM en agua, y fosfolípido. Se diluyeron muestras de plasma en tampón A y se añadieron 100 $\mu$l a cada pocillo. Se incubó la placa durante 90 minutos a temperatura ambiente y se lavó entonces cinco veces con tampón B. Se añadieron 100 $\mu$l de Factor Xia (2 (g/ml en tampón C) a cada pocillo. Después de 30 minutos a 37ºC, se añadieron 100 $\mu$l de S2765 (0,5 mM en tampón D) a cada pocillo y se incubó la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de detener al reacción por adición de ácido acético a una concentración final de 10%. Las absorbancias a 405 nm se determinaron con un lector de microplaca Bio-Rad. La curva patrón obtenida preparando diluciones de plasma humano normal reunido, era lineal desde 3.25 ng/ml. El ensayo no reaccionó cruzadamente con factor IX de ratón. Los niveles de factor IX de 250 ng por ml o 5% del normal se consideran en general terapéuticos y 100 a 150 ng/ml se consideran beneficiosos.

Ejemplo 5

*Expresión sostenida de los genes a niveles fisiológicamente importantes por colocación de las MSCs en cámaras de difusión subcutáneas*

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

*Preparación de cámaras*

Las cámaras de difusión se montan a partir de componentes comercialmente disponibles (Millipore Corp.) y se utilizan como se ha descrito en trabajos previos (Benayahu, D. y col. (1989) *Supra*, Mardon, H.J. y col (987) *Supra*). Brevemente, se pegan los filtros de membrana de un tamaño de poro de 0,3 $\mu$m a un lado de cada uno de dos anillos de plástico con pegamento acriloide, Se pegan juntos entonces los dos anillos para formar una cámara, cuyas dimensiones son 9 mm de diámetro interior y 2 mm de grueso con un volumen de aproximadamente 127 $mm^3$. Se inoculan de 104 a 107 MSCs en las cámaras a través de un orificio en un anillo y el orificio se cierra con un tapón de plástico en cuña recubierto de cola. Las cámaras se implantan en ratones ya subcutáneamene en el lomo o intraperitonealmente bajo anestesia. Inicialmente, se insertan una o más cámaras en ratones recién destetados (3 semanas). A continuación, se insertan cámaras en ratones de 1 semana de edad. Para los experimentos con los ratones de 1 semana de edad, se preparan cámaras más pequeñas a partir de discos (5 mm de diámetro interior) cortados de las puntas de plástico para micropipetas.

*Ensayos*

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

Ejemplo 6

Con referencia a la Figura 2, la cámara de difusión (1) puede tener un tambor de cámara (3) con dos extremos, un primer extremo (5) y un segundo extremo (7). El tambor puede estar formado por uno o más anillos asegurados entre sí por un medio no-tóxico. La cámara va provista en cada extremo con un filtro, un primer filtro (9) y un segundo filtro (11). Los filtros son porosos para los factores de manera que los factores pueden pasar de la cámara al mamífero. El tamaño de poro del filtro puede ser de aproximadamente 0,25 $\mu$m o más pequeño, preferiblemente de aproximadamente 0,1 $\mu$m. Los filtros pueden estar hechos de plástico, teflon, poliéster, o cualquier material inerte que sea fuerte, flexible y capaz de resistir los tratamientos químicos. Los filtros se pueden asegurar en su posición con accesorios de caucho que pueden proporcionar también un cierre más estanco. Opcionalmente, la porción de tambor de la cámara puede tener una abertura (13) que puede estar cubierta por un tapón (no mostrado). El tapón puede ser de rosca o del tipo de los de caucho que se cierran automáticamente y enganchado a la abertura. La inserción de células en el contenido de la cámara puede realizarse así accediendo a la abertura al abrir el tapón e insertando las células con ayuda de una aguja y jeringuilla ordinarias. La cámara se puede hacer de cualquier material, tal como, y sin que quede limitado solo a ellos, plástico, teflón, lucita, titanio, o cualquier material inerte, que no sea tóxico para los mamíferos, y sea bien tolerado por ellos. Además, las cámaras deberán ser capaces de sobrevivir a la esterilización.

La cámara puede implantarse de las formas siguientes no-limitativas: subcutáneamente o intraperitonealmente, por ejemplo. La cámara se puede retirar aproximadamente 24 a aproximadamente 30 horas después de la implantación. Alternativamente, se puede emplear una cámara rellenable de manera que la cámara se pueda volver a utilizar para tratamientos y vaciarse después de los tratamientos.

TABLA 1

*Condiciones para el crecimiento de cultivo primario y secundario de MSCs*

| MSCs | Condiciones de cultivo | Células por pocillo x $10^5$ | Apasa[e] mmol min/mg | TRAP[e] (mmol min/mg) |
|---|---|---|---|---|
| Primario | convencional[a] | 2,0 | 4,26 | 144 |
| | co-cultivo[b] | 6,41 | 22,3 | 102 |
| | co-cultivo[c] (Matrigel) | 6,94 | 42,0 | 105 |
| Secundario[d] | convencional | 1,33 | 2,052 | 75 |
| | co-cultivo | 7,40 | 362 | 60,6 |
| | co-cultivo (Matrigel) | 5,08 | 506 | 59,2 |

[a] Cultivo de células de médula completas $20x10^6$ de ratones de seis semanas de edad en pocillos individuales de 9,5 $cm^2$ en 2 ml de FCS al 10% y $\alpha$-MEM. Se separaron las células no adherentes el día 3 y se continuó la incubación en medio fresco hasta el día 7.
APasa y TRAP se ensayaron como se ha descrito en la referencia 55.

[b] Co-cultivo con piezas de hueso (medio fémur y media tibia) en inserciones de cultivo de células (23 mm; tamaño de poro de 3 $\mu$m; Becton Dickinson).

[c] Lo mismo que [b], con inserciones cubiertas con Marigel.

[d] Se separan cultivos primarios el día 10 empleando tripsina al 0,25% y EDTA 1 mM durante 5 minutos a 37ºC seguido de un suave rascado. Las células de un pocillo ($2x10^5$) se diluyeron 1:4 y se cultivaron en pocillos de 9,5 $cm^2$ durante 7 días con cambios de medio el día 3 y el día 6.

[e] APasa (20,54) y TRAP (55). Las actividades eran por mg de proteína total.

TABLA II

*Experimentos con (a) ratones transgénicos como receptores; (b) MSCs normales, células de un donante; y (c) reducción de rayos X*

| | Rayos X (cG) | Células de donante [a] | | Reemplazamiento de la reducción de hueso en 1 mes (%) | en cadenas de pro-α1(1) mutadas |
|---|---|---|---|---|---|
| Ratones receptores | | MSCs | Médula completa | | |
| Transgénicos | 700 | $0,7x10^6$(N)[a] | $15x10^6$(TG)[ab] | 10 a 45% | 26 a 73% |
| Transgénicos (3 semanas) | 350 | $1,2x10^6$(N) | $2x10^6$(TG) | n-3 28 a 60% | n=3 |
| Transgénicos (3 semanas) | 175 | $1,2x10^6$(N) | $2x10^6$(TG) | (n=4) 0 a 40% | |
| (3 semanas) | | | | (n=4) | |

[a] (N), normal; (TG), transgénico

[b] MSCs separadas de las células de médula completas antes de la infusión por incubación sobre placa de cultivo de plástico durante 4 horas a 37ºC.

TABLA III

*Experimentos con (a) ratones transgénicos como receptores; (b) aumento a 10 veces en las células de médula completas como células de donante y (c) reducción de dosis de rayos X*

| | Rayos X (cG) | Células de donante [a] | | Reemplazamiento de la reducción de hueso en 1 mes (%) | Reducción en cadenas de pro-α1(1) mutadas |
|---|---|---|---|---|---|
| Ratones receptores | | MSCs | Médula completa | | |
| Transgénico (3 semanas) | 700 | | $5x10^6$(N)[a] | 10 a 38% (n=3) | 26 a 73% n=2 |
| Transgénico (3 semanas) | 350 | | $16x10^6$(N) (n=3) | 50 a 78% (n=3) | |
| Transgénico (3 semanas) | 350 | | $5x10^6$(N) | 22 a 45% (n=4) | |

[a] (N) médula completa de ratones normales sin ningún tratamiento para separar MSCs

TABLA IV

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

| Enfermedad | metabolito o proteína deficiente o excesivos | Defecto genético | Gen terapéutico potencial en células estromales |
|---|---|---|---|
| Deficiencia en hormona del crecimiento más defectos de crecimiento | Hormona del crecimiento baja en parte | Hormona del crecimiento en parte | Hormona del crecimiento |
| Obesidad | Desconocido | Desconocido | Gen para la proteina Ob (reduce el apetito) |
| Enfermedad renal | Anemia más otros cambios | Genes múltiples y formas adquiridas | Eritroproteína |
| Diabetes | Insulina reducida | Múltiple | Varios genes para la síntesis de insulina y liberación regulada (complejo) |
| Ateroesclerosis | Niveles de HDL relativamente bajos | Multiple | Gen para APO-AI (aumenta HDL en ratones transgénicos |
| Osteoporosis | Desconocido | Múltiple | Estrógeno agonista específico para células de hueso |
| Enfermedades infecciosas incluida el SIDA | | | Anticuerpos para agente infeccioso |
| Enfermedades autoinmunes | | | Antagonistas para el epitope inmune |

TABLA V

*Enfermedades monogénicas definidas tratables por células estromales encapsuladas (Lista parcial)*

| Enfermedad | Metabolito o proteína deficiente o excesivo | Defecto de gen | Gen terapéutico potencial en células de estroma |
|---|---|---|---|
| Defectos del ciclo de urea | Glutamina | Varios diferentes | Glutaminasa |
| Acidurias orgánicas de cadena ramificada | Cetoácidos de leucina, isoleucina y valina | Tres diferentes | Descarboxilasas específicas |
| Inmunodeficiencia deficiencia de adenina desaminasa | Desoxi-adenosina | Adenina desaminasa | Adenina desaminasa |
| Lipoproteína familiar | Quilomicrones | Lipoproteína lipasa | Lipoproteína lipasa |
| Enfermedad de Gaucher (tipo I) | Glucosilceramida | acido β-glucosidasa | β-glucosidasa de ácido |
| Deficiencia en α1-antitripsina | Proteína en suero baja | α-Antitripsina | α-Antitripsina |
| Galactosemia | Galactosa aumentada | Una de cuatro enzimas | Una de cuatro enzimas |
| Hemofilia | Factor VIII ó IX reducido | Factor VIII ó IX | Factor VIII ó IX |

## REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de implante que comprende:

un receptáculo que tiene al menos una superficie de membrana, donde el citado receptáculo aísla inmunológicamente células estromales de médula ósea contenidas en el mismo que comprenden una construcción de gen, constando la citada construcción de gen de una secuencia de nucleótido que codifica una proteína beneficiosa ligada operativamente a elementos reguladores que funcionan en la citada célula estromal.

2. El dispositivo de implante según la reivindicación 1 donde la citada membrana tiene un tamaño de poro de 3 micras.

3. El dispositivo de implante según la reivindicación 1 que tiene un área de superficie de membrana de al menos 100 $mm^2$.

4. El dispositivo de implante según la reivindicación 1 que comprende $10^4$ a $10^{11}$ células estromales.

5. El dispositivo de implante según la reivindicación 1 que comprende $10^4$ a $10^8$ células estromales.

6. El dispositivo de implante según la reivindicación 1 donde la citada proteína beneficiosa se selecciona del grupo que consiste en hormona humana del crecimiento, factor de obesidad y Factor VIII humano.

7. Utilización de un dispositivo de implante que comprende un receptáculo que tiene al menos una superficie de membrana, donde el citado receptáculo aísla inmunológicamente células estromales de médula de hueso contenidas en el mismo que comprende una construcción de gen, constando la citada construcción de gen de una secuencia de nucleótido que codifica una proteína beneficiosa ligada operativamente a elementos reguladores que funcionan en la citada célula de estroma, en la manufactura de un medicamento para tratamiento de un individuo con una enfermedad, trastorno o estado que pueden ser tratados con una proteína beneficiosa.

8. Utilización, según la reivindicación 7 donde la citada enfermedad, trastorno o estado que pueden ser tratados con una proteína beneficiosa es una enfermedad, trastorno o estado **caracterizados** por un defecto de un gen.

9. La utilización según la reivindicación 8 donde la citada proteína beneficiosa se selecciona del grupo que consiste en hormona humana del crecimiento y Factor VIII humano.

10. La utilización según la reivindicación 7 donde la citada membrana del citado dispositivo de implante tiene un tamaño de poro de 3 micras.

11. La utilización según la reivindicación 7 donde el citado dispositivo de implante tiene un área de superficie de membrana de al menos 100 $mm^2$.

12. La utilización según la reivindicación 7 donde el citado dispositivo de implante comprende $10^4$ a $10^{11}$ células estromales.

13. La utilización según la reivindicación 7 donde el citado dispositivo de implante comprende $10^4$ a $10^8$ células estromlesa.

14. La utilización según la reivindicación 7 donde el citado dispositivo de implante es adecuado para la citada implantación subcutánea al individuo.

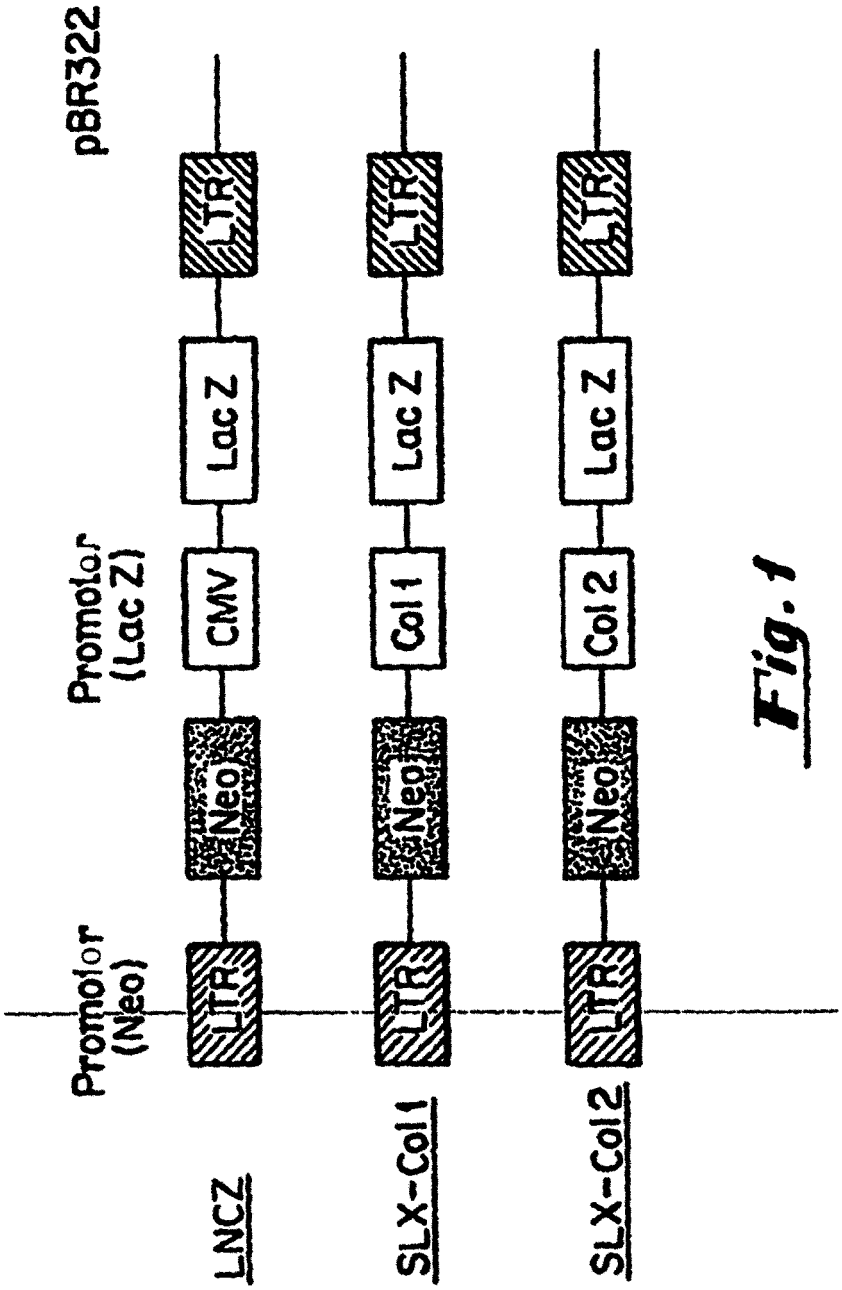
pBR322
Promotor (Lac Z)
Promotor (Neo)
LTR
Neo
CMV
Lac Z
LTR
LNCZ
LTR
Neo
Col 1
Lac Z
LTR
SLX-Col1
LTR
Neo
Col 2
Lac Z
LTR
SLX-Col2

*Fig. 1*

Camara de Difusion

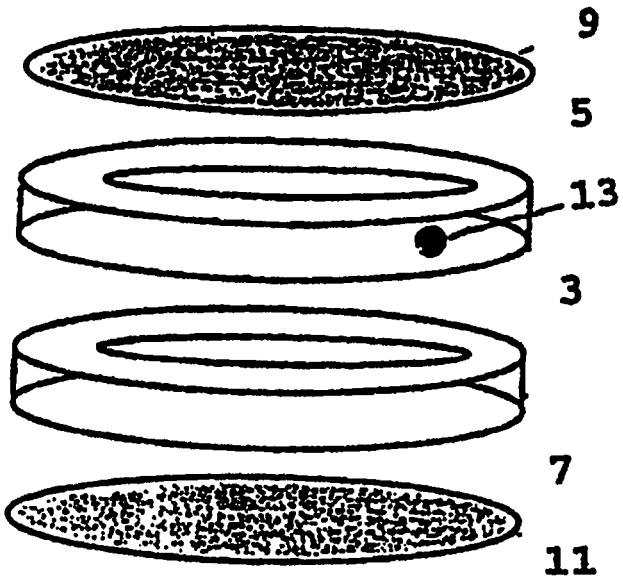


FIG. 2